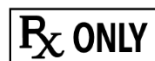




Lyra[®]Direct
SARS-CoV-2 ASSAY

Para la detección cualitativa de ARN viral del coronavirus SARS-CoV-2 humano de muestras directas de exudado nasal, nasofaríngeo u orofaríngeo.

Para uso diagnóstico *in vitro*.



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

ÍNDICE

USO PREVISTO	2
RESUMEN Y EXPLICACIÓN	3
PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO	3
MATERIALES SUMINISTRADOS	4
MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS	4
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	5
CONSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN DE LOS REACTIVOS DEL KIT.....	6
Indicaciones de inestabilidad o deterioro de los reactivos.....	6
OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS	6
ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS PROCESADAS	6
PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS	6
Procedimiento de procesamiento de muestras.....	6
Procedimiento de rehidratación de la mezcla maestra	7
Procedimiento de configuración de la RT-PCR.....	7
CONTROL DE CALIDAD.....	7
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES	8
RENDIMIENTO CLÍNICO	9
Estudio 1	9
Estudio 2	9
Estudio 3	10
RENDIMIENTO ANALÍTICO.....	10
Límite de detección.....	10
Estudio 1	10
Estudio 2 – Estudio comparativo del LoD para el Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay y el Lyra SARS-CoV-2 Assay	11
Resultados del estudio de confirmación del LoD.....	11
REACTIVIDAD ANALÍTICA (INCLUSIVIDAD)	13

ESPECIFICIDAD ANALÍTICA (REACTIVIDAD CRUZADA)	14
SUSTANCIAS INTERFERENTES	15
LIMITACIONES	16
SERVICIO DE ATENCIÓN AL CLIENTE Y SERVICIO TÉCNICO	16
PROPIEDAD INTELECTUAL	17
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
ANEXO (PROTOCOLOS DE PROGRAMACIÓN Y ANÁLISIS ESPECÍFICOS DE CADA TERMOCICLADOR).....	18
Instrucciones de programación del Applied Biosystems 7500 Fast Dx.....	18
Procedimiento de prueba del termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Dx	20
Instrucciones de programación de Applied Biosystems 7500 Standard	20
Procedimiento de prueba del termociclador Applied Biosystems 7500 Standard	22
Procedimiento de programación del termociclador Bio-Rad CFX96 Touch.....	23
Procedimiento de prueba del termociclador Bio-Rad CFX96 Touch.....	25
Instrucciones de programación de Qiagen Rotor-Gene Q.....	25
Análisis de prueba de Qiagen Rotor-Gene Q	27
Instrucciones de programación de Roche LightCycler 480 Instrument II	28
Creación de una plantilla de análisis de LightCycler 480 Instrument II Assay	28
Creación de un procedimiento de análisis en LightCycler 480 Instrument II Assay	29
Instrucciones de programación de Roche cobas z 480 Instrument	30
Creación de una plantilla de análisis de cobas z 480 Assay.....	30
Creación de un procedimiento de análisis de cobas z 480 Assay	32
Instrucciones de programación de Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro.....	33
Instrucciones de programación de análisis de prueba de Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro:	33
Creación de un procedimiento de análisis en Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro.....	34
GLOSARIO	37



El Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay es una prueba de RT-PCR en tiempo real destinada a la detección cualitativa del ácido nucleico del SARS-CoV-2 en muestras directas de exudados nasales (NS), nasofaríngeos (NF) y orofaríngeos (OF) de pacientes en los que su médico sospecha la presencia de COVID-19. El análisis se centra en la poliproteína no estructural (pp1ab) del virus SARS-CoV-2.

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

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

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

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El SARS-CoV-2, también conocido como el virus causante de la COVID-19, se identificó por primera vez en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei (China), en diciembre de 2019. Se cree que el virus, como en el caso de los novedosos coronavirus causantes del SARS-1 y del MERS, se originó en murciélagos; sin embargo, es posible que el SARS-CoV-2 haya tenido un hospedador intermedio como los pangolines, los cerdos o las civetas.¹ A comienzos de abril de 2020, la infección en seres humanos se había extendido a más de 180 países, había infectado a más de 846 000 y había matado a más de 41 400 personas.¹ El 11 de marzo, la OMS declaró la infección por el SARS-CoV-2 una pandemia mundial.

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

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

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

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

Marcadores de las sondas del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay	
Diana	Colorante
Poliproteína no estructural (pp1ab)	FAM
Control del proceso (PRC)	Quasar® 670 o Cy5

A continuación, se incluye un resumen del procedimiento:

- Recogida de muestras:** Obtenga exudados nasales, nasofaríngeos u orofaríngeos utilizando las técnicas estándar. Estas muestras se transportan, almacenan y procesan conforme a las siguientes instrucciones.¹
- Extracción de ácidos nucleicos:** Extraiga los ácidos nucleicos añadiendo la muestra de exudado 400 µl de tampón de proceso y calentándola a 95 °C durante 10 minutos. El control del proceso (PRC) está en el tampón de proceso, sirve para controlar los inhibidores de la muestra extraída y garantiza que se ha realizado la amplificación adecuada.
- Rehidratación de la mezcla maestra:** Vuelva a hidratar la mezcla maestra liofilizada utilizando 135 µl de solución de rehidratación. La mezcla maestra contiene cebadores con oligonucleótidos, fluoróforo y sondas marcadas con extintor de fluorescencia dirigidos a las regiones conservadas del SARS-CoV-2, así como la secuencia del control del proceso. Las sondas están doblemente marcadas, con un colorante indicador en el extremo 5' y un extintor de fluorescencia en el extremo 3'. La mezcla maestra rehidratada es suficiente para ocho reacciones.
- Amplificación y detección de ácido nucleico:** Añada 15 µl de la mezcla maestra rehidratada a cada pocillo de la placa (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 tubo (Qiagen Rotor-Gene Q). A continuación, añada 5 µl de los ácidos nucleicos extraídos (muestras con PRC) al pocillo de la placa o tubo. Coloque la placa o el tubo en el instrumento adecuado.

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

MATERIALES SUMINISTRADOS

N.º de ref. M124

Kit de detección (96 reacciones). Conservar a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.		
N.º	Componente	Cantidad
1	Solución de rehidratación directa N.º de pieza M5287	1 vial/kit 1,9 ml
2	Mezcla maestra de Lyra SARS-CoV-2 N.º de pieza M5150 Contenidos liofilizados: Enzima ADN polimerasa con actividad de transcriptasa inversa Pares de cebadores con oligonucleótidos; sondas de oligonucleótidos dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP) Estabilizantes	12 viales/kit, 8 reacciones/vial
3	Tampón de proceso N.º de pieza M5281	1 tubo/kit de 40 ml
CONTROL +	Control positivo con ARN sintético de SARS-CoV-2 N.º de pieza M5274	1 vial/kit 1,0 ml
CONTROL -	Control negativo Pieza N.º M5275	1 vial/kit 1,0 ml

- Instrucciones de uso del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Hisopos flocados nasofaríngeos para la recogida de muestras NF
- Hisopo nasal de poliéster flocado o hilado para la recogida de muestras NS
- Hisopo regular de poliéster flocado o hilado para la recogida de muestras OF
- Tubo de transporte de hisopo
- Micropipetas (intervalo de 1 a 10 µl y de 100 a 1000 µl)
- Puntas de pipetas antiaerosoles con barrera de filtrado
- Applied Biosystems 7500 Fast Dx, versión del software 1.4 o posterior
- Applied Biosystems Standard, versión del software 2.0.6 o posterior
- Roche LightCycler 480 Instrument II, versión del software 1.5.0.39 o posterior
- Roche cobas z 480 Instrument, versión del software 1.5.1.62 SP2 o posterior
- Qiagen Rotor-Gene Q, versión del software 2.0.2.4 o posterior
- Bio-Rad CFX96 Touch, versión del software 3.1 o posterior
- Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro, versión del software 2.0 o posterior
- N.º de placa de PCR de 96 pocillos:
 - ▶ Applied Biosystems 7500 Fast Dx: 4344906
 - ▶ Applied Biosystems Standard: N8010560
 - ▶ Roche LightCycler 480: 04729692001, lámina incluida
 - ▶ Bio-Rad CFX96 Touch: HSP9631, precintos MSB1001
 - ▶ Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro: 4483354
- Películas de placa óptica
- Rotor de 72 pocillos Qiagen (n.º de pieza 9018903)
- Anillo de bloqueo de rotor de 72 pocillos Qiagen (n.º de pieza 9018904)
- Tubos y tapones de tiras Qiagen, 0,1 ml (250) (n.º de pieza 981103)

- Centrífuga de placas para placa de 96 pocillos
- Bloque de calor seco, capaz de calentar tubos de 1,5 ml a 95 °C ± 1 ° durante 10 minutos
- Tubos de microcentrifugadora de 1,5 ml
- Bloque de calor seco, capaz de calentar la placa de microvaloración de pocillos profundos a 95 °C ± 1 ° durante 10 minutos (Eppendorf ThermoMixer® C, con inserto de pocillo profundo, números de pieza 5382000023, 531000002)
- Placa de microvaloración de pocillos profundos (Eppendorf 951033103 o equivalente)

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

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

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Los resultados positivos son indicativos de la presencia de ARN del SARS-CoV-2.
- Los laboratorios de Estados Unidos y sus territorios deben notificar todos los resultados positivos a las autoridades sanitarias públicas pertinentes.
- Las características de rendimiento de esta prueba se han establecido con los tipos de muestras que aparecen en el **Apartado de uso previsto** solamente. No se han evaluado los resultados de este análisis con otros tipos de muestras.
- El uso de muestras en medios de transporte perjudicará a la sensibilidad del ensayo, por lo que no deben utilizarse con el ensayo.
- El ensayo se ha validado utilizando el software de Applied Biosystems 7500 Fast Dx, versión 1.4 o posterior. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar esta versión de software.
- El ensayo se ha validado utilizando el software de Applied Biosystems 7500 Standard, versión 2.0.6 o posterior. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar esta versión de software.
- El ensayo se ha validado utilizando el software de Roche LightCycler 480 Instrument II, versión 1.5.0.39. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar esta versión de software.
- El ensayo se ha validado utilizando el software de Roche LightCycler 480 Instrument II, versión 1.5.0.39 o posterior. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar esta versión de software.
- El ensayo se ha validado utilizando el software de Roche cobas z 480 Instrument, versión 1.5.1.62 SP2 o posterior. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar esta versión de software.
- El ensayo se ha validado utilizando el software de Qiagen Rotor-Gene Q, versión 2.0.2.4 o posterior. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar esta versión de software.
- El ensayo se ha validado utilizando el software de Bio-Rad CFX96 Touch, versión 3.1 o posterior. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar esta versión de software.
- El ensayo se ha validado utilizando el software de Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro, versión 2.4 o posterior. Póngase en contacto con el servicio técnico de Quidel antes de modificar o actualizar esta versión de software.
- El uso de este producto debe limitarse a personal con la suficiente formación en las técnicas de PCR y RT-PCR.
- Trate todas las muestras como potencialmente infecciosas. Siga las precauciones universales cuando manipule las muestras, este kit y su contenido.
- Los procedimientos adecuados de obtención, conservación y transporte de las muestras son fundamentales para la obtención de resultados correctos.
- Conserve los reactivos del análisis tal como se indica en las etiquetas de cada uno de ellos.
- Utilice ropa de protección adecuada, guantes y protección facial cuando utilice este kit.
- Para obtener resultados precisos, pipetee cuidadosamente utilizando solo equipos calibrados.
- Limpie y desinfecte a fondo todas las superficies con una solución de lejía al 10 % seguida de agua de grado molecular.
- Utilice micropipetas con una barrera para aerosoles o puntas para desplazamiento positivo para todos los procedimientos.
- Evite la contaminación microbiana y la contaminación cruzada de los reactivos del kit. Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- No mezcle los reactivos de kits con números de lote distintos.
- No use reactivos de otros fabricantes con este kit.
- No use el producto después de su fecha de caducidad.
- La planificación adecuada del flujo de trabajo es fundamental para minimizar el riesgo de contaminación. Planifique siempre un flujo de trabajo de laboratorio de forma unidireccional, comenzando con la preamplificación y avanzando por la amplificación y detección.
- Use suministros y equipos especializados en las zonas de preamplificación y amplificación.
- No permita el movimiento cruzado de personal o equipo entre las zonas.
- Mantenga siempre separados los suministros de amplificación de los suministros de preamplificación.

- No abra los tubos de muestras ni desprecinte las placas tras la amplificación.
- Para minimizar el riesgo de contaminación por amplicones, deseche cuidadosamente el material amplificado de conformidad con las leyes y normativas locales.
- No use suministros especializados para la preparación de muestras o reactivos en el procesamiento de ácidos nucleicos diana.
- Para obtener información adicional sobre símbolos de peligro, seguridad, manipulación y eliminación de los componentes de este kit, consulte la Ficha de datos de seguridad (FDS)/(Safety Data Sheet, SDS) en quidel.com.

CONSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN DE LOS REACTIVOS DEL KIT

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

Indicaciones de inestabilidad o deterioro de los reactivos

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

OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de exudado nasal, nasofaríngeo u orofaríngeo deben recogerse y colocarse en un tubo de transporte limpio y seco. Las muestras deben transportarse y analizarse lo antes posible después de la recogida. Las muestras son estables durante un máximo de 48 horas a temperatura ambiente o un máximo de 72 horas si se almacenan a una temperatura entre 2 °C y 8 °C. Si las muestras no se pueden analizar en las 72 horas siguientes a la obtención, deben congelarse a –70 °C o más frías hasta su análisis. La estabilidad a –70 °C se evaluó hasta 8 días después de la recogida.

ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS PROCESADAS

Las muestras procesadas en tampón de proceso se pueden conservar a entre 2 °C y 8 °C durante un máximo de 7 días.

PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

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

Procedimiento de procesamiento de muestras

1. 25 minutos antes de la etapa de lisis por calor, caliente el bloque térmico hasta 95 °C.
2. Añada 400 µl de tampón de proceso al número necesario de pocillos (2 para los controles y 1 por paciente) en una placa de microvaloración de pocillos profundos o un tubo de microcentrifugadora.
3. Coloque el hisopo en un tubo o pocillo identificado y hágalo girar enérgicamente durante 10 segundos para eluir el material de la muestra. Gire la punta del hisopo contra la parte interior del pocillo mientras lo retira. Deseche el hisopo utilizado en un contenedor para residuos biológicos.
4. Caliente la placa o los tubos a 95 ± 1 °C durante 10 minutos:

Nota: No selle ni cubra la placa durante el paso de calor.

- a. En el caso de placas de pocillos profundos, utilice un ajuste de rotación de 300 rpm;
- b. En el caso de tubos, agite en vórtex durante 5 segundos antes y después del paso de calor

Nota: *Empiece el procedimiento de lisis de 10 minutos después de colocar los tubos en el bloque y de esperar hasta que este vuelva a alcanzar los 95 °C.*

5. Retire las muestras procesadas del bloque térmico de tubos o placas y deje que se enfríen entre la temperatura ambiente y la refrigerada. Esto incluye muestras en una placa de microvaloración de pocillos profundos o un tubo de microcentrifugadora. La muestra aparecerá turbia.

Nota: *Las muestras lisadas se pueden conservar a entre 2 °C y 8 °C, –20 °C, o –70 °C durante un máximo de 7 días.*

Procedimiento de rehidratación de la mezcla maestra

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

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

Nota: La mezcla maestra rehidratada se puede conservar a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C) durante un máximo de 2 horas

Procedimiento de configuración de la RT-PCR

1. Añada 15 µl de la mezcla maestra rehidratada a cada uno de los pocillos de la placa o los tubos.
2. En el caso de los tubos de microcentrifugadora, agite en vórtex cada tubo durante 10 segundos antes de añadirlo a la placa. Compruebe que todo el precipitado haya vuelto a la solución. Añada 5 µl de la muestra procesada (muestra con el control del proceso) al pocillo de la placa o el tubo de PCR. No es necesario mezclar los reactivos.
Nota: Use una punta nueva de micropipeta con barrera con cada una de las muestras extraídas.
Nota: El agitado en vórtex y la transferencia de 5 µl del tubo deben realizarse individualmente. El agitado en vórtex de los tubos antes de la transferencia no puede hacerse por lotes.
3. Para una placa de microvaloración de pocillos profundos, pipetee cada pocillo hacia arriba y hacia abajo tres veces para mezclar. La pipeta debe fijarse en 150 µl. Transfiera inmediatamente 5 µl de la muestra procesada a la placa o tubo de PCR.
Nota: Use una punta nueva de micropipeta con barrera con cada una de las muestras extraídas.
Nota: El mezclado y la transferencia de 5 µl de cada pocillo deben realizarse individualmente. La mezcla de todos los pocillos en la placa antes de la transferencia no se puede hacer por lotes.
4. Selle la placa o los tubos.
5. Centrifugue la placa durante al menos 15 segundos. Asegúrese de que todo el líquido esté en la parte inferior de los pocillos de la placa y que no haya burbujas.
Nota: Los tubos que se usan en Qiagen Rotor-Gene Q no requieren un paso de centrifugación antes de cargarlos en el instrumento.
6. Encienda el termociclador adecuado.
7. Introduzca la placa o los tubos en el termociclador apropiado.

Nota: Consulte el anexo (página 16) para conocer los protocolos de programación y análisis específicos de cada termociclador.

CONTROL DE CALIDAD

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

1. El **Control del proceso** (PRC) consiste en un bacteriófago MS2 inactivado y estabilizado que contiene un genoma de ARN y se incluye en el tampón de proceso. El PRC sirve para monitorear los inhibidores de la muestra extraída y garantiza que se ha realizado la amplificación adecuada.
2. El **Control positivo** (con ARN sintético de SARS-CoV-2, Pieza M5274) se debe tratar como una muestra de un paciente, y debe incluirse en cada extracción y análisis por RT-PCR. El control positivo puede sumergirse colocando un hisopo nasofaríngeo seco en el control durante diez segundos y, a continuación, haciéndolo girar enérgicamente durante 10 segundos en un tampón de proceso alicuotado o pueden transferirse 50 µl a un tampón de proceso alicuotado.
3. El **Control negativo** (Pieza M5275) se debe tratar como una muestra de un paciente, y se debe incluir en cada extracción y análisis por RT-PCR. El control negativo puede sumergirse colocando un hisopo nasofaríngeo seco en el control durante diez segundos y, a continuación, haciéndolo girar enérgicamente durante 10 segundos en un tampón de proceso alicuotado o pueden transferirse 50 µl a un tampón de proceso alicuotado.
4. La falta de aprobación del **control positivo** o el **control negativo** invalida el análisis por RT-PCR y no deben notificarse los resultados. El análisis de RT-PCR se debe repetir con los controles y muestras extraídos primero. Vuelva a extraer y analizar otra alícuota de los controles y las muestras u obtenga nuevas muestras y repita el análisis si los controles tampoco superan el análisis esta vez.

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

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

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

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

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES

Interpretación de los resultados del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay en Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Bio-rad Cfx96, Qiagen Rotor-Gene Q o ThermoFisher QS7				
Resultado del análisis	Detector: SARS-CoV-2	Detector: Control del proceso	Interpretación de los resultados	Notas y orientación especial
Negativo	Ningún valor de Ct detectado	$5,0 \leq Ct \leq 30,0$	No se ha detectado ARN vírico de SARS-CoV-2; PRC detectado.	
SARS-CoV-2 positivo	$5,0 \leq Ct \leq 30,0$ ¹	NC ²	Se ha detectado ARN vírico de SARS-CoV-2.	
No válido	Ningún valor de Ct detectado	Ningún valor de Ct detectado	No se ha detectado ningún ARN vírico de SARS-CoV-2 ni ARN de PRC.	Prueba no válida. Vuelva a analizar la misma muestra procesada. Si la prueba tampoco es válida, obtenga una muestra nueva y vuelva a analizarla.
Interpretación de los resultados del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay Resultados en el Roche LightCycler 480 y Roche Cobas z480				
Resultado del análisis	Detector: SARS-CoV-2	Detector: Control del proceso	Interpretación de los resultados	Notas y orientación especial
Negativo	Ningún valor de Ct detectado	$5,0 \leq Ct \leq 40,0$	No se ha detectado ARN vírico de SARS-CoV-2; PRC detectado.	
SARS-CoV-2 positivo	$5,0 \leq Ct \leq 40,0$ ¹	NC ²	Se ha detectado ARN vírico de SARS-CoV-2.	

Interpretación de los resultados del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay en Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Bio-rad Cfx96, Qiagen Rotor-Gene Q o Thermofisher QS7				
Resultado del análisis	Detector: SARS-CoV-2	Detector: Control del proceso	Interpretación de los resultados	Notas y orientación especial
No válido	Ningún valor de Ct detectado	Ningún valor de Ct detectado	No se ha detectado ningún ARN vírico de SARS-CoV-2 ni ARN de PRC.	Prueba no válida. Vuelva a analizar la misma muestra procesada. Si la prueba tampoco es válida, obtenga una muestra nueva y vuelva a analizarla.

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

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

RENDIMIENTO CLÍNICO

El rendimiento clínico del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay se evaluó mediante dos estudios de muestras positivas totalmente artificiales elaboradas utilizando hisopos nasofaríngeos y muestras orofaríngeas y un estudio prospectivo utilizando hisopos nasales equivalentes.

Estudio 1

Se crearon treinta (30) muestras positivas artificiales de NF mediante la adición de treinta (30) muestras clínicas individuales que se determinó que eran negativas para el SARS-CoV-2 mediante el Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. Las muestras enriquecidas se agregaron a los hisopos (aproximadamente 50 µl) y luego se procesaron y analizaron de acuerdo con el prospecto del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. Se enriquecieron veinte (20) muestras con 1 × LoD (3,40e+4 cp/ml) de virus. Se enriquecieron diez (10) muestras adicionales con 5 × LoD (1,7E+5 cp/ml) de virus.

Con el Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay, se obtuvo un resultado positivo en veintinueve (29) de las treinta (30) muestras artificiales. Los resultados de las muestras positivas artificiales se presentan en la tabla siguiente:

Evaluación clínica en muestras de exudados nasofaríngeos enriquecidas			
Concentración de ARN de las muestras	N.º positivas/n.º analizadas	Valor medio de Ct de SARS-CoV-2	% CV
No enriquecida	0/30	NC	NC
1 x LoD	19/20	27,06	6,6
5 x LoD	10/10	23,51	4,7

El rendimiento en comparación con los resultados previstos es:

Concordancia porcentual positiva 29/30 = 97 % (IC del 95 %: 83,3 % al 99,4 %)

Conformidad porcentual negativa 30/30 = 100 % (IC del 95 %: 88,6 % al 100 %)

Estudio 2

Se crearon quince (15) muestras positivas artificiales OF mediante la adición de quince (15) muestras clínicas individuales que se determinó que eran negativas para el SARS-CoV-2 mediante el Lyra SARS-CoV-2 Assay. Las muestras enriquecidas se agregaron a los hisopos (aproximadamente 50 µl) y luego se procesaron y analizaron de acuerdo con el prospecto del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. Siete (7) muestras se enriquecieron con 1 × LoD (3,40e+4 cp/ml), cuatro (4) muestras, con 10 × LoD (3,4e+5 cp/ml) y cuatro (4) muestras, con 100 × LoD (3,4e+6 cp/ml) del virus. Se analizaron ocho (8) muestras OF negativas más, mediante el Lyra SARS-CoV-2 Assay, conforme al prospecto del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay.

Con el Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay, se obtuvo un resultado positivo en quince (15) de las quince (15) muestras artificiales. Los resultados de las muestras OF se presentan en la tabla siguiente:

Evaluación clínica en muestras de exudados OF enriquecidas			
Concentración de ARN de las muestras	N.º positivas/n.º analizadas	Valor medio de Ct de SARS-CoV-2	% CV
No enriquecida	0/8	NC	NC
1 x LoD	7/7	23,2	5,1
10 x LoD	4/4	20,1	0,6
100 x LoD	4/4	17,1	0,5

El rendimiento en comparación con los resultados previstos es:

Conformidad porcentual positiva 15/15 = 100 % (IC del 95 %: 79,6 % al 100 %)

Conformidad porcentual negativa 8/8 = 100 % (IC del 95 %: 67,6 % al 100 %)

Estudio 3

Se realizó un estudio prospectivo que comparó el Lyra Direct SARS-CoV-2 assay con un ensayo molecular autorizado por la AUE. Se analizaron ciento ochenta y una (181) muestras nasales equivalentes simultáneamente con ambos dispositivos de acuerdo con sus respectivos prospectos. Las muestras se obtuvieron de tres ubicaciones y se enviaron con bolsas frías para su análisis. Los exudados nasales se aleatorizaron, procesaron y analizaron con ambos dispositivos.

Tres (3) muestras (1,7 %) no eran válidas en el Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay y hubo que retirarlas de los análisis posteriores. Los datos correspondientes a las restantes ciento setenta y ocho (178) muestras se indican en la siguiente tabla.

Comparación del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay con el ensayo SARS-CoV-2 extraído de referencia								
	Comparador de RT-PCR de SARS-CoV-2				IC del 95 %			
		POS	NEG	Total	PPA	96,0 %	86,5 %	98,9 %
Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay	POS	48	0	48	NPA	100,0 %	97,1 %	100,0 %
	NEG	2	128	130	PPV	100,0 %	92,6 %	100,0 %
	Total	50	128	178	NPV	98,5 %	94,6 %	99,6 %

RENDIMIENTO ANALÍTICO

Límite de detección

Estudio 1

El límite de detección (LoD) del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay utilizó diluciones limitantes de coronavirus 2 relacionado con el SRAG irradiado por rayos γ (SARS-CoV-2) que se agregaron a la matriz nasofaríngea negativa en tampón. Cada dilución se agregó a los hisopos (aproximadamente 50 μ l), luego se procesó de acuerdo con el prospecto del ensayo y se analizó en 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 sensibilidad analítica (LoD) se define como la concentración más baja para la que al menos el 95 % de todos los duplicados tuvieron un resultado analítico positivo.

Este estudio estableció el LoD del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay como se indica a continuación, confirmado posteriormente mediante el análisis de 20 duplicados.

Se realizaron análisis confirmación de los resultados del LoD en Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Roche LightCycler 480 y cobas z 480, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96 Touch o Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro

Termocicladores	Hisopos NF - 7500 Fast Dx	Hisopos NF - 7500 Standard	Hisopos NF - LightCycler 480 ²	Hisopos NF - cobas z 480 ²	Hisopos NF - CFX96 Touch	Hisopos NF - Rotor-Gene Q	Hisopos NF - QuantStudio 7 Pro
Concentración ¹	3,40E+04	3,40E+04	3,40E+04	3,40E+04	3,40E+04	3,40E+04	6,80E+04
COVID-19							
PROM general	25,85	28,48	33,87	33,55	25,10	26,89	26,47
DE general	1,25	0,95	1,55	1,19	1,06	1,24	0,77
% CV general	4,8 %	3,3 %	4,6 %	3,6 %	4,2 %	4,6 %	2,9 %
Detección	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
PRC							
PROM general	21,69	20,03	21,96	23,98	17,85	19,79	23,20
DE general	0,68	0,20	1,13	1,07	1,29	0,33	0,75
% CV general	3,1 %	1,0 %	5,1 %	4,5 %	7,2 %	1,6 %	3,2 %
Detección	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20

¹ La concentración se presenta en copias de ARN/ml

² Los resultados incluyen 10 ciclos que no se registran con otros instrumentos

Estudio 2 – Estudio comparativo del LoD para el Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay y el Lyra SARS-CoV-2 Assay

Se realizó un segundo estudio del LoD para comparar el límite de detección (LoD) del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay y el Lyra SARS-CoV-2 Assay en el ABI 7500 Fast Dx usando diluciones limitantes del virus SARS-CoV-2 irradiado por rayos γ. En este estudio se inoculó en un hisopo NF una concentración de 1 × LoD (basándose en las pruebas preliminares) del virus en una matriz NF negativa. Se analizaron directamente veinte (20) duplicados de los hisopos inoculados de acuerdo con el IP para el Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay o se agregaron a 3,0 ml de UTM para analizarlos en el Lyra SARS-CoV-2 Assay (cuarenta duplicados de hisopos en total). Los análisis se realizaron utilizando el ABI 7500 Fast Dx.

Resultados del estudio de confirmación del LoD

Análisis de extracto en Lyra	1,28E+04 cp/ml	
	Duplicado	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

Análisis de extracto en Lyra	1,28E+04 cp/ml	
Duplicado	SARS-CoV-2	PRC
20	24,40	19,47
% de detectados	100 %	100 %
Promedio de positivos	24,93	19,16
DE de positivos	0,92	0,44
% CV	3,7 %	2,3 %

Lyra Direct Assay	1,28E+04 cp/ml	
Duplicado	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
17	24,72	18,35
18	24,26	18,30
19	24,70	18,45
20	26,59	18,31
% de detectados	100 %	100 %
Promedio de positivos	24,49	18,07
DE de positivos	1,23	0,31
% CV	5,0 %	1,7 %

Según el diseño de este estudio, el LoD de las dos versiones del Lyra Assay (Lyra SARS-CoV-2 Assay y Lyra Direct SARS-CoV-2) tienen un LoD de entrada de $1,28 \times 10^4$ equivalentes de genoma/ml. Debe tenerse en cuenta que el LoD publicado para el Lyra SARS-CoV-2 Assay (8,00E-01 copias de ARN genómico/ μ l) es exacto. La concentración final del virus analizado en el ensayo, tras su dilución en 3,0 ml de UTM y la concentración durante el proceso de extracción, es de aproximadamente 800 cp/ml.

REACTIVIDAD ANALÍTICA (INCLUSIVIDAD)

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

La inclusividad del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay se estableció mediante un análisis informático de las secuencias de SARS-CoV-2 disponibles. A fecha de 22 de abril de 2021, en las bases de datos de GISAID y NCBI se disponía de un total de 1 378 013 secuencias de SARS-CoV-2. De ellas, 1 356 832 (98,46 %) incluyen la región del amplicón (<5 bases de nucleótidos indefinidos en alguna región oligonucleotídica) y se conservan entre un 71,43-100 % en los oligonucleótidos del Lyra Direct SARS-CoV-2. El número de secuencias que se conserva entre un 100 % y ≥ 95 % en el conjunto de oligonucleótidos se resume en la tabla a continuación.

Base de datos	Secuencias disponibles	Secuencias que incluyen la región del amplicón	Secuencias con el 100 % de homología con el conjunto de oligonucleótidos	Secuencias con ≥ 95 % de homología con el conjunto de oligonucleótidos
GISAID	1 183 880	1 165 604	1 159 422	1 165 595
NCBI	194 133	191 228	189 505	191 228

La inclusividad del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay con siete (7) variantes publicadas (variante B.1.1.7 [VUI202012/01], variante B.1.351 [501Y.N2], variante P.1 [501Y.V3], variante B.1.429+B.1.427 [452R.V1], variante B.1.525 [484K.V3], variante B.1.526 [NY] y variante B.1.617 [doble mutante india]) se estableció a través de un análisis informático de las secuencias de SARS-CoV-2 disponibles. Todas las secuencias se conservan entre un 90,48 % y un 100 % en los oligonucleótidos del Lyra Direct SARS-CoV-2. El número de secuencias variantes que se conservan entre un 100 % y ≥ 95 % en el conjunto de oligonucleótidos se resumen en la tabla a continuación.

Base de datos	Variante	Secuencias disponibles	Secuencias que incluyen la región del amplicón	Secuencias con el 100 % de homología con el conjunto de oligonucleótidos	Secuencias con ≥ 95 % de homología con el conjunto de oligonucleótidos
GISAID	B.1.1.7 (VUI202012/01)	399 189	395 236	394 338	395 235
	Variante SA B.1.351 (501Y.N2)	10 658	10 436	10 385	10 436
	Variante P.1 (501Y.V3)	4735	4696	4688	4696
	Variante B.1.429+B.1.427 (452R.V1)	30 306	30 107	29 981	30 103
	Variante B.1.525 (484K.V3)	1882	1860	1853	1860
	Variante B.1.526 (NY)	8793	8771	8176	8771
	Variante B.1.617 (doble mutante india)	862	850	843	850

52 variantes B.1.1.7 tienen un SNP alineado en el extremo 3' de un cebador. Se pidió una secuencia de ARN que representaba una secuencia variante del Reino Unido con el SNP y otra que representaba una secuencia de control (MN908947.3) y se analizaron en el ensayo Lyra SARS-CoV-2. Ambos moldes de ARN dieron resultados comparables, lo que indica que el SNP alineado en el extremo 3' no interfiere en la detección. Este resultado se correlaciona con estudios anteriores sobre SNP alineados con el extremo 3' de un cebador para Lyra.

ESPECIFICIDAD ANALÍTICA (REACTIVIDAD CRUZADA)

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

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

El análisis informático se centró en treinta y dos (32) microorganismos identificados por la FDA como de alta prioridad para su evaluación debido a su posible presencia en muestras de las vías respiratorias altas.

Microorganismos con reactividad cruzada			
Microorganismo	N.º total de secuencias	N.º de genomas completos	N.º de cepas WGS
Adenovirus	532	532	0
Coronavirus (estacional)	288	288	0
Enterovirus ^B	2708	2674	34
Virus de la gripe A ^{A B}	172 455	21 444 (+39 A/México/4108/2009)	108
Virus de la gripe B ^{A B}	53 952	6755 (+16 B/Florida/4/2006)	0
Virus de la gripe C ^B	2205	N/C	N/C
Metapneumovirus humano	145	145	0
Virus paragripal tipo 1-4	439	439	0

Microorganismos con reactividad cruzada			
Microorganismo	N.º total de secuencias	N.º de genomas completos	N.º de cepas WGS
Parecovirus humano	124	124	0
Virus sincicial respiratorio humano ^B	1275	1275	0
Rinovirus	214	214	0
SARS-1	236 ^C	232 (+4 secuencias pp1ab)	0
<i>Bacillus anthracis</i>	4152	69	86
<i>Candida albicans</i>	1541	59	34
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	466	5	20
<i>Chlamydia psittaci</i>	11 179	23	45
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	20 797	17	194
<i>Coxiella burnetii</i>	419	28	3
<i>Haemophilus influenzae</i>	45 267	61	692
Legionella ^B	4843	98	65
Leptospira ^B	64 456	133	266
<i>Moraxella catarrhalis</i> ^B	8333	11	184
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	194	194	0
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	808	51	45
<i>Neisseria elongata</i> y <i>N. meningitidis</i> ^B	312 050	116	1318
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	487	15	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	195	195	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	634	634	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ^B	61 880	23	508
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ^B	1 633 369	107	8526
<i>Streptococcus pyogenes</i> ^B	46 153	201	1733
<i>Streptococcus salivarius</i> ^B	9417	18	48

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

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

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

El análisis informático demostró una homología <80 % con todos los microorganismos excepto los siguientes: tres (3) tres secuencias de Enterovirus se conservan en un 80,9 % para el cebador inverso; sin embargo, el cebador directo solo se conserva en un 76 % y la alineación de la sonda tuvo un homología global del 56 %. Las secuencias de SARS-1 se conservan en ≥80 % con ambos cebadores; sin embargo, la última base en los extremos 3' de ambos cebadores no se conserva. El análisis en húmedo de la única cepa de SARS-1 disponible utilizando el Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay fue indetectable.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Se llevó a cabo un estudio para demostrar que las sustancias potencialmente interferentes que pueden encontrarse en las vías respiratorias superiores no producen ninguna interferencia ni ninguna reacción cruzada en la detección del ARN del SARS-CoV-2 en el Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay.

Se analizaron catorce (14) sustancias potencialmente interferentes en la concentración indicada a continuación, en la ausencia o presencia de SARS-CoV-2.

Lista de sustancias para el estudio de interferencias		
Sustancias	Principio activo	Concentración estudiada
Aerosol nasal Afrin	Oximetazolina	5 %
Sangre (humana)	Sangre	5 %
Chloraseptic y Cepacol	Benzocaína y Mentol	0,7 g/ml
Flonasa	Fluticasona	5 %
Halls Relief (sabor cereza)	Mentol	0,8 g/ml
Nasocort Allergy 24 horas	Triamcinolona	5 %
Neo-Sinefrina	Clorhidrato de fenilefrina	5 %

Lista de sustancias para el estudio de interferencias		
Sustancias	Principio activo	Concentración estudiada
Oseltamivir	Oseltamivir	2,2 µg/ml
Proteína de mucina purificada	Proteína de mucina	2,5 mg/ml
Rinocort	Budesonida (glucocorticoide)	5 %
Aerosol nasal de solución salina	Solución salina	15 %
Tobramicina	Tobramicina	1,25 mg/ml
Zanamivir	Zanamivir	282,0 ng/ml
Zicam remedio para el resfrío	Galphimia glauca, Luffa operculata, Sabadilla	5 %

Ninguna de las catorce (14) sustancias potencialmente interferentes analizadas en el estudio demostró reactividad cruzada ni interferencia.

LIMITACIONES

- En este análisis no pueden utilizarse las muestras en medios de transporte.
- Los resultados negativos no excluyen una infección por el SARS-CoV-2 y no deben utilizarse como la única base para una decisión sobre el tratamiento del paciente.
- Los resultados negativos deben tratarse como supuestos y confirmarse con un ensayo molecular autorizado por la FDA que incluya un paso de lisis química seguido de una extracción en fase sólida de ácido nucleico, si fuera necesario, para el tratamiento clínico.
- El rendimiento de este análisis se evaluó usando muestras de exudados nasofaríngeos y orofaríngeos. Los exudados nasales y los hisopos nasales del cornete nasal medio (obtenidos por el propio paciente bajo supervisión u obtenidos por un profesional sanitario) también se consideran tipos de muestras aceptables para su uso con el Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay.
- Los procedimientos inadecuados de obtención, conservación o transporte de las muestras pueden provocar resultados falsos negativos.
- Los inhibidores presentes en la muestra y/o los errores en el seguimiento del procedimiento del análisis pueden provocar resultados falsos negativos.
- Un profesional sanitario con formación debe interpretar los resultados del análisis junto con los antecedentes médicos, los signos clínicos y los síntomas del paciente, así como los resultados de otras pruebas diagnósticas.
- Pueden persistir analitos diana (secuencias virales) *in vivo*, con independencia de la viabilidad del virus. La detección de analitos diana no implica que los virus correspondientes sean infecciosos ni que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos.
- Existe un riesgo de valores falsos positivos como resultado de contaminación cruzada por microorganismos diana, sus ácidos nucleicos o producto amplificado, o de señales no específicas en el análisis.
- Existe un riesgo de valores falsos negativos debido a la presencia de variantes de secuencia en las dianas virales del análisis.
- No se han estipulado los resultados del análisis en pacientes inmunodeprimidos.
- No se ha establecido el rendimiento clínico en todas las variantes en circulación, pero se prevé que refleje las variantes prevalentes en circulación en el momento y el lugar de la evaluación clínica. El rendimiento en el momento de la prueba puede variar dependiendo de las variantes en circulación, como las nuevas cepas emergentes del SARS-CoV-2 y su prevalencia, que cambian a lo largo del tiempo.

SERVICIO DE ATENCIÓN AL CLIENTE Y SERVICIO TÉCNICO

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

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

PROPIEDAD INTELECTUAL

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

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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 de marzo de 2020.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Viral Culture; Approved Guidelines. CLSI document M41-A [ISBN 1562386239] Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2006.
3. Lauer, S.A., et. al. The incubation period of Coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application, Ann Intern Med. 2020
4. www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html

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

Instrucciones de programación del Applied Biosystems 7500 Fast Dx

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

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

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

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

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

- i. Introduzca la siguiente información para cada detector.

Nombre	Colorante indicador	Colorante de extinción	Color
SARS-CoV-2	FAM	(ninguno)	(Seleccionar)
PRC	Cy5	(ninguno)	(Seleccionar)

- ii. Seleccione un único color para representar cada uno de los detectores.
 - iii. Resalte los detectores nuevos y añádalos a la columna **Detectors in Document** (detectores en el documento) utilizando el botón **Add** (añadir).
 - iv. Seleccione **(none)** (ninguno) en el menú desplegable **Passive reference** (referencia pasiva).
 - v. Seleccione el botón **Next** (siguiente).
 - vi. Seleccione el botón **Finish** (terminar) sin configurar ninguno de los pocillos.
- c. El asistente se cerrará y se abrirá el software, comenzando con la pestaña **Setup** (Configuración). Esto mostrará la placa de muestras que se configuró durante el inicio rápido. Para la configuración inicial, no es necesario cambiar nada.
 - d. Definición del protocolo del termociclador: seleccione la pestaña **Instrument** (instrumento) para configurar las temperaturas y los tiempos de los ciclos de RT-PCR del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. En **Thermal Profile** (perfil térmico) debe haber un protocolo predeterminado de 2 fases. Cada fase tendrá 3 cuadros de texto modificables por el usuario. El valor del cuadro superior representa el número de repeticiones o ciclos para esa fase. El valor del cuadro central representa la temperatura (°C) y el valor del cuadro inferior representa el tiempo (minutos: segundos).

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

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

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

3. Fase 2
 - a. Repetic.: 1
 - b. Temp.: 60
 - c. Tiempo: 5:00
4. Seleccione la barra entre la Fase 2 y la Fase 3. Seleccione el botón **Add Hold** (añadir espera) para añadir otra fase.
5. Fase 3
 - a. Repetic.: 1
 - b. Temp.: 65
 - c. Tiempo: 5:00
6. Fase 4 (fase de disociación en 2 pasos)
 - a. Repet.: 10
 - b. Paso 1
 - i. Temp.: 92
 - ii. Tiempo: 0:05
 - c. Paso 2
 - i. Temp.: 57
 - ii. Tiempo: 0:40
7. Seleccione la barra a la derecha de la Fase 4. Seleccione el botón **Add Cycle** (añadir ciclo) para añadir otra fase.
8. Fase 5 (fase de disociación en 2 pasos)
 - a. Repet.: 30
 - b. Paso 1
 - i. Temp.: 92
 - ii. Tiempo: 0:05
 - c. Paso 2
 - i. Temp.: 57
 - ii. Tiempo: 0:40
9. Si se añade una fase equivocada, la fase se puede eliminar pulsando el botón **Delete** (eliminar) después de resaltar la fase entre las líneas verticales.

- ii. En **Settings** (configuración), introduzca lo siguiente:

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

- e. Configure el umbral de cada analito.
 - i. Seleccione la pestaña **Results** (resultados).
 - ii. Seleccione la pestaña **Amplification Plot** (diagrama de amplificación).
 - iii. Seleccione SARS-CoV-2 en la pestaña Detector (detector) en la esquina superior derecha.
 - iv. En el bloque **Analysis Settings** (configuración de análisis), configure el **Threshold** (umbral) en **7,5e+004**.
 - v. Seleccione el botón **Manual Baseline** (punto de referencia manual).
 - vi. Escriba "3" para el inicio y "15" para el fin.
 - vii. Seleccione PRC en la pestaña Detector (detector) en la esquina superior derecha.
 - viii. En el bloque **Analysis Settings** (configuración de análisis), configure el **Threshold** (umbral) en **1,0e+004**.
 - ix. Seleccione el botón **Manual Baseline** (punto de referencia manual).
 - x. Escriba "3" para el inicio y "15" para el fin.
- f. Guarde el nuevo protocolo como una plantilla para su uso futuro.
 - i. En la parte superior de la pantalla, seleccione **File** (archivo) y después **Save As (guardar como)**.
 - ii. **Guardar en:** D:\Applied Biosystems\7500 Fast System\Templates\
 - iii. **Nombre del archivo:** "Lyra Direct SARS-CoV-2"
 - iv. **Guardar como tipo:** "SDS Templates (*.sdt)"
- g. Salga del software.

Procedimiento de prueba del termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Dx

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

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

5. Configuración de la placa de muestras
 - a. En las pestañas **Setup** (configuración) y **Plate** (placa), aparecerá la configuración de la placa.
 - b. Seleccione todos los pocillos que contengan muestra, haga clic con el botón derecho y seleccione **Well Inspector** (inspector de pocillos) en el menú desplegable. Cuando se abra la ventana emergente **Well Inspector** (inspector de pocillos), seleccione los detectores de SARS-CoV-2 y el PRC.
 - c. Use el **Well Inspector** (inspector de pocillos) para introducir los nombres de las muestras. Puede introducir la identificación de los pacientes en la ventana Well Inspector (inspector de pocillos). Sin embargo, se recomienda realizar esto antes de volver a suspender la mezcla maestra liofilizada, después del análisis o antes de utilizar la función de importación para minimizar el tiempo en que las reacciones de PCR estarán a temperatura ambiente antes de iniciar el análisis.
 - d. Guarde el análisis como **AAMMDD- Lyra Direct SARS-CoV-2.sds**.
 - e. Se abrirá una ventana, "Reason for change of entry", preguntándole por el motivo del cambio de la información. Introduzca **"Setup"** (configuración) y cualquier otro comentario pertinente para el análisis.
6. Inicio de la PCR
 - a. Seleccione la pestaña **Instrument** (instrumento).
 - b. Introduzca en el instrumento la placa de PCR de 96 pocillos.
 - c. En **Instrument Control (control del instrumento)**, seleccione el botón **Start** (inicio) para iniciar el análisis.
7. Después de la PCR
IMPORTANTE: cuando haya terminado el análisis, pulse OK (aceptar).
 - a. Analice los datos pulsando el botón **"Analyze"** (analizar) en el menú superior, y guarde el archivo.
 - b. Guarde el archivo pulsando **Save Document** (guardar documento) en la barra de tareas. Se abrirá una ventana, "Reason for change of entry", preguntándole por el motivo del cambio de la información.
 - c. Introduzca **"Data analysis post run"** (análisis de datos posterior al análisis) y cualquier otro comentario pertinente para el análisis.
8. Interpretación de los resultados (véase la Tabla 5).

Instrucciones de programación de Applied Biosystems 7500 Standard

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

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

Nombre	Colorante indicador	Colorante de extinción	Color
SARS-CoV-2	FAM	(ninguno)	(Seleccionar)
PRC	Cy5	(ninguno)	(Seleccionar)

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

- d. Paso 2
 - i. Tasa de rampa: 100 %
 - ii. Temp.: 57
 - iii. Tiempo: 0:40
 - iv. Asegúrese de que la recogida de datos se haya encendido para este paso (configuración por defecto).
8. Si se añade una fase equivocada, la fase se puede eliminar pulsando el botón **Undo “Add Stage”** (deshacer “Añadir fase”) inmediatamente después de añadir o resaltar la fase entre las líneas verticales y seleccione el botón **Delete Selected** (eliminar seleccionados).
5. Configure el umbral de cada analito.
 - a. Seleccione la pestaña **Analysis** (análisis) en el menú superior izquierdo.
 - b. Seleccione el botón **Analysis Settings** (configuración de análisis) en la esquina superior derecha.
 - c. Resalte SARS-CoV-2 y deseccione la casilla **Use Default Settings** (usar configuración por defecto). Deseccione **Automatic Threshold** (umbral automático) y cambie el umbral a 75 000. Deseccione **Automatic Baseline** (punto de referencia automático). Escriba 3 para **Baseline Start Cycle** (ciclo del inicio del punto de referencia) y escriba 15 para **End Cycle** (ciclo de fin) haciendo clic en el botón “Analysis Settings” (configuración de análisis) en la esquina superior derecha.
 - d. Resalte PRC y deseccione la casilla **Use Default Settings** (usar configuración por defecto). Deseccione **Automatic Threshold** (umbral automático) y cambie el umbral a 10 000. Deseccione **Automatic Baseline** (punto de referencia automático). Escriba 3 para **Baseline Start Cycle** (ciclo del inicio del punto de referencia) y escriba 15 para **End Cycle** (ciclo de fin) haciendo clic en el botón “Analysis Settings” (configuración de análisis) en la esquina superior derecha.
 - e. En la parte inferior de la casilla, seleccione el botón **Apply Analysis Settings** (aplicar la configuración de análisis).

Diana	Umbral	Inicio del punto de referencia	Final del punto de referencia
SARS-CoV-2	75 000	3	15
PRC	10 000	3	15

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

Procedimiento de prueba del termociclador Applied Biosystems 7500 Standard

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

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

5. Configuración de la placa de muestras
 - a. En las pestañas **Setup** (configuración) y **Plate** (placa), aparecerá la configuración de la placa.
 - b. Seleccione todos los pocillos que contengan muestra, haga clic con el botón derecho y seleccione **Well Inspector** (inspector de pocillos) en el menú desplegable. Cuando se abra la ventana emergente **Well Inspector** (inspector de pocillos), seleccione los detectores de SARS-CoV- 2 y el PRC.

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

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

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

Procedimiento de programación del termociclador Bio-Rad CFX96 Touch

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

Instrucciones de programación:

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

- iii. Resalte el **paso 5** y configúrelo como se indica a continuación:
 - 1. Temp.: 57 °C
 - 2. Tiempo: 0:40
 - 3. Vaya a la izquierda de la pantalla y seleccione el botón **Remove Plate Read** (eliminar lectura de la placa).
 - iv. Seleccione el **paso 6**, el **paso GOTO** y cambie al estado **paso GOTO 4** y cambie las veces que debe repetirse a **9**
 - g. **Paso 7** (fase de amplificación en 2 pasos)
 - i. Con el paso 6 resaltado, seleccione el botón **Insert Step** (insertar paso) en la parte inferior izquierda de la ventana un total de 2 veces (hasta alcanzar el paso 8).
 - ii. Resalte el **paso 7** y configúrelo como se indica a continuación:
 - 1. Temp.: 92 °C
 - 2. Tiempo: 0:05
 - iii. Resalte el **paso 8** y configúrelo como se indica a continuación:
 - 1. Temp.: 57 °C
 - 2. Tiempo: 0:40
 - 3. A la izquierda de la ventana, seleccione el botón **Add Plate Read to Step** (añadir lectura de la placa al paso).
 - 4. Resalte el **paso 8** y seleccione el botón **Insert GOTO** (insertar GOTO) en la parte inferior izquierda de la ventana.
 - iv. Seleccione el **paso 9**, el **paso GOTO** y cambie al estado **paso GOTO 7** y cambie las veces que debe repetirse a **29**.
 - h. Guarde las nuevas condiciones de ciclado como protocolo para su uso futuro.
 - i. En la parte superior izquierda de la pantalla, seleccione el botón **Save** (guardar).
 - ii. Guarde en la carpeta **ExpressLoad** (carga rápida)
 - iii. **Nombre** el archivo "Lyra Direct SARS-CoV-2"
 - iv. **Guarde como tipo** "Protocol File (*.prcl)"
 - v. Seleccione **Save** (guardar)
 - vi. Haga clic en **Ok** (aceptar) en la ventana del editor de protocolo.
- 6. Defina la configuración de la placa.
 - a. En la ventana **Run Setup** (configuración del análisis), seleccione la pestaña **Plate** (placa).
 - b. En **Express Load** (carga rápida) en el menú desplegable, seleccione la opción **Quick Plate 96 wells All Channels.pltd**
 - c. Seleccione el botón **Edit Selected** (editar lo seleccionado) para personalizar la configuración de la placa.
 - d. En la barra de herramientas superior, seleccione **Settings** (configuración). Es preciso configurar los ajustes por defecto.
 - i. En **Plate Size** (tamaño de la placa), seleccione **96 pocillos**
 - ii. En **Plate Type** (tipo de placa), seleccione **BR Clear** (BR transparente).
 - iii. En **Number Convention (convención numérica)**, seleccione **Scientific Notation (notación científica)**.
 - iv. En **Units (unidades)** seleccione **Copy Number (número de copias)**.
 - e. Deje el **Scan Mode** (modo de escaneo) configurado en **All Channels** (todos los canales) en la parte superior de la ventana.
 - f. Seleccione el botón **Select Fluorophores** (seleccionar fluoróforos) en la parte superior derecha de la ventana Plate Editor (editor de placas).
 - i. Deseleccione todos los fluoróforos predeterminados.
 - ii. Seleccione **FAM** y **Cy5** y haga clic en **Ok** (aceptar)
 - g. En la ventana **Plate Editor** (editor de placas), resalte la opción de placa completa y marque la casilla delante de todos los fluoróforos: **FAM** y **Cy5**
 - h. Seleccione el botón **Experiment Settings**(configuración del experimento) para definir las dianas.
 - i. En la parte inferior izquierda de la ventana **Experiment Settings** (configuración del experimento), en el recuadro **New** (nuevo), introduzca **SARS-CoV-2** y seleccione **Add** (añadir).
 - ii. Repita este proceso para el PRC.
 - iii. Seleccione **Ok** (aceptar)
 - i. En la ventana **Plate Editor** (editor de placas), junto a **FAM** en el menú desplegable bajo **Target Name** (nombre de la diana), seleccione **SARS-CoV-2** y para Cy5, seleccione **PRC**.

- j. Guarde la nueva configuración de la placa para su uso futuro.
 - i. En la parte superior izquierda de la pantalla, seleccione el botón **Save** (guardar).
 - ii. Guarde en la carpeta **ExpressLoad** (carga rápida)
 - iii. **Nombre** el archivo “Lyra Direct SARS-CoV-2 plate”
 - iv. **Guarde como tipo** “Plate File (*.pltd)”
 - v. Seleccione **Save** (guardar)
 - vi. Haga clic en **Ok** (aceptar) en la ventana **Plate Editor** (editor de placas).
- k. Salga del software.

Procedimiento de prueba del termociclador Bio-Rad CFX96 Touch

Instrucciones de análisis:

1. Abra el archivo de análisis que necesite analizarse.
2. En la parte superior izquierda, seleccione **Quantification Tab** (pestaña de cuantificación).
3. En la curva de amplificación, marque la casilla delante de **Log Scale** (escala logarítmica).
4. Seleccione **Settings** (configuración) en la barra de herramientas de la parte superior izquierda de la pantalla.
 - a. Para el **Cq Determination Mode** (modo de determinación de Cq), seleccione **Single Threshold** (umbral único).
 - b. En **Baseline Setting** (configuración de punto de referencia), elija **Baseline Subtracted Curve Fit** (ajuste de la curva con sustracción de punto de referencia).
 - c. Para **Analysis Mode** (modo de análisis), seleccione **Target** (diana).
 - d. En **Cycles to Analyze** (ciclos para análisis), seleccione 1-30 y, a continuación, haga clic en **Ok** (aceptar)
 - e. Es preciso configurar los ciclos y el umbral del punto de referencia para cada diana.
 - i. Asegúrese de que en el diagrama de amplificación solo esté seleccionada la **casilla de SARS-CoV-2 box**.
 - ii. Vaya a **Settings**(configuración) en la barra de herramientas y seleccione **Baseline Threshold** (umbral de punto de referencia).
 1. En la parte superior de la casilla, seleccione **Auto Calculated** (cálculo automático) para los **Baseline Cycles** (ciclos de punto de referencia).
 2. Para el **Single Threshold** (umbral único) en la parte inferior del cuadro, seleccione **User Defined** (definido por el usuario).
 - a. Ajústelo a **164**
 - b. Seleccione Ok (aceptar)
 - iii. **Desmarque** la casilla **SARS-CoV-2 box** y **marque** la **casilla PRC** en el diagrama de amplificación
 - iv. Vaya a **Settings**(configuración) en la barra de herramientas y seleccione **Baseline Threshold** (umbral de punto de referencia).
 1. En la parte superior de la casilla, seleccione **Auto Calculated** (cálculo automático) para los **Baseline Cycles** (ciclos de punto de referencia).
 2. Para el **Single Threshold** (umbral único) en la parte inferior del cuadro, seleccione **User Defined** (definido por el usuario).
 - a. Ajústelo a **25**.
 - b. Seleccione Ok (aceptar)
5. Salga del software.
6. Interpretación de los resultados (véase la Tabla 5)

Instrucciones de programación de Qiagen Rotor-Gene Q

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

Instrucciones de programación:

1. Inicie el paquete de software de Rotor-Gene Q.
2. En la ventana emergente **New Run** (nuevo análisis), seleccione la pestaña **Advanced** (avanzado) en la parte superior de la pantalla.
3. Seleccione **Empty Run** (análisis vacío) y, a continuación, **New** (nuevo) en la parte inferior derecha de la ventana emergente para iniciar el **Advanced Run Wizard** (asistente de análisis avanzado).
 - a. Seleccione el tamaño de rotor adecuado en **Advanced Run Wizard** (asistente de análisis avanzado), en la parte superior izquierda de la pantalla.
 - b. Haga clic en la casilla que indica **Locking Ring is Attached** (anillo de bloqueo colocado) y seleccione **Next** (siguiente).
 - c. Deje vacías las secciones **Operator** (operador) y **Notes** (notas).
 - d. Introduzca **20 ul** como **Reaction Volume** (volumen de reacción) en la parte inferior izquierda de la pantalla.

- e. Para el **Sample Layout** (diseño de la muestra), seleccione **1, 2, 3...** y, a continuación, seleccione **Next** (siguiente).
- f. En **Channel Setup** (configuración del canal), seleccione **Create New** (crear nuevo) para introducir información para cada detector.
 - i. En **Name** (nombre), introduzca **SARS-CoV-2**.
 - ii. En **Source (fuente)** seleccione 470 nm.
 - iii. En **Detector (detector)** seleccione 510 nm.
 - iv. No ajuste la configuración **Gain** (ganancia) predeterminada de 7, ya que se configurará en un paso posterior.
 - v. Seleccione **Ok** (aceptar)
- g. Repita el paso anterior seleccionando **Create New** (crear nuevo).
 - i. En **Name** (nombre), introduzca **PRC**.
 - ii. En **Source (fuente)** seleccione 625 nm.
 - iii. En **Detector (detector)** seleccione 660 nm.
 - iv. No ajuste la configuración **Gain** (ganancia) predeterminada de 7, ya que se configurará en un paso posterior.
 - v. Seleccione **Ok** (aceptar)
- h. Para configurar un perfil de ciclado, seleccione el botón **Edit Profile** en la mitad de la ventana.
 - i. En la ventana **Edit Profile** (editar perfil), vaya a la parte superior izquierda de la pantalla a **New** seleccione **Cycling**(ciclado) en el menú desplegable. Deberá aparecer una fase de espera y de ciclado de tres pasos.
 - ii. Modifique la fase de espera para tener una temperatura de **55 °C** y una duración de **5:00 minutos**.
 - iii. Seleccione el botón **Insert After** (insertar después) en la mitad de la ventana emergente y, a continuación, seleccione **New Hold at Temperature**(nueva espera en temperatura).
 - iv. Modifique la segunda fase de espera para tener una temperatura de **60 °C** y una duración de **5:00 minutos**.
 - v. Seleccione el botón **Insert After** (insertar después) en la mitad de la ventana emergente y, a continuación, seleccione **New Hold at Temperature** (nueva espera en temperatura) para insertar una tercera fase de espera.
 - vi. Modifique la tercera fase de espera para tener una temperatura de **65 °C** y una duración de **5:00 minutos**.
 - vii. Resalte la siguiente **fase de ciclado** y modifíquela de la siguiente manera:
 1. Este ciclo se repite **10** veces.
 2. Seleccione **Timed Step** (paso cronometrado) en el menú desplegable en la mitad izquierda de la pantalla.
 3. No seleccione **Long Range** (intervalo largo) ni **Touchdown** (con temperatura decreciente) en la parte izquierda de la pantalla.
 4. El primer paso:
 - a. **92 °C**
 - b. **5 segundos**
 - c. **No se adquiere**
 5. Seleccione el paso dos y configúrelo de la siguiente manera:
 - a. **57 °C**
 - b. **40 segundos**
 - c. **No se adquiere**
 6. Resalte el paso tres y elimínelo seleccionando el botón “-“ en la mitad de la ventana.
 7. Seleccione el botón **Insert After** (insertar después) en la mitad de la ventana emergente y, a continuación, seleccione **New Cycling** (nuevo ciclado).
 - viii. Resalte la segunda **fase de ciclado** y modifíquela de la siguiente manera:
 1. Este ciclo se repite **30** veces
 2. Seleccione **Timed Step** (paso cronometrado) en el menú desplegable en la mitad izquierda de la pantalla.
 3. No seleccione **Long Range** (intervalo largo) ni **Touchdown** (con temperatura decreciente) en la parte izquierda de la pantalla.
 4. El primer paso:
 - a. **92 °C**
 - b. **5 segundos**
 - c. **No se adquiere**

5. Seleccione el paso dos y configúrelo de la siguiente manera:
 - a. **57 °C**
 - b. **40 segundos**
 - c. Seleccione **Acquiring to Cycling A** (adquisición para el ciclado A).
 - i. En **Acquiring Channels** (canales de adquisición), resalte el nombre de canal por defecto (Verde) y seleccione el botón < para desplazarse a la lista de **Available Channels** (canales disponibles).
 - ii. En la lista de **Available Channels** (canales disponibles), seleccione **SARS-CoV-2** y seleccione el botón > para desplazarlo a la lista de **Acquiring Channels** (canales de adquisición).
 - iii. Repita el paso anterior para el **PRC** y, a continuación, seleccione **OK** (aceptar).
6. Resalte el paso tres y elimínelo seleccionando el botón “-“ en la mitad de la ventana.
 - ix. En la ventana **Edit Profile** (editar perfil), seleccione **OK** (aceptar).
- i. En la ventana **New Run Wizard** (nuevo asistente de análisis), seleccione **Gain Optimisation** (optimización de la ganancia).
 - i. En la mitad de la ventana **Auto-Gain Optimisation Setup** (configuración de optimización de ganancia automática), seleccione el menú desplegable en **Channel Settings** (configuración de canales) y seleccione **SARS-CoV-2**.
 - ii. Seleccione el botón **Add** (añadir) a la derecha.
 1. En la ventana **Auto-Gain Optimisation Channel Settings** (configuración de canales de optimización de la ganancia automática), asegúrese de que la **posición del tubo** de SARS-CoV-2 esté establecida en **1**. Esto requiere analizar un control positivo, con SARS-CoV-2 y PRC, en cada análisis de PCR y su colocación en el primer tubo. Si no se hace, puede provocar un ajuste incorrecto de la ganancia.
 2. Deje los valores de **Target Sample Range** (intervalo de la muestra diana) y **Acceptable Gain Range** (intervalo de ganancia aceptable) en los predeterminados, 5-10Fl y de -10 a 10, respectivamente.
 3. Seleccione **Ok** (aceptar)
 4. Repita los pasos 3. j. ii. 1-3. para el **PRC**
 - iii. En la ventana **Auto-Gain Optimisation Setup** (configuración de la optimización de ganancia automática) marque la casilla junto a **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (realizar optimización antes de la primera adquisición).
 - iv. Seleccione **Close** (cerrar)
- j. En la ventana **New Run Wizard** (nuevo asistente de análisis), seleccione el botón **Next** (siguiente).
- k. Guarde el nuevo protocolo como una plantilla para su uso futuro.
 - i. En la parte inferior derecha de la ventana, seleccione **Save Template** (guardar plantilla).
 - ii. **Guardar en:** C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates
 - iii. **Nombre del archivo:** “Lyra Direct SARS-CoV-2”
 - iv. **Guardar como tipo:** “Template (*.ret)”
- l. Salga del software.

Análisis de prueba de Qiagen Rotor-Gene Q

Instrucciones de análisis:

1. En el New Run Wizard (asistente de nuevo análisis), cargue la plantilla Direct SARS-CoV-2.
2. Pulse Start (inicio).
3. Abra el archivo de análisis que necesite analizarse.
4. En la barra de herramientas del menú superior, seleccione el **Analysis** (análisis)
 - a. Seleccione **Quantitation** (cuantificación) y, a continuación, **Cycling A. SARS-CoV-2** (ciclado A.SARS-CoV-2) y **Show** (mostrar).
 - b. Debe ajustarse el umbral para SARS-CoV-2.
 - i. En el botón más a la derecha de la pantalla en **CT Calculation** (cálculo de CT), introduzca **0,03** como **SARS-CoV-2 Threshold** (umbral de SARS-CoV-2).
 - ii. En el recuadro **Eliminate Cycles before** (eliminar ciclos antes de), asegúrese de introducir el valor por defecto de **1**.

- iii. Asegúrese de que el gráfico de amplificación esté ajustado en **Log Scale** (escala logarítmica) (el botón de conmutación de la parte inferior izquierda del gráfico indica Linear Scale [escala lineal] o Log Scale [escala logarítmica]).
 - c. Seleccione **Quantitation** (cuantificación) y, a continuación, **Cycling A. PRC** (ciclado A. PRC) y **Show** (mostrar).
 - d. Debe ajustarse el umbral para PRC
 - i. En el botón más a la derecha de la pantalla en **CT Calculation** (cálculo de CT), introduzca **0,05** como **PRC Threshold** (umbral de PRC).
 - ii. En el recuadro **Eliminate Cycles before** (eliminar ciclos antes de), asegúrese de introducir el valor por defecto de **1**.
 - iii. Asegúrese de que el gráfico de amplificación esté ajustado en **Log Scale** (escala logarítmica) (el botón de conmutación de la parte inferior izquierda del gráfico indica Linear Scale [escala lineal] o Log Scale [escala logarítmica]).
- 5. Interpretación de los resultados (véase la Tabla 5)

Instrucciones de programación de Roche LightCycler 480 Instrument II

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

Creación de una plantilla de análisis de LightCycler 480 Instrument II Assay

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

- iv. **Ajuste Ramp Rate** (tasa de rampa) ($^{\circ}\text{C/s}$) a 4,4.
- v. Para las fases 1-4, **Sec Target** (sec. diana) ($^{\circ}\text{C}$), **Step Size** (tamaño del paso) ($^{\circ}\text{C}$) y **Step Delay** (retraso del paso) (ciclos) se dejarán en 0.
- b. Resalte **Stage 2** (fase 2) en **Program Name** (nombre de programa) y cambie **Stage 2 Temperature Targets** (objetivos de temperatura para la fase 2) de la siguiente manera:
 - i. **Objetivo ($^{\circ}\text{C}$)** ajustado a **60**
 - ii. **En Acquisition Mode** (modo de adquisición) seleccione **none** (ninguno)
 - iii. **Ajuste Hold** (espera) (hh:mm:ss) a **5:00**.
 - iv. **Ajuste Ramp Rate** (tasa de rampa) ($^{\circ}\text{C/s}$) a 4,4.
- c. Resalte **Stage 3** (fase 3) en **Program Name** (nombre de programa) y cambie **Stage 3 Temperature Targets** (objetivos de temperatura para la fase 3) de la siguiente manera:
 - i. **Objetivo ($^{\circ}\text{C}$)** ajustado a **65**
 - ii. **En Acquisition Mode** (modo de adquisición) seleccione **none** (ninguno)
 - iii. **Ajuste Hold** (espera) (hh:mm:ss) a **5:00**.
 - iv. **Ajuste Ramp Rate** (tasa de rampa) ($^{\circ}\text{C/s}$) a 4,4.
- d. Resalte **Stage 4** (fase 4) en **Program Name** (nombre de programa) y cambie **Stage 4 Temperature Targets** (objetivos de temperatura para la fase 4) de la siguiente manera:
 - i. El primer paso:
 - 1. **Objetivo ($^{\circ}\text{C}$)** ajustado a **92**
 - 2. **En Acquisition Mode** (modo de adquisición) seleccione **none** (ninguno)
 - 3. **Ajuste Hold** (espera) (hh:mm:ss) a **0:05**.
 - 4. **Ajuste Ramp Rate** (tasa de rampa) ($^{\circ}\text{C/s}$) a 4,4.
 - ii. Seleccione el icono "+" para añadir un paso y establezca el segundo paso:
 - 1. **Objetivo ($^{\circ}\text{C}$)** ajustado a **57**
 - 2. **En Acquisition Mode** (modo de adquisición) seleccione **none** (ninguno)
 - 3. **Ajuste Hold** (espera) (hh:mm:ss) a **0:40**.
 - 4. **Ajuste Ramp Rate** (tasa de rampa) ($^{\circ}\text{C/s}$) a 2,2.
- 8. Guarde el nuevo protocolo como una plantilla de análisis para su uso futuro.
 - a. En la esquina inferior izquierda de la pantalla seleccione el menú desplegable junto al botón **Apply Template** (aplicar plantilla).
 - b. Elija **Save as Template** (guardar como plantilla).
 - c. Seleccione **Templates Folder** (carpeta de plantillas).
 - d. Resalte la **Run Templates Folder** (carpeta de plantillas de análisis).
 - e. Nombre la plantilla "Lyra Direct SARS-CoV-2 run template" y haga clic en el botón "check" (comprobar).
- 9. Salga del software.

Creación de un procedimiento de análisis en LightCycler 480 Instrument II Assay

1. Cargue la plantilla Lyra Direct SARS-CoV-2 run template.
2. Pulse Start (inicio).
3. La plantilla de análisis solo puede establecerse después de que se haya completado el experimento inicial y se establecerán dos plantillas: una para la detección del SARS-CoV-2 y otra para la detección del PRC.
4. En el análisis de Lyra Direct SARS-CoV-2, seleccione el botón **Analysis** (análisis) en la barra del módulo.
 - a. Seleccione **Abs Quant/Fit Points** (cuantificación Abs/puntos de ajuste).
 - b. En la ventana emergente **Create New Analysis** (crear nuevo análisis), seleccione su subgrupo predefinido en el menú desplegable **subset** (subgrupo) y, a continuación, seleccione el botón "check" (comprobar).
 - c. Haga clic en **Background** (fondo) para todos los analitos.
 - i. Ajuste **Min Offset** (compensación mínima) a 1.
 - ii. Ajuste **Max Offset** (compensación máxima) a 9.
 - d. En el botón central de la pantalla asegúrese de que **Color Compensation** (compensación de color) esté apagada para todos los analitos.
 - e. Cambie la configuración predeterminada a **First Cycle** (primer ciclo) 7 y confirme **Last Cycle** (último ciclo) 40.
5. En la parte superior central de la pantalla seleccione **Noise Band** (banda de ruido).
6. Seleccione **Filter Comb** (combinación de filtros) 465-510
7. Seleccione el menú desplegable junto al botón **Noise Band** (banda de ruido) y seleccione lo siguiente:
 - a. Fluorescencia de banda de ruido de SARS-CoV-2. Establézcala en 1,5.
8. Seleccione **Calculate** (calcular) en la parte inferior izquierda de la pantalla.

9. Guarde el nuevo protocolo de análisis SARS-CoV-2 como una plantilla para su uso futuro.
 - a. En la esquina inferior izquierda de la pantalla seleccione el menú desplegable junto al botón **Apply Template** (aplicar plantilla).
 - b. Elija **Save as Template** (guardar como plantilla).
 - c. Seleccione **Templates Folder** (carpeta de plantillas).
 - d. Resalte la **Analysis Templates Folder** (carpeta de plantillas de análisis).
 - e. Nombre la plantilla “Lyra Direct SARS-CoV-2 465-510 analysis template” y haga clic en el botón “check” (comprobar).
10. Vuelva al análisis y seleccione **Filter Comb** (combinación de filtros) 618-660.
11. Seleccione el menú desplegable junto al botón **Noise Band** (banda de ruido) y seleccione lo siguiente:
 - a. Banda de ruido de PRC autom.
12. Seleccione **Calculate** (calcular) en la parte inferior izquierda de la pantalla.
13. Guarde el protocolo de análisis SARS-CoV-2 como una plantilla para su uso futuro.
 - a. En la esquina inferior izquierda de la pantalla seleccione el menú desplegable junto al botón **Apply Template** (aplicar plantilla).
 - b. Elija **Save as Template** (guardar como plantilla).
 - c. Seleccione **Templates Folder** (carpeta de plantillas).
 - d. Resalte la **Analysis Templates Folder** (carpeta de plantillas de análisis).
 - e. Nombre la plantilla “Lyra Direct SARS-CoV-2_618-660 analysis template” y haga clic en el botón “check” (comprobar).
14. Cree un informe.
 - a. Seleccione el icono **Save** (guardar) en la barra de acción global en la parte derecha de la pantalla.
 - b. Esto se hará en cada canal analizado.
 - c. Elija el botón **Report** (informe) en la barra del módulo en la parte izquierda de la pantalla.
 - d. Seleccione los ajustes adecuados y pulse el botón **Generate** (generar).
15. Para aplicar una Analysis Template (plantilla de análisis) a los análisis posteriores:
 - a. Una vez finalizado el análisis, seleccione el botón **Analysis** (análisis) en la barra del módulo.
 - b. Seleccione **Abs Quant/Fit Points** (cuantificación Abs/puntos de ajuste).
 - c. En la ventana emergente **Create New Analysis** (crear nuevo análisis), seleccione su subgrupo predefinido en el menú desplegable **subset** (subgrupo) y, a continuación, seleccione el botón “check” (comprobar).
 - d. Seleccione el botón **Apply Template** (aplicar plantilla) en la parte más a la izquierda de la pantalla y seleccione la plantilla de análisis Lyra Direct SARS-CoV-2_465-510 o Lyra Direct SARS-CoV-2_618-660 de **Analysis Templates Folder** (carpeta de plantillas de análisis).
 - e. Seleccione Yes (Sí) en la ventana emergente.
16. Interpretación de los resultados (véase la Tabla 5)

Instrucciones de programación de Roche cobas z 480 Instrument

Consulte la versión 1.1.2 del manual del usuario para obtener más información.

Creación de una plantilla de análisis de cobas z 480 Assay

1. Inicie el paquete de software cobas z 480.
2. El **Detection Format** (formato de detección) debe establecerse para especificar los canales en los que se leerá la fluorescencia.
 - a. Seleccione **Tools** (herramientas) en la pantalla de inicio en la parte inferior derecha de la pantalla.
 - b. Seleccione **Detection Formats** (formatos de detección) y, a continuación, elija **New** (nuevo).
 - c. Nombre el formato Lyra Direct SARS-CoV-2
 - d. En la ventana **Filter Combination Selection** (selección de combinación de filtros), seleccione 465-510 y 610-670
 - e. En la ventana **Selected Filter Combination List** (lista de combinación de filtros seleccionados), en el nombre, introduzca SARS-CoV-2 para 465-510 y PRC para 610-670
 - f. Deje todos los valores de configuración por defecto en 1 en Melt Factor (factor de fusión), Quant Factor (factor de cuantificación) y Max Integration Time (tiempo de integración máximo).
 - g. Seleccione **Close** (cerrar) para guardar un nuevo formato de detección y vuelva a la pantalla de arranque.
 - h. Para acceder a este **Detection Format** (formato de detección) que acaba de crear, el software cobas z 480 debe cerrarse y, luego, volver a cargarse.

3. Después de cerrar y recargar el software, seleccione **White Plates** (placas blancas) y **New Experiment** (nuevo experimento) en la ventana Experiment Creation (creación de experimentos).
4. En la siguiente pantalla seleccione “Lyra Direct SARS-CoV-2” en el menú desplegable en **Detection Formats** (formatos de detección).
5. Introduzca **20 ul** como **Reaction Volume** (volumen de reacción) en la parte superior derecha de la pantalla.
6. Introduzca los nombres para cada uno de los programas de RT-PCR.
 - a. En **Program Name** (nombre de programa) introduzca **Stage 1** (fase 1); en **Cycles** (ciclos), introduzca **1** y en **Analysis Mode** (modo de análisis), seleccione **none** (ninguno).
 - b. Seleccione el icono “+” para añadir un programa.
 - c. Nombre el siguiente programa **Stage 2** (fase 2), en **Cycles** (ciclos) introduzca **1** y en **Analysis Mode** (modo de análisis), seleccione **none** (ninguno).
 - d. Seleccione el icono “+” para añadir un programa.
 - e. Nombre el siguiente programa **Stage 3** (fase 3); en **Cycles** (ciclos) introduzca **1** y en **Analysis Mode** (modo de análisis), seleccione **none** (ninguno).
 - f. Seleccione el icono “+” para añadir un programa.
 - g. Nombre el siguiente programa **Stage 4** (fase 4); en **Cycles** (ciclos) introduzca **40** y en **Analysis Mode** (modo de análisis), seleccione **none** (ninguno).
7. Configure los tiempos de ciclo de RT-PCR y la temperatura.
 - a. Resalte **Stage 1** (fase 1) en **Program Name** (nombre de programa) y cambie **Stage 1 Temperature Targets** (objetivos de temperatura para la fase 1) de la siguiente manera:
 - i. **Objetivo (°C)** ajustado a **55**
 - ii. **En Acquisition Mode** (modo de adquisición), seleccione **none (ninguno)**
 - iii. **Ajuste Hold** (espera) (hh:mm:ss) a **5:00**.
 - iv. **Ajuste Ramp Rate** (tasa de rampa) (**°C/s**) a **4,4**.
 - v. Para las fases 1-4, **Sec Target** (sec. diana) (**°C**), **Step Size** (tamaño del paso) (**°C**) y **Step Delay** (retraso del paso) (**ciclos**) se dejarán en 0.
 - b. Resalte **Stage 2** (fase 2) en **Program Name** (nombre de programa) y cambie **Stage 2 Temperature Targets** (objetivos de temperatura para la fase 2) de la siguiente manera:
 - i. **Objetivo (°C)** ajustado a **60**
 - ii. **En Acquisition Mode** (modo de adquisición) seleccione **none (ninguno)**
 - iii. **Ajuste Hold** (espera) (hh:mm:ss) a **5:00**.
 - iv. **Ajuste Ramp Rate** (tasa de rampa) (**°C/s**) a **4,4**.
 - c. Resalte **Stage 3** (fase 3) en **Program Name** (nombre de programa) y cambie **Stage 3 Temperature Targets** (objetivos de temperatura para la fase 3) de la siguiente manera:
 - i. **Objetivo (°C)** ajustado a **65**
 - ii. **En Acquisition Mode** (modo de adquisición) seleccione **none (ninguno)**
 - iii. **Ajuste Hold** (espera) (hh:mm:ss) a **5:00**.
 - iv. **Ajuste Ramp Rate** (tasa de rampa) (**°C/s**) a **4,4**.
 - d. Resalte **Stage 4** (fase 4) en **Program Name** (nombre de programa) y cambie **Stage 4 Temperature Targets** (objetivos de temperatura para la fase 4) de la siguiente manera:
 - i. El primer paso:
 1. **Objetivo (°C)** ajustado a **92**
 2. **En Acquisition Mode** (modo de adquisición) seleccione **none (ninguno)**
 3. **Ajuste Hold** (espera) (hh:mm:ss) a **0:05**.
 4. **Ajuste Ramp Rate** (tasa de rampa) (**°C/s**) a **4,4**.
 - ii. Seleccione el icono “+” para añadir un paso y establezca el segundo paso:
 1. **Objetivo (°C)** ajustado a **57**
 2. **En Acquisition Mode** (modo de adquisición) seleccione **none (ninguno)**
 3. **Ajuste Hold** (espera) (hh:mm:ss) a **0:40**.
 4. **Ajuste Ramp Rate** (tasa de rampa) (**°C/s**) a **2,2**.
8. Guarde el nuevo protocolo como una plantilla de análisis para su uso futuro.
 - a. En la esquina inferior izquierda de la pantalla seleccione el menú desplegable junto al botón **Apply Template** (aplicar plantilla).
 - b. Elija **Save as Template** (guardar como plantilla).
 - c. Seleccione **Templates Folder** (carpeta de plantillas).
 - d. Resalte la **Run Templates Folder** (carpeta de plantillas de análisis).

- e. Nombre la plantilla “Lyra Direct SARS-CoV-2 run template” y haga clic en el botón “check” (comprobar).
9. Salga del software.

Creación de un procedimiento de análisis de cobas z 480 Assay

1. Cargue la plantilla Lyra Direct SARS-CoV-2 run template.
2. Pulse Start (inicio).
3. La plantilla de análisis solo puede establecerse después de que se haya completado el experimento inicial y se establecerán dos plantillas: una para la detección del SARS-CoV-2 y otra para la detección del PRC.
4. En el análisis de Lyra Direct SARS-CoV-2, seleccione el botón **Analysis** (análisis) en la barra del módulo.
 - a. Seleccione **Abs Quant/Fit Points** (cuantificación Abs/puntos de ajuste).
 - b. En la ventana emergente **Create New Analysis** (crear nuevo análisis), seleccione su subgrupo predefinido en el menú desplegable **subset** (subgrupo) y, a continuación, seleccione el botón “check” (comprobar).
 - c. Haga clic en **Background** (fondo) para todos los analitos.
 - i. Ajuste **Min Offset** (compensación mínima) a 1.
 - ii. Ajuste **Max Offset** (compensación máxima) a 9.
 - d. En el botón central de la pantalla asegúrese de que **Color Compensation** (compensación de color) esté apagada para todos los analitos.
 - e. Cambie la configuración predeterminada a **First Cycle** (primer ciclo) 7 y confirme **Last Cycle** (último ciclo) 40.
5. En la parte superior central de la pantalla seleccione **Noise Band** (banda de ruido).
6. Seleccione **Filter Comb** (combinación de filtros) 465-510
7. Seleccione el menú desplegable junto al botón **Noise Band** (banda de ruido) y seleccione lo siguiente:
 - a. Fluorescencia de banda de ruido de SARS-CoV-2. Establézcala en 1,5.
8. Seleccione **Calculate** (calcular) en la parte inferior izquierda de la pantalla.
9. Guarde el protocolo de análisis SARS-CoV-2 como una plantilla para su uso futuro.
 - a. En la esquina inferior izquierda de la pantalla seleccione el menú desplegable junto al botón **Apply Template** (aplicar plantilla).
 - b. Elija **Save as Template** (guardar como plantilla).
 - c. Seleccione **Templates Folder** (carpeta de plantillas).
 - d. Resalte la **Analysis Templates Folder** (carpeta de plantillas de análisis).
 - e. Nombre la plantilla de análisis “Lyra Direct SARS-CoV-2_465-510 analysis template” y haga clic en el botón “check” (comprobar).
10. Vuelva al análisis y seleccione **Filter Comb** (combinación de filtros) 610-670.
11. Seleccione el menú desplegable junto al botón **Noise Band** (banda de ruido) y seleccione lo siguiente:
 - a. Banda de ruido de PRC autom.
12. Seleccione **Calculate** (calcular) en la parte inferior izquierda de la pantalla.
13. Guarde el protocolo de análisis SARS-CoV-2 como una plantilla para su uso futuro.
 - a. En la esquina inferior izquierda de la pantalla seleccione el menú desplegable junto al botón **Apply Template** (aplicar plantilla).
 - b. Elija **Save as Template** (guardar como plantilla).
 - c. Seleccione **Templates Folder** (carpeta de plantillas).
 - d. Resalte la **Analysis Templates Folder** (carpeta de plantillas de análisis).
 - e. Nombre la plantilla “Lyra Direct SARS-CoV-2_610-670 analysis template” y haga clic en el botón “check” (comprobar).
14. Cree un informe.
 - a. Seleccione el icono **Save** (guardar) en la barra de acción global en la parte derecha de la pantalla.
 - b. Esto se hará en cada canal analizado.
 - c. Elija el botón **Report** (informe) en la barra del módulo en la parte izquierda de la pantalla.
 - d. Seleccione los ajustes adecuados y pulse el botón **Generate** (generar).
15. Para aplicar una Analysis Template (plantilla de análisis) a los análisis posteriores:
 - a. Una vez finalizado el análisis, seleccione el botón **Analysis** (análisis) en la barra del módulo.
 - b. Seleccione **Abs Quant/Fit Points** (cuantificación Abs/puntos de ajuste).
 - c. En la ventana emergente **Create New Analysis** (crear nuevo análisis), seleccione su subgrupo predefinido en el menú desplegable **subset** (subgrupo) y, a continuación, seleccione el botón “check” (comprobar).
 - d. Seleccione el botón **Apply Template** (aplicar plantilla) del extremo izquierdo de la pantalla y seleccione la plantilla de análisis Lyra Direct SARS-CoV-2_465-510 o Lyra Direct SARS-CoV-2_610-670 de **Analysis Templates Folder** (carpeta de plantillas de análisis).
 - e. Seleccione Yes (Sí) en la ventana emergente.

16. Interpretación de los resultados (véase la Tabla 5)

Instrucciones de programación de Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro

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

Instrucciones de programación de análisis de prueba de Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro:

1. Abra el software Design and Analysis
2. Seleccione la opción "SET UP PLATE" (configurar placa).
3. Desde la barra lateral de la pantalla, seleccione las siguientes propiedades para filtrar:
 - a. Instrument (instrumento): QuantStudio 7 Pro.
 - b. Block (bloque): 96 pocillos de 0,2 ml.
 - c. Run Mode (modo de análisis): Fast (rápido).
 - d. Las opciones de análisis se dejan en blanco.
4. A partir de las selecciones de la placa presentes en la pantalla, seleccione la plantilla de sistema "Presence/Absence" (presencia/ausencia) y el sistema navegará automáticamente a la pestaña "Run Method" (método de análisis).
5. Run Method (método de análisis)
 - a. Modifique el volumen de reacción a 20,0 ul.
 - b. La temperatura de la cubierta calentada habilitada permanecerá a 105,0 grados C.
 - c. Desplácese por la fase de espera presente en los parámetros de ciclado y aparecerán los botones de adición/sustracción tanto en la parte superior como en la parte inferior de la primera fase.
 - d. Haga clic con el botón de adición derecho en la parte superior y aparecerá una lista de opciones de fases. Desplácese hacia abajo y seleccione Hold (espera).
 - e. Repita los pasos anteriores para que haya tres fases de espera en los parámetros de ciclado.
 - f. Desplácese por la fase de PCR y aparecerán los botones de adición/sustracción tanto en la parte superior como en la parte inferior. Haga clic con el botón de adición derecho en la parte superior y aparecerá una lista de opciones de fases. Desplácese hacia abajo y seleccione PCR.
 - g. De vuelta en la primera fase, seleccione los siguientes parámetros:
 - i. Espera de la fase 1
 1. Tasa de rampa 2,63
 2. 55 °C
 3. 5 minutos
 - ii. Espera de la fase 2
 1. Tasa de rampa 2,63
 2. 60 °C
 3. 5 minutos
 - iii. Espera de la fase 3
 1. Tasa de rampa 2,63
 2. 65 °C
 3. 5 minutos
 - iv. PCR de la fase 4
 1. Paso 1:
 - a. Tasa de rampa 2,63
 - b. 92 °C
 - c. 5 segundos
 2. Paso 2:
 - a. Tasa de rampa 2,32
 - b. 57 °C
 - c. 40 segundos
 - d. Haga clic en el icono de cámara en el Paso 2. Aparecerá una ventana solicitando confirmación para desactivar la recogida de datos durante este paso. Haga clic en "OK" (aceptar).
 - v. Situado en la parte inferior de PCR de la fase 4, cambie el número de ciclos a 10.
 - vi. PCR de la fase 5
 1. Paso 1:
 - a. Tasa de rampa 2,63
 - b. 92 °C

- c. 5 segundos
 - 2. Paso 2:
 - a. Tasa de rampa 2,32
 - b. 57 °C
 - c. 40 segundos
 - d. Asegúrese de que la imagen del icono de cámara esté en negrita/activada para la recogida de datos durante los 30 ciclos de la fase 5, Paso 2.
 - vii. Situado en la parte inferior de PCR de la fase 5, cambie el número de ciclos a 30.
 - h. Desplácese hacia arriba y seleccione la pestaña "Plate Setup" (configuración de placas) cerca de la parte superior de la pantalla.
- 6. Plate Setup (configuración de placas)
 - a. Cambie la referencia pasiva a "NONE" (ninguno).
 - b. En la parte inferior derecha de la pantalla, asegúrese de que la pestaña Targets (dianas) esté seleccionada y, a continuación, resalte y pulse el botón de adición para añadir "Target 1" (diana 1). Pulse de nuevo para añadir "Target 2" (diana 2).
 - c. Haga clic en la casilla "Target 1" (diana 1) y cambie el nombre a CoV-2.
 - d. Haga clic en la casilla de indicador asociado debajo de la pestaña Reporter (indicador) y, desde el menú desplegable, elija FAM.
 - e. Haga clic en la casilla "Target 2" (diana 2) y cambie el nombre a PRC.
 - f. Haga clic en la casilla de notificador asociado debajo de la pestaña Reporter (Notificador) y, desde el menú desplegable, elija CY5.
 - g. Resalte el botón "Actions" (acciones) situado en la parte superior derecha de la pantalla y pulse el botón desplegable. En el menú desplegable, seleccione "Analysis Setting" (configuración de análisis).
 - h. En Analysis Setting (configuración de análisis) deshabilite, para todas las dianas, lo siguiente:
 - i. Use Default Column (usar columna por defecto).
 - ii. Auto Threshold Column (columna con umbral automático).
 - iii. Auto Baseline Column (columna de punto de referencia automático).
 - iv. El inicio del punto de referencia y el final del punto de referencia deben ser por defecto 3 y 15.
 - i. En "Threshold" (umbral) haga clic en la casilla asociada a la diana de CoV e introduzca 40000.
 - j. En "Threshold" (umbral) haga clic en la casilla asociada a la diana de PRC e introduzca 10000.
 - k. Haga clic en "Save" (guardar)
 - l. Navegue de nuevo al botón "Actions" (acciones), pulse el botón desplegable y seleccione "Save As" (guardar como). Esto guardará su plantilla a la localización que elija. Guarde la plantilla como "Lyra Direct SARS Cov-2 Assay".

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

Nota: Estas instrucciones se basan en que el usuario no tiene el instrumento de PCR en tiempo real QuantStudio 7 Real-Time y el software ABI Design and Analysis 2.4 conectados. El usuario debe abrir la plantilla Lyra Direct SARS CoV-2 creada previamente con el software y guardar cualquier plantilla de análisis de muestras de reciente creación en un USB y transferir la plantilla al instrumento.

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

1. Abra la plantilla Lyra Direct SARS CoV-2 previamente generada.
2. Haga clic en la pestaña Plate Setup (configuración de placas) cerca de la parte superior de la pantalla.
3. En la parte derecha de la pantalla asegúrese de que la pestaña "Samples" (muestras) esté resaltada y pulse el botón de adición para añadir el número de muestras que se van a analizar.
4. Haga clic en la casilla "Sample 1" (muestra 1) para renombrar la muestra. Repita este paso para todas las muestras posteriores que vayan a introducirse.
5. Haga clic en el pocillo situado en el mapa de placas y, a continuación, marque la casilla junto al nombre de la muestra de la barra del lado derecho para asociar el nombre al pocillo.
 - a. El usuario también tiene la opción de resaltar la localización del pocillo en el mapa de placas y hacer clic en la casilla "Enter sample" (introducir muestra). Introduzca la ID de la muestra y pulse la pestaña para pasar al siguiente pocillo en el mapa de placas. Esto cargará automáticamente el nombre de la muestra a la barra lateral.

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



M124 – Kit del Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanover,
Alemania



Quidel Corporation

2005 East State Street, Suite 100

Athens, OH 45701 USA

quidel.com

PIM124101ES00 (06/21)

GLOSARIO

REF

Número de referencia



Marca de conformidad de la CE

EC REP

Representante autorizado en la Comunidad Europea

LOT

Código del lote



Fecha de caducidad



Fabricante



Límite de temperatura



Uso previsto

R_x ONLY

Exclusivamente por prescripción facultativa



Consulte la etiqueta electrónica para ver las instrucciones de uso



Riesgos biológicos

IVD

Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



Contiene cantidad suficiente para <n> determinaciones

CONT

Contenido/Contiene

CONTROL

positivo
