



Lyra[®]Direct
SARS-CoV-2 ASSAY

Per la rilevazione qualitativa dell'RNA virale del coronavirus umano SARS-CoV-2 in campioni di tamponi nasali, rinofaringei e orofaringei diretti.

Per uso diagnostico *in vitro*.

R_x ONLY

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

INDICE

USO PREVISTO	2
RIASSUNTO E SPIEGAZIONE.....	3
PRINCIPIO DELLA PROCEDURA	3
MATERIALE FORNITO	4
MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI	4
AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....	5
CONSERVAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI REAGENTI DEL KIT	6
Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti.....	6
RACCOLTA, CONSERVAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI	6
CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI PROCESSATI	6
PROCEDURA DI DOSAGGIO	6
Procedura per il processamento dei campioni	6
Procedura di reidratazione del Master Mix	7
Procedura di configurazione RT-PCR.....	7
CONTROLLO QUALITÀ	7
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEI CAMPIONI DEL PAZIENTE.....	8
PRESTAZIONI CLINICHE.....	9
Studio 1	9
Studio 2	9
Studio 3	10
PRESTAZIONI ANALITICHE	10
Limite di rilevazione	10
Studio 1.....	10
Studio 2 - Studio comparativo sul LoD per Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay e Lyra SARS-CoV-2 Assay.....	11
Risultati dello studio di conferma del LoD.....	11
REATTIVITÀ ANALITICA (INCLUSIVITÀ)	12

SPECIFICITÀ ANALITICA (REATTIVITÀ CROCIATA)	13
SOSTANZE INTERFERENTI	15
LIMITI.....	15
ASSISTENZA TECNICA E ASSISTENZA CLIENTI	16
PROPRIETÀ INTELLETTUALE.....	16
BIBLIOGRAFIA	17
APPENDICE (PROGRAMMAZIONE E PROTOCOLLI DI ANALISI SPECIFICI DI CIASCUN TERMOCICLATORE).....	18
Istruzioni per la programmazione di Applied Biosystems 7500 Fast Dx	18
Procedura di analisi per termociclatore Applied Biosystems 7500 Fast Dx	20
Istruzioni per la programmazione di Applied Biosystems 7500 Standard	20
Procedura di analisi per termociclatore Applied Biosystems 7500 Standard	22
Procedura di programmazione del termociclatore Bio-Rad CFX96 Touch.....	23
Procedura di test del termociclatore Bio-Rad CFX96 Touch	25
Istruzioni per la programmazione di Qiagen Rotor-Gene Q	25
Ciclo di analisi con Qiagen Rotor-Gene Q	27
Istruzioni per la programmazione di Roche LightCycler 480 Instrument II.....	28
Creazione di un modello di ciclo di dosaggio con LightCycler 480 Instrument II.....	28
Creazione di una procedura di analisi del dosaggio LightCycler 480 Instrument II	29
Istruzioni per la programmazione di Roche cobas z 480 Instrument.....	30
Creazione di un modello di ciclo di dosaggio con cobas z 480	30
Creazione di una procedura di analisi del dosaggio cobas z 480.....	31
Istruzioni per la programmazione di Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro	32
Istruzioni per la programmazione del ciclo di analisi di Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro:.....	32
Creazione di una procedura di analisi con Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro	34
GLOSSARIO	36



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

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

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

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

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

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

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

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

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

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

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

Di seguito è riportato un riepilogo della procedura:

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

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

MATERIALE FORNITO

Cat. N. M124

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

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

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Tamponi rinofaringei floccati per il prelievo di campioni RF
- Tampone nasale floccato o a maglia in poliestere per il prelievo di campioni NS
- Tampone normale floccato o a maglia in poliestere per il prelievo di campioni OF
- Provetta per il trasporto del tampone
- Micropipettatori (di capacità compresa tra 1 e 10 µl e tra 100 e 1000 µl)
- Puntali non aerosol con barriera filtrante per pipette
- Applied Biosystems 7500 Fast Dx, versione software 1.4 o successive
- Applied Biosystems Standard, versione software 2.0.6 o successive
- Roche LightCycler 480 Instrument II, versione software 1.5.0.39 o successive
- Roche cobas z 480 Instrument, versione software 1.5.1.62 SP2- o successive
- Qiagen Rotor-Gene Q, versione software 2.0.2.4 o successive
- Bio-Rad CFX96 Touch, versione software 3.1 o successive
- Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro, versione software 2.0 o successive
- Piastra PCR da 96 pozzetti n.:
 - ▶ Applied Biosystems 7500 Fast Dx: 4344906
 - ▶ Applied Biosystems Standard: N8010560
 - ▶ Roche LightCycler 480: 04729692001, pellicola inclusa
 - ▶ Bio-Rad CFX96 Touch: HSP9631, sigilli MSB1001
 - ▶ Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro: 4483354
- Pellicole piastra ottica
- Qiagen 72-Well Rotor (Cat. N. 9018903)
- Anello di bloccaggio Qiagen 72-Well Rotor (Cat. n. 9018904)

- Provette per strisce e tappi Qiagen, 0,1 ml (250) (Cat. n. 981103)
- Centrifuga per piastra da 96 pozzetti
- Blocco di calore a secco in grado di riscaldare provette da 1,5 ml a 95 °C±1° per 10 minuti
- Provette per microcentrifuga da 1,5 ml
- Blocco di calore a secco, in grado di riscaldare una piastra di microtitolazione con pozzetti profondi a 95 °C±1° per 10 minuti (Eppendorf ThermoMixer® con alloggiamento per pozzetti profondi Parte N. 5382000023, 531000002)
- Piastra di microtitolazione con pozzetti profondi (Eppendorf 951033103 o equivalente)

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

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

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

CONSERVAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI REAGENTI DEL KIT

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

Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

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

RACCOLTA, CONSERVAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

I tamponi nasali, rinofaringei o orofaringei devono essere prelevati e inseriti in una provetta di trasporto pulita e asciutta. I campioni devono essere trasportati e analizzati al più presto dopo il prelievo. I campioni rimangono stabili al massimo per 48 ore a temperatura ambiente o fino a 72 ore se conservati a 2 °C-8 °C. Se non è possibile analizzare i campioni entro 72 ore dal prelievo, è necessario congelarli ad almeno -70 °C fino al momento dell'analisi. Si è stimato che la stabilità a -70 °C sia di fino a 8 giorni dal prelievo.

CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI PROCESSATI

I campioni processati nel Process Buffer possono essere conservati a 2 °C-8 °C per massimo 7 giorni.

PROCEDURA DI DOSAGGIO

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

Procedura per il processamento dei campioni

1. 25 minuti prima della fase della lisi a calore, scaldare un blocco di calore a 95 °C.
2. Dispensare 400 µl di Process Buffer nel numero necessario di pozzetti (2 per i controlli e 1 per il paziente) in una piastra di microtitolazione a pozzetto profondo o in una provetta per microcentrifuga.
3. Inserire il tampone nel pozzetto o nella provetta con identificativo e ruotarlo vigorosamente per 10 secondi per eluire il campione. Durante la rimozione, ruotare la testa del tampone contro la parte interna del pozzetto. Smaltire il tampone usato nel contenitore per rifiuti biologicamente pericolosi.
4. Riscaldare la piastra o le provette a 95 ± 1 °C per 10 minuti:

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

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

Nota: iniziare la procedura di lisi di 10 minuti dopo avere collocato le provette nel blocco e avere atteso che il blocco abbia raggiunto nuovamente una temperatura di 95 °C

5. Estrarre i campioni processati dalla provetta o dal blocco di calore della piastra e lasciarli raffreddare a temperatura ambiente o refrigerata. Questa procedura riguarda i campioni in una piastra di microtitolazione a pozzetto profondo o in una provetta per microcentrifuga. Il campione apparirà torbido.

Nota: i campioni lisati possono essere conservati a 2 °C - 8 °C, -20 °C o -70 °C per massimo 7 giorni.

Procedura di reidratazione del Master Mix

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

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

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

Procedura di configurazione RT-PCR

1. Aggiungere 15 µl di Master Mix reidratato a ciascun pozzetto della piastra o a ciascuna provetta.
2. Per le provette per microcentrifuga, agitare tramite vortex ciascuna provetta per 10 secondi immediatamente prima di aggiungerla alla piastra. Accertarsi che tutto il precipitato sia ritornato nella soluzione. Aggiungere 5 µl di campione processato (campione con controllo di processo) al pozzetto della piastra PCR o alla provetta. Non è necessario miscelare i reagenti.
Nota: utilizzare un nuovo puntale per micropipettatore con barriera per ciascun campione estratto.
Nota: l'agitazione tramite vortex e il trasferimento della provetta da 5 µl devono essere eseguiti singolarmente. Non è possibile scaglionare l'agitazione tramite vortex delle provette prima del trasferimento.
3. Per miscelare una piastra di microtitolazione a pozzetto profondo, aspirare e rilasciare mediante pipetta per tre volte il contenuto di ciascun pozzetto. La pipetta va impostata a 150 µl. Trasferire immediatamente 5 µl di campione processato nella piastra PCR o nella provetta.
Nota: utilizzare un nuovo puntale per micropipettatore con barriera per ciascun campione estratto.
Nota: la miscelazione e il trasferimento di 5 µl da ciascun pozzetto devono essere eseguiti singolarmente. Non è possibile scaglionare la miscelazione di tutti i pozzetti della piastra prima del trasferimento.
4. Sigillare la piastra o le provette.
5. Centrifugare la piastra per almeno 15 secondi. Verificare che tutto il liquido si trovi sul fondo dei pozzetti della piastra e che non siano presenti bolle.
Nota: non è necessario centrifugare le provette utilizzate nel Qiagen Rotor-Gene Q prima di caricarle nello strumento.
6. Accendere il termociclatore appropriato.
7. Inserire la piastra o le provette nell'apposito termociclatore.

Nota: per la programmazione e i protocolli di analisi specifici di ciascun termociclatore, consultare l'Appendice (pagina 16).

CONTROLLO QUALITÀ

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

1. Il **controllo di processo** (PRC) consiste in un batteriofago MS2 inattivato e stabilizzato contenente il genoma dell'RNA ed è incluso nel Process Buffer. Il PRC consente di monitorare gli inibitori nel campione e garantisce che sia stata eseguita un'amplificazione adeguata.
2. Il **controllo positivo** (contenente RNA di SARS-CoV-2, Parte M5274) deve essere trattato come un campione del paziente e va incluso in ogni ciclo di estrazione e di RT-PCR. Il controllo positivo può essere immerso posizionando nel controllo un tampone rinofaringeo asciutto per dieci secondi e quindi agitandolo vigorosamente per 10 secondi nel Process Buffer aliquotato oppure è possibile trasferire 50 µl nel Process Buffer aliquotato.
3. Il **controllo negativo** (Parte M5275) deve essere trattato come un campione del paziente e va incluso in ogni ciclo di estrazione e di RT-PCR. Il controllo negativo può essere immerso posizionando nel controllo un tampone rinofaringeo asciutto per dieci secondi e quindi agitandolo vigorosamente per 10 secondi nel Process Buffer aliquotato oppure è possibile trasferire 50 µl nel Process Buffer aliquotato.
4. Il mancato esito del **controllo positivo** o del **controllo negativo** invalida il ciclo di RT-PCR, pertanto i risultati non devono essere comunicati. Il ciclo di RT-PCR deve essere ripetuto innanzitutto con i campioni e i controlli estratti. Eseguire nuovamente l'estrazione e rianalizzare un'altra aliquota dei controlli e dei campioni o ottenere nuovi campioni e ripetere l'analisi se i controlli non vanno di nuovo a buon fine.

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

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

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

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

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEI CAMPIONI DEL PAZIENTE

Interpretazione dei risultati di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay su Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Applied Biosystems 7500 Standard, Bio-Rad Cfx96, Qiagen Rotor-Gene Q o ThermoFisher QS7				
Risultato del dosaggio	Rilevatore: SARS-CoV-2	Rilevatore: controllo di processo	Interpretazione dei risultati	Note e indicazioni speciali
Negativo	Nessun Ct rilevato	5,0 ≤ Ct ≤ 30,0	Nessun RNA virale di SARS-CoV-2 rilevato; PRC rilevato.	
Positivo per SARS-CoV-2	5,0 ≤ Ct ≤ 30,0 ¹	N/D ²	RNA virale di SARS-CoV-2 rilevato.	
Nulla	Nessun Ct rilevato	Nessun Ct rilevato	Nessun RNA virale di SARS-CoV-2 e nessun RNA del PRC rilevato.	Test non valido. Rianalizzare lo stesso campione processato. Se anche il test risulta non valido, prelevare un altro campione e ripetere l'analisi.
Interpretazione dei risultati di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay su Roche LightCycler 480 e Roche Cobas z480				
Risultato del dosaggio	Rilevatore: SARS-CoV-2	Rilevatore: controllo di processo	Interpretazione dei risultati	Note e indicazioni speciali
Negativo	Nessun Ct rilevato	5,0 ≤ Ct ≤ 40,0	Nessun RNA virale di SARS-CoV-2 rilevato; PRC rilevato.	
Positivo per SARS-CoV-2	5,0 ≤ Ct ≤ 40,0 ¹	N/D ²	RNA virale di SARS-CoV-2 rilevato.	
Nulla	Nessun Ct rilevato	Nessun Ct rilevato	Nessun RNA virale di SARS-CoV-2 e nessun RNA del PRC rilevato.	Test non valido. Rianalizzare lo stesso campione processato. Se anche il test risulta non valido, prelevare un altro campione e ripetere l'analisi.

¹ Per i campioni che generano un valore Ct compreso tra 0 (non determinato) e 5, eseguire diluizioni di 1:10 e 1:100 utilizzando Process Buffer non inoculati. Processare (compresa la fase di riscaldamento) e analizzare i campioni diluiti seguendo le istruzioni sopra riportate. Interpretare i risultati in base alla Tabella 5 sopra riportata. Si prega di notare che, se la lettura della curva di amplificazione iniziale del campione non diluito non indica un risultato positivo, è possibile posticipare l'analisi dei campioni diluiti. Se i campioni diluiti generano di nuovo valori Ct compresi tra 0 (non determinato) e 5, contattare un rappresentante Quidel per ulteriori istruzioni al numero (800) 874-1517 (numero verde negli Stati Uniti) o (858) 552-1100 (al di fuori degli Stati Uniti), dal lunedì al venerdì, dalle 8.00 alle 17.00 orario della costa orientale degli Stati Uniti.

² Non è necessario un valore Ct per ottenere un'indicazione positiva dal controllo di processo.

PRESTAZIONI CLINICHE

Le prestazioni cliniche di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay sono state valutate in due studi su tamponi positivi artificiali mediante tamponi rinofaringei e orofaringei e in uno studio prospettico mediante tamponi nasali abbinati.

Studio 1

Trenta (30) campioni NF artificiali positivi sono stati realizzati sottoponendo a spiking trenta (30) campioni clinici singoli di cui è stata stabilita la negatività per SARS-CoV-2 mediante il dosaggio Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. I campioni sottoposti a spiking sono stati aggiunti ai tamponi (circa 50 µl) e successivamente processati e analizzati attenendosi al foglio illustrativo di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. Venti (20) campioni sono stati sottoposti a spiking con 1x LoD (3,40e+4 cp/ml) di virus. Altri dieci (10) campioni sono stati sottoposti a spiking con 5x LoD (1,7E+5 cp/ml) di virus.

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

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

Le prestazioni rispetto ai risultati previsti sono le seguenti:

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

Studio 2

Quindici (15) campioni OF artificiali positivi sono stati realizzati sottoponendo a spiking quindici (15) campioni clinici singoli di cui è stata stabilita la negatività per SARS-CoV-2 mediante Lyra SARS-CoV-2 Assay. I campioni sottoposti a spiking sono stati aggiunti ai tamponi (circa 50 µl) e successivamente processati e analizzati attenendosi al foglio illustrativo di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay. Sette (7) campioni sono stati sottoposti a spiking con 1x LoD (3,40e+4 cp/ml) di virus; quattro (4) campioni con 10x LoD (3,4e+5cp/ml) di virus e quattro (4) con 100x LoD (3,4e+6cp/ml) di virus. Altri otto (8) campioni OF negativi, in base a Lyra SARS-CoV-2 Assay, sono stati analizzati in conformità al foglio illustrativo di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay.

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

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

Le prestazioni rispetto ai risultati previsti sono le seguenti:

Percentuale di concordanza positiva 15/15 = 100% (IC al 95%: 79,6%-100%)
 Percentuale di concordanza negativa 8/8 = 100% (IC al 95%: 67,6%-100%)

Studio 3

È stato eseguito uno studio per confrontare il test Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay con un test molecolare autorizzato EUA. Centottantuno (181) campioni nasali abbinati sono stati analizzati contemporaneamente con entrambi i dispositivi in conformità ai relativi fogli illustrativi. I campioni sono stati prelevati in tre centri e inviati in borse frigo per l'analisi. I tamponi nasali sono stati randomizzati, processati e analizzati con entrambi i dispositivi.

Tre (3) campioni (1,7%) sono risultati non validi con Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay e sono stati esclusi da ulteriori analisi. I dati relativi ai centosettantotto (178) campioni rimanenti sono riportati nella tabella seguente.

Confronto fra Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay e un dosaggio SARS-CoV-2 estratto di riferimento								
	Comparatore di SARS-CoV-2 RT-PCR				IC al 95%			
		POS.	NEG.	Totale	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%
	Totale	50	128	178	NPV	98,5%	94,6%	99,6%

PRESTAZIONI ANALITICHE

Limite di rilevazione

Studio 1

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

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

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

¹ La concentrazione è presentata in copie di RNA/ml

² I risultati includono 10 cicli non rilevati dagli altri strumenti

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

Un secondo studio relativo al LoD è stato eseguito per confrontare il limite di rilevazione (LoD) di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay e Lyra SARS-CoV-2 Assay su ABI 7500 Fast Dx utilizzando diluizioni limitanti di virus SARS-CoV-2 sottoposto a raggi gamma. In questo studio è stata inoculata in un tampone RF una concentrazione di 1x LoD di virus (in base a un'analisi preliminare) in matrice RF negativa. Venti (20) duplicati dei tamponi inoculati sono stati analizzati direttamente in conformità al foglio illustrativo di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay oppure aggiunti a 3,0 ml di UTM per l'analisi con Lyra SARS-CoV-2 Assay (per un totale di quaranta duplicati di tamponi). L'analisi è stata eseguita utilizzando ABI 7500 Fast Dx.

Risultati dello studio di conferma del LoD

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

Dosaggio Lyra Direct	1,28E+04 cp/ml	
	SARS-CoV-2	PRC
Duplicato		
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

Dosaggio Lyra Direct	1,28E+04 cp/ml	
Duplicato	SARS-CoV-2	PRC
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
% rilevati	100%	100%
Media positivi	24,49	18,07
STDEV di pos.	1,23	0,31
% CV	5,0%	1,7%

In base al disegno di questo studio, il LoD per le 2 versioni del dosaggio Lyra (Lyra SARS-CoV-2 Assay e Lyra Direct SARS-CoV-2) presenta un LoD input di $1,28 \times 10^4$ di equivalenti genomici/ml. È opportuno notare che il LoD pubblicato per Lyra SARS-CoV-2 Assay ($8,00E-01$ copie di RNA genomico/ μ l) è preciso. La concentrazione finale di virus analizzato nel dosaggio, dopo la diluizione in 3,0 ml di UTM e la concentrazione durante il processo di estrazione, è di circa 800 cp/ml.

REATTIVITÀ ANALITICA (INCLUSIVITÀ)

L'inclusività di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay è stata stabilita testando il coronavirus 2 correlato a SARS (SARS-CoV-2) sottoposto a raggi gamma, isolato USA-WA1/2020 e mediante analisi *in silico*.

L'inclusività di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay è stata stabilita attraverso un'analisi *in silico* delle sequenze di SARS-CoV-2 disponibili. Al 22 aprile 2021, nei database GISAID e NCBI erano disponibili in totale 1.378.013 sequenze di SARS-CoV-2. Di queste, 1.356.832 (98,46%) includono la regione dell'amplicone (<5 basi nucleotidiche indefinite in qualsiasi regione di oligonucleotidi) e sono conservate al 71,43-100% per gli oligonucleotidi di Lyra Direct SARS-CoV-2. Nella tabella seguente viene riepilogato il numero di sequenze conservate al 100% e al $\geq 95\%$ nel set di oligonucleotidi.

Database	Sequenze disponibili	Sequenze inclusa la regione dell'amplicone	Sequenze con omologia al 100% con il set di oligonucleotidi	Sequenze con omologia $\geq 95\%$ con il set di oligonucleotidi
GISAID	1.183.880	1.165.604	1.159.422	1.165.595
NCBI	194.133	191.228	189.505	191.228

L'inclusività di Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay con sette (7) varianti pubblicate (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), Variante B.1.617 (a doppio mutante indiana)) è stata stabilita mediante un'analisi *in silico* delle sequenze di SARS-CoV-2 disponibili. Tutte le sequenze sono conservate al 90,48-100% per gli oligonucleotidi di Lyra Direct SARS-CoV-2. Nella tabella seguente viene riepilogato il numero di sequenze varianti conservate al 100% e al $\geq 95\%$ nel set di oligonucleotidi.

Database	Variante	Sequenze disponibili	Sequenze inclusa la regione dell'amplicone	Sequenze con omologia al 100% con il set di oligonucleotidi	Sequenze con omologia ≥95% con il set di oligonucleotidi
GISAID	B.1.1.7 (VUI202012/01)	399.189	395.236	394.338	395.235
	SA Variante B.1.351 (501Y.N2)	10.658	10.436	10.385	10.436
	Variante P.1 (501Y.V3)	4.735	4.696	4.688	4.696
	Variante B.1.429+B.1.427 (452R.V1)	30.306	30.107	29.981	30.103
	Variante B.1.525 (484K.V3)	1.882	1.860	1.853	1.860
	Variante B.1.526 (NY)	8.793	8.771	8.176	8.771
	Variante B.1.617 (a doppio mutante indiana)	862	850	843	850

Le varianti 52 B.1.1.7 presentano un SNP allineato all'estremità 3' di un primer. Sono state ordinate e analizzate mediante Lyra SARS-CoV-2 assay una sequenza di RNA che rappresenta una sequenza della variante inglese con il SNP e una che rappresenta una sequenza di controllo (MN908947.3). Entrambi i modelli di RNA hanno fornito risultati comparabili che indicano che il SNP allineato all'estremità 3' non interferisce con la rilevazione. I risultati corrispondono a quelli dei precedenti studi sugli SNP allineati all'estremità 3' di un primer Lyra.

SPECIFICITÀ ANALITICA (REATTIVITÀ CROCIATA)

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

Risultati del test di reattività crociata				
Virus/batterio/parassita	Ceppo	Origine/tipo di campione	Concentrazione	Risultati
Adenovirus	Tipo 1	Isolato	1 x 10 ^{7,53} U/ml	Neg, Neg, Neg
Coronavirus	229e	Isolato	1 x 10 ^{6,10} U/ml	Neg, Neg, Neg
Coronavirus	OC43	Isolato	9,55 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /ml	Neg, Neg, Neg
Coronavirus	NL63	Isolato	1 x 10 ^{4,67} U/ml	Neg, Neg, Neg
MERS-CoV (inattivato mediante calore)	Florida/USA-2 Arabia Saudita 2014	Isolato	4,17 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /ml	Neg, Neg, Neg
SARS-1	2003-00592	Virus inattivato	Non disponibile	Neg, Neg, Neg
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129	Isolato	3 x 10 ⁷ CCU/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Z018	Isolato	3,8 x 10 ⁹ cfu/ml	Neg, Neg, Neg
Influenza A H3N2	Brisbane/10/07	Isolato	1 x 10 ^{5,07} U/ml	Neg, Neg, Neg
Influenza A H1N1	Nuova Caledonia/20/99	Isolato	1 x 10 ^{6,66} U/ml	Neg, Neg, Neg
Influenza B	Brisbane/33/08	Isolato	1 x 10 ^{5,15} U/ml	Neg, Neg, Neg
Parainfluenza	Tipo 1	Isolato	1 x 10 ^{8,01} U/ml	Neg, Neg, Neg
Parainfluenza	Tipo 2	Isolato	1 x 10 ^{6,34} U/ml	Neg, Neg, Neg

Risultati del test di reattività crociata				
Virus/batterio/parassita	Ceppo	Origine/tipo di campione	Concentrazione	Risultati
Parainfluenza	Tipo 3	Isolato	8,51 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /ml	Neg, Neg, Neg
Parainfluenza	Tipo 4b	Isolato	1 x 10 ^{7,53} U/ml	Neg, Neg, Neg
Enterovirus	Tipo 68	Isolato	1 x 10 ^{6,5} U/ml	Neg, Neg, Neg
Metapneumovirus umano	A1 (IA10-s003)	Isolato	1 x 10 ^{5,55} U/ml	Neg, Neg, Neg
Virus sinciziale respiratorio	Tipo A (3/2015 isolato n. 3)	Isolato	1 x 10 ^{5,62} U/ml	Neg, Neg, Neg
Rhinovirus umano	n/d	Virus inattivato	Non disponibile	Neg, Neg, Neg
<i>Chlamydomyces pneumoniae</i>	AR-39	Isolato	2,9 x 10 ⁷ IFU/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Haemophilus influenzae</i>	Tipo b; Eagan	Isolato	7,87 x 10 ⁸ cfu/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Legionella pneumophila</i>	Philadelphia	Isolato	6,82 x 10 ⁹ cfu/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Z022; 19f	Isolato	2,26 x 10 ⁹ cfu/ml	Neg, Neg, Neg
<i>Bordetella pertussis</i>		Isolato		Neg, Neg, Neg
<i>Pneumocystis jirovecii</i> -S. <i>cerevisiae</i> ricombinante	W303-Pji	Isolato	1,56 x 10 ⁸ cfu/ml	Neg, Neg, Neg

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

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

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

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

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

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

SOSTANZE INTERFERENTI

È stato condotto uno studio che ha dimostrato che sostanze potenzialmente interferenti presenti nelle alte vie respiratorie non presentano reazioni crociate né interferiscono con la rilevazione dell'RNA di SARS-CoV-2 in Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay.

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

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

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

LIMITI

- Con questo dosaggio non è possibile utilizzare campioni in terreni di trasporto.
- Un risultato negativo non preclude l'infezione da SARS-CoV-2 e non deve essere utilizzato quale sola base per le decisioni di gestione del paziente.
- I risultati negativi devono essere trattati come ipotesi e confermati con un dosaggio molecolare approvato dalla FDA che utilizza una fase di lisi chimica seguita da estrazione in fase solida dell'acido nucleico, se necessario, per la gestione clinica.
- Le prestazioni di questo test sono state valutate utilizzando campioni di tamponi rinofaringei e orofaringei. Anche i tamponi nasali e dei turbinati medi (auto-prelevati sotto supervisione di un operatore sanitario o prelevati da quest'ultimo) sono considerati tipi di campione accettabili per l'uso con Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay.
- Errate condizioni di raccolta, conservazione o trasporto dei campioni possono dare luogo a risultati falsi negativi.
- La presenza di inibitori nel campione e/o eventuali errori nella procedura di dosaggio possono dare luogo a risultati falsi negativi.

- I risultati del dosaggio devono essere interpretati da un operatore sanitario in possesso della formazione necessaria congiuntamente all'anamnesi medica del paziente, ai suoi segni e sintomi clinici e ai risultati di altri test diagnostici.
- Gli analiti target (sequenze virali) possono persistere *in vivo* indipendentemente dalla vitalità del virus. La rilevazione di uno o più analiti target non implica che i virus corrispondenti siano infettivi, né che questi siano gli agenti causativi dei sintomi clinici.
- Esiste un rischio di valori falsi positivi dovuto alla contaminazione crociata da parte di organismi target, dei loro acidi nucleici o del prodotto amplificato oppure a segnali aspecifici nel dosaggio.
- Esiste il rischio di valori falsi negativi dovuto alla presenza di varianti di sequenza nei target virali del dosaggio.
- Le prestazioni del dosaggio non sono state verificate in pazienti immunocompromessi.
- Non sono state definite le prestazioni cliniche di tutte le varianti in circolazione, ma si prevede che riflettano le principali varianti in circolazione al momento e nel luogo della valutazione clinica. Le prestazioni al momento del test possono variare a seconda delle varianti in circolazione, inclusi i nuovi ceppi emergenti di SARS-CoV-2 e in base alla loro prevalenza, che variano nel tempo.

ASSISTENZA TECNICA E ASSISTENZA CLIENTI

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

Paese	Tel.	Indirizzo e-mail
Europa, Medio Oriente e Africa	+353 (91) 412 474 (principale) 0 1800 200441 (numero verde)	emeatechnicalsupport@quidel.com
Austria	+43 316 231239	
Belgio	+32 (2) 793 0180	
Francia	0 (805) 371674	
Germania	+49 (0) 7154 1593912	
Paesi Bassi	0 800 0224198	
Svizzera	0 800 554864	
Regno Unito	0 800 3688248	
Irlanda	+353 (91) 412 474	
Italia	+39 (800) 620 549	
America del Nord, Asia Pacifico, America Latina	858.552.1100	technicalsupport@quidel.com
Canada	437.266.1704 (principale) 888.415.8764 (numero verde)	technicalsupport@quidel.com
China	0400 920 9366 oppure +86 021 3217 8300	chinatechnicalservice@quidel.com

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

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

Quidel e Lyra sono marchi registrati di Quidel Corporation. Qualunque altro marchio commerciale riportato nel presente documento appartiene al rispettivo proprietario e il suo utilizzo in questo contesto non implica la sponsorizzazione né il supporto a prodotti o servizi.

BIBLIOGRAFIA

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

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

Istruzioni per la programmazione di Applied Biosystems 7500 Fast Dx

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

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

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

- i. Confermare o inserire le informazioni seguenti.

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

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

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

- i. Inserire le informazioni seguenti per ciascun rilevatore.

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

- ii. Selezionare un colore univoco che rappresenti ciascun rilevatore.

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

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

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

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

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

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

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

1. Fase 1

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

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

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

ii. In **Settings** (Impostazioni) inserire quanto segue:

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

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

Procedura di analisi per termociclatore Applied Biosystems 7500 Fast Dx

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

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

5. Configurare la piastra dei campioni
 - a. Nelle schede **Setup** (Configurazione) e **Plate** (Piastra) viene visualizzata la configurazione della piastra.
 - b. Selezionare tutti i pozzetti destinati a contenere il campione, fare clic con il tasto destro e selezionare **Well Inspector** (Ispettore pozzetto) dal menu a discesa. Quando si apre la finestra popup **Well Inspector** (Ispettore pozzetto), selezionare i rilevatori per SARS-CoV-2 e PRC.
 - c. Utilizzare **Well Inspector** (Ispettore pozzetto) per inserire i nomi dei campioni. Nella finestra Well Inspector (Ispettore pozzetto) è possibile inserire gli ID dei pazienti. Tuttavia, si consiglia di eseguire questa operazione prima di risospendere il Master Mix liofilizzato, dopo il ciclo o utilizzando la funzione di importazione, per ridurre al minimo i tempi di attesa delle reazioni PCR a temperatura ambiente prima di avviare il ciclo.
 - d. Salvare il ciclo con il nome **AAMMGG- Lyra Direct SARS-CoV-2.sds**.
 - e. Si apre la finestra con la richiesta "Reason for change of entry" (Motivo della modifica del dato). Inserire **"Setup"** (Configurazione) ed eventuali altri commenti relativi al ciclo.
6. Avvio della PCR
 - a. Selezionare la scheda **Instrument** (Strumento).
 - b. Inserire la piastra PCR a 96 pozzetti nel dispositivo.
 - c. In **Instrument Control** (Controllo strumento), selezionare il pulsante **Start** (Avvio) per iniziare il ciclo.
7. Dopo la PCR
IMPORTANTE: premere OK al termine del ciclo.
 - a. Analizzare i dati premendo il pulsante **"Analyze"** (Analizza) nel menu in alto e salvare il file.
 - b. Salvare il file premendo **Save Document** (Salva documento) nella barra attività. Si apre la finestra con la richiesta "Reason for change of entry" (Motivo della modifica del dato).
 - c. Inserire **"Data analysis post run"** (Analisi dei dati post ciclo) ed eventuali altri commenti relativi al ciclo
8. Interpretazione dei risultati (vedere Tabella 5).

Istruzioni per la programmazione di Applied Biosystems 7500 Standard

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

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

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

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

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

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

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

Procedura di analisi per termociclatore Applied Biosystems 7500 Standard

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

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

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

6. Avvio della PCR
 - a. Selezionare la scheda **Instrument** (Strumento).
 - b. Inserire la piastra PCR a 96 pozzetti nel dispositivo.
 - c. In **Instrument Control** (Controllo strumento), selezionare il pulsante **Start** (Avvio) per iniziare il ciclo.
7. Dopo la PCR

IMPORTANTE: premere OK al termine del ciclo.

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

Procedura di programmazione del termociclatore Bio-Rad CFX96 Touch

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

Istruzioni per la programmazione:

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

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

Procedura di test del termociclatore Bio-Rad CFX96 Touch

Istruzioni per l'analisi:

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

Istruzioni per la programmazione di Qiagen Rotor-Gene Q

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

Istruzioni per la programmazione:

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

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

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

Ciclo di analisi con Qiagen Rotor-Gene Q

Istruzioni per l'analisi:

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

Istruzioni per la programmazione di Roche LightCycler 480 Instrument II

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

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

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

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

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

1. Caricare il modello di ciclo Lyra Direct SARS-CoV-2.
2. Premere Start (Avvio).
3. Il modello di analisi può essere definito solo dopo aver completato l'esperimento iniziale; saranno definiti due modelli: uno per la rilevazione di SARS-CoV-2 e uno per la rilevazione PRC.
4. Nel ciclo Lyra Direct SARS-CoV-2, selezionare il pulsante **Analysis** (Analisi) nella barra del modulo
 - a. Scegliere **Abs Quant/Fit Points** (Quant Abs/Punti adattamento)
 - b. Nella finestra popup **Create New Analysis** (Crea nuova analisi), selezionare il sottoinsieme predefinito dal menu a discesa **subset** (sottoinsieme), quindi selezionare il pulsante di selezione
 - c. Fare clic su **Background** (Sfondo) per tutti gli analiti
 - i. Impostare **Min Offset** (Scarto minimo) su 1
 - ii. Impostare **Max Offset** (Scarto massimo) su 9
 - d. Nella parte centrale inferiore dello schermo, assicurarsi che **Color Compensation** (Compensazione colore) sia spenta per tutti gli analiti
 - e. Cambiare le impostazioni predefinite in **First Cycle** (Primo ciclo) su 7 e confermare **Last Cycle** (Ultimo ciclo) su 40
5. Nella parte centrale superiore dello schermo, selezionare **Noise Band** (Banda di rumore)
6. Scegliere **Filter Comb 465-510**
7. Scegliere il menu a discesa accanto al pulsante **Noise Band** (Banda di rumore) e selezionare quanto segue:
 - a. SARS-CoV-2 Noiseband Fluorescence (Banda di rumore fluorescenza del SARS-CoV-2). Impostare su 1,5
8. Scegliere **Calculate** (Calcola) in basso a sinistra nello schermo
9. Salvare il nuovo protocollo di analisi SARS-CoV-2 come modello per usi futuri.
 - a. Nell'angolo inferiore sinistro dello schermo, selezionare il menu a discesa accanto al pulsante **Apply Template** (Usa modello)
 - b. Scegliere **Save as Template** (Salva come modello)
 - c. Selezionare **Templates Folder** (Cartella modelli)
 - d. Evidenziare **Analysis Templates Folder** (Cartella modelli analisi)
 - e. Denominare il modello di analisi Lyra Direct SARS-CoV-2 465-510 e fare clic sul pulsante di selezione
10. Tornare indietro per avviare e scegliere **Filter Comb 618-660**
11. Scegliere il menu a discesa accanto al pulsante **Noise Band** (Banda di rumore) e selezionare quanto segue:
 - a. PRC Noiseband Auto (Banda di rumore PRC automatica)
12. Scegliere **Calculate** (Calcola) in basso a sinistra nello schermo

13. Salvare il protocollo di analisi SARS-CoV-2 come modello per usi futuri
 - a. Nell'angolo inferiore sinistro dello schermo, selezionare il menu a discesa accanto al pulsante **Apply Template** (Usa modello)
 - b. Scegliere **Save as Template** (Salva come modello)
 - c. Selezionare **Templates Folder** (Cartella modelli)
 - d. Evidenziare **Analysis Templates Folder** (Cartella modelli analisi)
 - e. Denominare il modello di analisi Lyra Direct SARS-CoV-2_618-660 e fare clic sul pulsante di selezione
14. Creare un rapporto
 - a. Selezionare l'icona **Save** (Salva) nella barra delle azioni globale sul lato destro dello schermo
 - b. Eseguire quest'azione sotto ogni canale analizzato
 - c. Scegliere il pulsante **Report** sulla barra del modulo sul lato sinistro dello schermo
 - d. Selezionare le impostazioni appropriate e premere il pulsante **Generate** (Genera)
15. Per applicare un modello di analisi a cicli successivi
 - a. Una volta terminato il ciclo, selezionare il pulsante **Analysis** (Analisi) nella barra del modulo
 - b. Scegliere **Abs Quant/Fit Points** (Quant Abs/Punti adattamento)
 - c. Nella finestra popup **Create New Analysis** (Crea nuova analisi), selezionare il sottoinsieme predefinito dal menu a discesa **subset** (sottoinsieme), quindi selezionare il pulsante di selezione
 - d. Selezionare il pulsante **Apply Template** (Usa modello) all'estrema sinistra dello schermo e scegliere il modello di analisi Lyra Direct SARS-CoV-2_465-510 o Lyra Direct SARS-CoV-2_618-660 dalla **Analysis Templates Folder** (Cartella modelli analisi)
 - e. Selezionare yes (sì) nella finestra popup
16. Interpretazione dei risultati (vedere Tabella 5)

Istruzioni per la programmazione di Roche cobas z 480 Instrument

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

Creazione di un modello di ciclo di dosaggio con cobas z 480

1. Avviare il programma software di cobas Z 480
2. È necessario stabilire il **Detection Format** (Formato rilevazione) per specificare i canali in cui verrà letta la fluorescenza
 - a. Selezionare **Tools** (Strumenti) in basso a destra nello schermo di avvio
 - b. Selezionare **Detection Formats** (Formati rilevazione), quindi scegliere **New** (Nuovo)
 - c. Denominare il formato Lyra Direct SARS-CoV-2
 - d. Nella finestra **Filter Combination Selection** (Selezione combinazione filtri), selezionare 465-510 e 610-670
 - e. Nella finestra **Selected Filter Combination List** (Elenco combinazioni filtri selezionate), digitare SARS-CoV-2 per 465-510 e PRC per 610-670
 - f. Lasciare i valori predefiniti su 1 in Melt Factor (Fattore Melt), Quant Factor (Fattore Quant) e Max Integration Time (Tempo massimo integrazione)
 - g. Selezionare **Close** (Chiudi) per salvare il nuovo formato di rilevazione e tornare allo schermo iniziale
 - h. Per accedere al nuovo **Detection Format** (Formato rilevazione), è necessario chiudere e quindi ricaricare il software cobas z 480
3. Dopo aver chiuso e ricaricato il software, selezionare **White Plates** (Piastrine bianche) e **New Experiment** (Nuovo esperimento) nella finestra Experiment Creation (Creazione esperimento)
4. Nella schermata successiva, selezionare "Lyra Direct SARS-CoV-2" dal menu a discesa in **Detection Formats** (Formati rilevazione)
5. Immettere **20 µl** come **Reaction Volume** (Volume di reazione) nella parte superiore destra dello schermo
6. Immettere i nomi per ciascuno dei programmi di RT-PCR
 - a. In **Program Name** (Nome programma) immettere **Stage 1** (Fase 1), in **Cycles** (Cicli) immettere **1** e in **Analysis Mode** (Modalità analisi) selezionare **none** (nessuna)
 - b. Selezionare l'icona "+" per aggiungere un programma
 - c. Denominare il programma successivo **Stage 2** (Fase 2), in **Cycles** (Cicli) immettere **1** e in **Analysis Mode** (Modalità analisi) selezionare **none** (nessuna)
 - d. Selezionare l'icona "+" per aggiungere un programma
 - e. Denominare il programma successivo **Stage 3** (Fase 3), in **Cycles** (Cicli) immettere **1** e in **Analysis Mode** (Modalità analisi) selezionare **none** (nessuna)
 - f. Selezionare l'icona "+" per aggiungere un programma

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

Creazione di una procedura di analisi del dosaggio cobas z 480

1. Caricare il modello di ciclo Lyra Direct SARS-CoV-2.
2. Premere Start (Avvio).
3. Il modello di analisi può essere definito solo dopo aver completato l'esperimento iniziale; saranno definiti due modelli: uno per la rilevazione di SARS-CoV-2 e uno per la rilevazione PRC.
4. Nel ciclo Lyra Direct SARS-CoV-2, selezionare il pulsante **Analysis** (Analisi) nella barra del modulo
 - a. Scegliere **Abs Quant/Fit Points** (Quant Abs/Punti adattamento)
 - b. Nella finestra popup **Create New Analysis** (Crea nuova analisi), selezionare il sottoinsieme predefinito dal menu a discesa **subset** (sottoinsieme), quindi selezionare il pulsante di selezione
 - c. Fare clic su **Background** (Sfondo) per tutti gli analiti
 - i. Impostare **Min Offset** (Scarto minimo) su **1**
 - ii. Impostare **Max Offset** (Scarto massimo) su **9**

- d. Nella parte centrale inferiore dello schermo, assicurarsi che **Color Compensation** (Compensazione colore) sia spenta per tutti gli analiti
- e. Cambiare l'impostazione predefinita in **First Cycle** (Primo ciclo) su 7 e confermare **Last Cycle** (Ultimo ciclo) su 40
5. Nella parte centrale superiore dello schermo, selezionare **Noise Band** (Banda di rumore)
6. Scegliere **Filter Comb** 465-510
7. Scegliere il menu a discesa accanto al pulsante **Noise Band** (Banda di rumore) e selezionare quanto segue:
 - a. SARS-CoV-2 Noiseband Fluorescence (Banda di rumore fluorescenza del SARS-CoV-2). Impostare su 1,5
8. Scegliere **Calculate** (Calcola) in basso a sinistra nello schermo
9. Salvare il protocollo di analisi SARS-CoV-2 come modello per usi futuri
 - a. Nell'angolo inferiore sinistro dello schermo, selezionare il menu a discesa accanto al pulsante **Apply Template** (Usa modello)
 - b. Scegliere **Save as Template** (Salva come modello)
 - c. Selezionare **Templates Folder** (Cartella modelli)
 - d. Evidenziare **Analysis Templates Folder** (Cartella modelli analisi)
 - e. Denominare il modello di analisi Lyra Direct SARS-CoV-2_465-510 e fare clic sul pulsante di selezione
10. Tornare indietro per avviare e scegliere **Filter Comb** 610-670
11. Scegliere il menu a discesa accanto al pulsante **Noise Band** (Banda di rumore) e selezionare quanto segue:
 - a. PRC Noiseband Auto (Banda di rumore PRC automatica)
12. Scegliere **Calculate** (Calcola) in basso a sinistra nello schermo
13. Salvare il protocollo di analisi SARS-CoV-2 come modello per usi futuri
 - a. Nell'angolo inferiore sinistro dello schermo, selezionare il menu a discesa accanto al pulsante **Apply Template** (Usa modello)
 - b. Scegliere **Save as Template** (Salva come modello)
 - c. Selezionare **Templates Folder** (Cartella modelli)
 - d. Evidenziare **Analysis Templates Folder** (Cartella modelli analisi)
 - e. Denominare il modello di analisi Lyra Direct SARS-CoV-2_610-670 e fare clic sul pulsante di selezione
14. Creare un rapporto
 - a. Selezionare l'icona **Save** (Salva) nella barra delle azioni globale sul lato destro dello schermo
 - b. Eseguire quest'azione sotto ogni canale analizzato
 - c. Scegliere il pulsante **Report** sulla barra del modulo sul lato sinistro dello schermo
 - d. Selezionare le impostazioni appropriate e premere il pulsante **Generate** (Genera)
15. Per applicare un modello di analisi a cicli successivi
 - a. Una volta terminato il ciclo, selezionare il pulsante **Analysis** (Analisi) nella barra del modulo
 - b. Scegliere **Abs Quant/Fit Points** (Quant Abs/Punti adattamento)
 - c. Nella finestra popup **Create New Analysis** (Crea nuova analisi), selezionare il sottoinsieme predefinito dal menu a discesa **subset** (sottoinsieme), quindi selezionare il pulsante di selezione
 - d. Selezionare il pulsante **Apply Template** (Usa modello) all'estrema sinistra dello schermo e scegliere il modello di analisi Lyra Direct SARS-CoV-2_465-510 o Lyra Direct SARS-CoV-2_610-670 dalla **Analysis Templates Folder** (Cartella modelli analisi)
 - e. Selezionare yes (sì) nella finestra popup
16. Interpretazione dei risultati (vedere Tabella 5)

Istruzioni per la programmazione di Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro

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

Istruzioni per la programmazione del ciclo di analisi di Thermo Fisher QuantStudio 7 Pro:

1. Aprire il software Design and Analysis (Progettazione e analisi)
2. Selezionare l'opzione "SET UP PLATE" (IMPOSTA PIASTRA)
3. Dalla barra laterale sullo schermo, selezionare le seguenti proprietà da filtrare:
 - a. Instrument (Strumento) – QuantStudio 7 Pro
 - b. Block (Blocco) – 96-Well 0.2 mL (96 pozzetti da 0,2 ml)
 - c. Run Mode (Modalità ciclo) – Fast (Rapida)
 - d. Le opzioni di analisi vengono lasciate vuote
4. Dalle selezioni della piastra presenti sullo schermo, selezionare il modello di sistema "Presence/Absence" (Presenza/assenza) e il sistema andrà automaticamente alla scheda "Run Method" (Esegui metodo)
5. Esegui metodo

- a. Modificare il volume di reazione a 20,0 µl
- b. La temperatura della copertura riscaldata abilitata resta di 105,0 gradi C
- c. Scorrere sulla fase Hold (Attesa) presente nei parametri di ciclo per visualizzare i pulsanti di addizione/sottrazione sia nella parte superiore sia nella parte inferiore della prima fase.
- d. Fare clic con il pulsante sinistro del mouse sul pulsante di addizione destro in alto: verrà visualizzato un elenco delle possibilità di scelta della fase. Scorrere verso il basso e scegliere Hold (Attesa).
- e. Ripetere i passaggi precedenti in modo che nei parametri di ciclo siano presenti tre fasi di attesa.
- f. Scorrere sulla fase PCR per visualizzare i pulsanti di addizione/sottrazione in alto e in basso. Fare clic con il pulsante sinistro del mouse sul pulsante di addizione destro in alto: verrà visualizzato un elenco delle possibilità di scelta della fase. Scorrere verso il basso e scegliere PCR.
- g. Tornare alla prima fase e immettere i seguenti parametri:
 - i. Fase 1 Hold (Attesa)
 1. tasso di rampa 2,63
 2. 55 °C
 3. 5 minuti
 - ii. Fase 2 Hold (Attesa)
 1. tasso di rampa 2,63
 2. 60 °C
 3. 5 minuti
 - iii. Fase 3 Hold (Attesa)
 1. tasso di rampa 2,63
 2. 65 °C
 3. 5 minuti
 - iv. Fase 4 PCR
 1. Passaggio 1:
 - a. tasso di rampa 2,63
 - b. 92 °C
 - c. 5 secondi
 2. Passaggio 2:
 - a. tasso di rampa 2,32
 - b. 57 °C
 - c. 40 secondi
 - d. Fare clic sull'icona della fotocamera al Passaggio 2. Compare una finestra che chiede di confermare se disabilitare la raccolta dati durante questo passaggio. Fare clic su "Ok".
 - v. In fondo alla Fase 4 PCR, modificare il numero di cicli a 10
 - vi. Fase 5 PCR
 1. Passaggio 1:
 - a. tasso di rampa 2,63
 - b. 92 °C
 - c. 5 secondi
 2. Passaggio 2:
 - a. tasso di rampa 2,32
 - b. 57 °C
 - c. 40 secondi
 - d. Assicurarsi che l'immagine dell'icona della fotocamera sia evidenziata/attivata per la raccolta dati durante i 30 cicli della Fase 5, Passaggio 2.
 - vii. In fondo alla Fase 5 PCR, modificare il numero di cicli a 30
 - h. Scorrere verso l'alto e scegliere la scheda "Plate Setup" (Configurazione piastra) nella parte superiore dello schermo.
6. Configurazione piastra
 - a. Modificare Passive Reference (Riferimento passivo) su "NONE" (NESSUNO)
 - b. Sul lato inferiore destro dello schermo, assicurarsi che sia stata selezionata la scheda Target, quindi evidenziare e premere il pulsante di addizione per aggiungere "Target 1". Premere nuovamente per aggiungere "Target 2".
 - c. Fare clic sulla casella "Target 1" e modificare il nome a CoV-2.
 - d. Fare clic sulla casella reporter associata sotto alla scheda Reporter e scegliere FAM dal menu a discesa.

- e. Fare clic sulla casella “Target 2” e modificare il nome in PRC.
- f. Fare clic sulla casella reporter associata sotto alla scheda Reporter e scegliere CY5 dal menu a discesa.
- g. Evidenziare il pulsante “Actions” (Azioni) situato sul lato superiore destro dello schermo e premere il pulsante a discesa. Nel menu a discesa, scegliere “Analysis Setting” (Impostazione analisi)
- h. In Analysis Setting (Impostazione analisi), disabilitare le seguenti opzioni per tutti i target:
 - i. Use Default Column (Usa colonna predefinita)
 - ii. Auto Threshold Column (Colonna soglia automatica)
 - iii. Auto Baseline Column (Colonna basale automatico)
 - iv. Baseline Start (Avvio basale) e Baseline End (Termine basale) dovrebbero visualizzare i valori predefiniti 3 e 15
- i. In “Threshold” (Soglia), fare clic sulla casella associata al target CoV e immettere 40000.
- j. In “Threshold” (Soglia), fare clic sulla casella associata al target PRC e immettere 10000.
- k. Fare clic su “Save” (Salva).
- l. Ritornare al pulsante “Actions” (Azioni) e premere il pulsante a discesa, scegliendo “Save As” (Salva con nome). Questo consente di salvare il modello in un percorso di propria scelta. Salvare il modello come “Lyra Direct SARS Cov-2 Assay”.

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

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

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

1. Aprire il modello Lyra Direct SARS CoV-2 Assay generato in precedenza.
2. Fare clic sulla Plate Setup Tab (Scheda configurazione piastra) situata nella parte superiore dello schermo.
3. Sul lato destro dello schermo, assicurarsi che la scheda “Samples” (Campioni) sia evidenziata e premere il pulsante di addizione per aggiungere il numero di campioni da analizzare.
4. Fare clic sulla casella “Sample 1” (Campione 1) per rinominare il campione. Ripetere questo passaggio per tutti gli altri campioni che verranno immessi.
5. Fare clic sul pozzetto situato nella mappa della piastra, quindi selezionare la casella accanto al nome del campione nella barra laterale destra per associare il nome al pozzetto.
 - a. L'utente ha anche la possibilità di evidenziare la posizione del pozzetto sulla mappa della piastra e di fare clic sulla casella “Enter sample” (Inserisci campione). Immettere l'ID del campione e premere TAB per passare al pozzetto successivo sulla mappa della piastra. In tal modo, il nome del campione viene automaticamente caricato nella barra laterale.
6. Dopo aver immesso i nomi dei campioni, è possibile evidenziare i pozzetti facendo clic con il tasto sinistro del mouse sul pozzetto iniziale e trascinando il mouse sui pozzetti associati nel ciclo. Per scegliere i target, fare clic sulle caselle di controllo accanto a ciascun target sulla barra laterale.
7. Fare clic sul pulsante Actions (Azioni) sulla parte superiore destra dello schermo e scegliere “Save As” (Salva con nome) nel menu a discesa.
 - a. Viene visualizzata una finestra popup che richiede all'utente di assegnare un nome al file sulla base delle informazioni relative al ciclo di analisi del campione e alla posizione del file da salvare.
 - b. Salvare il file del ciclo di analisi con il nuovo nome (.edt) in un supporto USB inserito nel computer.
8. Trasferire il supporto USB nella porta sulla parte anteriore dello strumento.
9. Tra le opzioni visualizzate sullo schermo dello strumento, premere “Load plate file” (Carica file piastra). QuantStudio 7 è un dispositivo con touchscreen.
10. Sullo schermo “Run Queue” (Coda ciclo), premere “USB drive” (Drive USB) sulla destra. Verranno visualizzati tutti gli eventuali file piastra salvati sul supporto USB.
11. Premere il file piastra associato al ciclo da eseguire.
12. Viene visualizzata una nuova finestra che richiede la posizione dei risultati al termine del ciclo.
 - a. Premere “USB drive Connected” (Unità USB connessa) se l'icona non è già evidenziata e premere “Done” (Fatto).
13. Centrifugare la piastra campioni a 96 pozzetti per assicurare che tutto il liquido si trovi verso il fondo di ciascun pozzetto.
 - a. Assicurarsi che la centrifuga sia ben equilibrata.
 - b. Estrarre delicatamente la piastra dalla centrifuga per assicurarsi che tutti i liquidi restino sul fondo dei pozzetti.

14. Premere l'icona con doppia freccia situata nell'angolo superiore destro dello schermo dello strumento.
 - a. Il cassetto dello strumento si apre sul davanti.
15. Collocare la piastra centrifugata sul portapiastre accertandosi che l'orientamento della piastra sia corretto.
 - a. Il pozzetto A1 deve trovarsi nell'angolo superiore sinistro.
 - b. La piastra apparirà leggermente sospesa sul blocco a causa di due strisce in silicone situate sopra e sotto la piastra. Ciò è normale, e il coperchio dello strumento schiaccerà la piastra verso il basso dopo aver chiuso il cassetto.
16. Premere "Start Run" (Avvia ciclo) sullo schermo dello strumento.
 - a. Comparirà una finestra popup che richiede all'utente di confermare che la piastra sia stata caricata.
 - b. In caso affermativo, premere nuovamente "Start Run" (Avvia ciclo), oppure premere "Open Drawer" (Apri cassetto) per collocare la piastra nel blocco, quindi premere "Start Run" (Avvia ciclo).
17. Interpretazione dei risultati (vedere Tabella 5)



Kit M124 – Lyra Direct SARS-CoV-2 Assay



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germania



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

PIM124101IT00 (06/21)

GLOSSARIO

REF

N. di catalogo



Marchio di conformità CE

EC REP

Rappresentante autorizzato
nella Comunità Europea

LOT

Codice lotto



Data di scadenza



Fabbricante



Limite di temperatura



Uso previsto

R_x ONLY

Soggetto a prescrizione medica



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



Rischi biologici

IVD

Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*



Contiene materiale sufficiente per <n>
determinazioni

CONT

Contenuto/Contiene

CONTROL

Controllo
