



Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit
K1180A
















Istruzioni per l'uso

Per uso diagnostico in vitro

Solo per l'esportazione. Non in vendita negli Stati Uniti.

Revisione B2, Maggio 2022

Tabella dei simboli

	Conformità europea		Attenzione
	Dispositivo medico per diagnostica in vitro		Codice/numero di catalogo
	Produttore		Consultare le istruzioni per l'uso
	Data di scadenza		Contenuto sufficiente per test <N>
	Codice lotto		Non riutilizzare
	Limite di temperatura		Identificazione unica dei dispositivi
	Rappresentante autorizzato per la Comunità Europea		

Avviso per l'acquirente: Licenza limitata

Questo prodotto è venduto in base ad accordi di licenza tra Agilent e Life Technologies Corporation. Il prezzo di acquisto di questo prodotto include diritti limitati e non trasferibili di proprietà di Life Technologies Corporation per utilizzare solo questa quantità del prodotto per l'uso nei test *in vitro* di SARS-CoV-2 nell'uomo in conformità alle istruzioni per l'uso che accompagnano questo prodotto. Non vengono trasmessi altri diritti. Ulteriori informazioni sull'acquisto di licenze ai sensi del suddetto brevetto possono essere ottenute contattando Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. E-mail: outlicensing@lifetech.com.

1 Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit Informazioni sul prodotto

Uso previsto	6
Descrizione del prodotto	7
Panoramica del prodotto/Principio del test	7
Descrizione dei passaggi del test	7
Materiali di controllo da usare con Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit	7
Flusso di lavoro dell'analisi	9

2 Materiali, sicurezza e manipolazione

Materiali forniti	11
Reagenti, materiali, attrezzatura e software necessari ma non forniti	12
Precauzioni di sicurezza	15
Conservazione e manipolazione	17
Imballaggio del prodotto	17
Conservazione, manipolazione e stabilità dei reagenti	17
Raccolta, manipolazione e conservazione dei campioni	17

3 Istruzioni per l'estrazione degli acidi nucleici

Estrazione degli acidi nucleici	19
---------------------------------	----

4 Istruzioni per la preparazione delle reazioni qRT-PCR

Impostazione dell'esperimento con qRT-PCR sul sistema PCR in tempo reale	21
Creazione e impostazione dell'esperimento AriaMx/AriaDx (necessario se non è stato ancora creato un modello)	22
Creazione dell'esperimento AriaMx/AriaDx dal modello salvato	27
Creazione e impostazione dell'esperimento ABI 7500 Fast (necessario se non è stato ancora creato un modello)	27
Creazione dell'esperimento ABI 7500 Fast dal modello salvato	33
Creazione e impostazione dell'esperimento PCR Bio-Rad CFX96 Touch in tempo reale (necessario se il protocollo salvato e i file della piastra non sono ancora stati creati)	34
Creazione dell'esperimento PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96 Touch dai file di protocollo e piastra salvati	40
Preparazione delle reazioni qRT-PCR	41

5 Istruzioni per l'esecuzione di qRT-PCR

Esecuzione di qRT-PCR sul sistema PCR in tempo reale Agilent AriaMx/AriaDx	46
Esecuzione del programma qRT-PCR sul sistema AriaMx/AriaDx	46
Assegnazione delle impostazioni di analisi dei dati per l'esperimento AriaMx/AriaDx	47
Esportazione dei dati dal software Aria	51

Esecuzione di qRT-PCR sullo strumento PCR in tempo reale ABI 7500 Fast	54
Esecuzione del programma qRT-PCR sullo strumento PCR in tempo reale ABI 7500 Fast	54
Assegnazione delle impostazioni di analisi dei dati per l'esperimento ABI 7500 Fast	54
Esportazione dei dati della tabella dei pozzetti dal software Design & Analysis in un file CSV	59
Esecuzione di qRT-PCR sul sistema di rilevazione PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96 Touch	61
Esecuzione del programma qRT-PCR sul sistema di rilevazione PCR in tempo reale CFX96 Touch	61
Assegnazione delle impostazioni di analisi dei dati per il sistema di rilevazione PCR in tempo reale CFX96 Touch	61
Esportazione dei dati dal software CFX Maestro	66

6 Analisi e risultati

Interpretazione dei risultati	69
Risultati e interpretazione per i campioni di controllo	69
Risultati e interpretazione per i campioni clinici	70

7 Controllo della qualità

Controllo della qualità	73
-------------------------	----

8 Limiti delle analisi

Limiti	75
--------	----

9 Caratteristiche prestazionali

Caratteristiche prestazionali	77
Sensibilità analitica (limite di rilevamento)	77
Inclusività analitica	78
Reattività crociata	78
Valutazione clinica	78

10 Riferimenti

Etichette dei prodotti	81
------------------------	----

1

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit Informazioni sul prodotto

Uso previsto	6
Descrizione del prodotto	7
Flusso di lavoro dell'analisi	9

Questo capitolo contiene informazioni introduttive sull'analisi.

Uso previsto

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit è un test diagnostico in vitro con RT-PCR in tempo reale destinato al rilevamento qualitativo dell'RNA di SARS-CoV-2 isolato e purificato da campioni di tamponi nasofaringei (NP), nasali e orofaringei (OP) ottenuti da individui che soddisfano i criteri clinici e/o epidemiologici per COVID-19.*

I risultati servono a identificare l'RNA di SARS-CoV-2. L'RNA di SARS-CoV-2 è generalmente rilevabile nei campioni delle vie respiratorie superiori durante la fase acuta dell'infezione. I risultati positivi sono indicativi della presenza dell'RNA di SARS-CoV-2; è necessaria una correlazione clinica con l'anamnesi del paziente e altre informazioni diagnostiche per determinare lo stato di infezione del paziente. I risultati positivi non escludono un'infezione batterica o una coinfezione con altri virus. L'agente rilevato potrebbe non essere la causa definita della malattia.

I risultati negativi non escludono l'infezione da SARS-CoV-2 e non dovrebbero essere usati come unica base per decidere il trattamento del paziente. I risultati negativi devono essere combinati con altre osservazioni cliniche, l'anamnesi del paziente e le informazioni epidemiologiche.

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit è destinato all'uso da parte di personale di laboratorio clinico qualificato e formato in modo specifico al funzionamento del sistema Agilent e alle procedure diagnostiche in vitro.

* Le prestazioni dell'analisi Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit sono state stabilite utilizzando campioni di tampone nasofaringeo raccolti in mezzi di trasporto UTM o VCM. I tamponi orofaringei, i tamponi nasali e i tamponi nasali del turbinato medio sono considerati tipi di campioni accettabili per l'uso con l'analisi Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ma le prestazioni con questi tipi di campioni non sono state stabilite. Il test di tamponi orofaringei, tamponi nasali e tamponi nasali del turbinato medio (raccolti autonomamente sotto la supervisione di un operatore sanitario o raccolti da quest'ultimo) è limitato ai pazienti con sintomi di COVID-19.

Descrizione del prodotto

Panoramica del prodotto/Principio del test

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit è un test di reazione a catena della polimerasi con trascrizione inversa (qRT-PCR) in tempo reale. I set di primer e sonde SARS-CoV-2 sono progettati per rilevare l'RNA di SARS-CoV-2 nei campioni di tamponi nasofaringei (NP), nasali e orofaringei (OP) di pazienti in cui si sospetta la presenza di COVID-19 da parte dell'operatore sanitario.

Descrizione dei passaggi del test

Gli acidi nucleici sono isolati e purificati da ~140-200 µl (a seconda del metodo di estrazione) di campioni di tamponi nasofaringei (NP) utilizzando un sistema di estrazione automatizzato (Qiagen QIAasympphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit con QIAasympphony, ThermoFisher MagMAX Viral/Pathogen II Kit con KingFisher Flex). L'acido nucleico purificato (5 µl) viene trascritto inversamente in cDNA e successivamente amplificato in una reazione qRT-PCR in unico passaggio utilizzando i reagenti qRT-PCR Agilent Brilliant III su strumenti PCR in tempo reale supportati. Nel processo, la sonda si combina a una specifica sequenza target situata tra i primer diretto e inverso. Durante la fase di estensione del ciclo di PCR, l'attività nucleasica 5' della *Taq* polimerasi degrada la sonda, causando la separazione del colorante reporter dal colorante quencher e generando un segnale fluorescente. Con ogni ciclo, ulteriori molecole di colorante reporter vengono scisse dalle rispettive sonde, aumentando l'intensità della fluorescenza. L'intensità della fluorescenza è monitorata a ogni ciclo di PCR dagli strumenti di PCR in tempo reale supportati (Agilent AriaMx/AriaDx, ABI 7500 Fast o Bio-Rad CFX96).

Materiali di controllo da usare con Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

- Un controllo "senza modello" (negativo) è necessario per controllare la contaminazione nel processo di analisi che può causare risultati falsamente positivi e deve essere usato almeno una volta per piastra PCR. L'utente aggiunge acqua al posto dell'RNA estratto per usarlo come controllo senza modello.
- Un controllo positivo del modello è necessario per assicurare che il meccanismo di rilevamento dell'RNA di SARS-CoV-2 target non sia compromesso e deve essere utilizzato almeno una volta per piastra PCR (50 copie/reazione). Il controllo positivo nel kit è un RNA sintetico corrispondente alle sequenze target virali.
- Un controllo dell'estrazione (Controllo dei Campioni Umani o HSC) è necessario per assicurare che l'RNA nel campione originale sia ben conservato durante l'estrazione e deve essere usato almeno una volta per lotto di estrazione.
- Un controllo interno (gene RNasi P umano) è necessario per assicurare che l'RNA del campione originale sia rilevabile nella reazione qRT-PCR. Ci si aspetta che venga rilevato nell'HSC e nella maggior parte dei campioni umani con sufficiente RNA cellulare. Nei campioni umani, il controllo interno potrebbe non essere rilevato se l'RNA virale di SARS-CoV-2 è presente ad alte concentrazioni.

Controlli forniti con il kit

Tabella 1 Controllo fornito con Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

Tipo di controllo	Nome del controllo	Nome del fornitore	C. p. fornitore
Positivo	Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx	Agilent	K1180-64200

Controlli necessari ma non forniti con il kit

- Acqua priva di nucleasi, di grado molecolare, da usare come controllo “senza modello” (negativo)
- Controllo dell'estrazione: diverse opzioni sono a disposizione del cliente in base alle raccomandazioni di CDC
 - Controllo dei Campioni Umani, prodotto da CDC, KT0189
 - Materiale del campione umano negativo: i laboratori possono preparare un volume di materiale di campione umano (ad es. sieri umani o campioni respiratori negativi in pool) da estrarre e analizzare insieme ai campioni clinici come controllo dell'estrazione. Questo materiale dovrebbe essere preparato in un volume sufficiente per essere utilizzato in più corse. Il materiale dovrebbe essere testato prima dell'uso come controllo dell'estrazione per assicurarsi che generi i risultati previsti per gli HSC elencati in queste istruzioni per l'uso.
 - Materiale del campione umano programmato: i laboratori possono preparare campioni umani artificiali sospendendo qualsiasi linea cellulare umana (ad es. A549, Hela o 293) in PBS. Questo materiale dovrebbe essere preparato in un volume sufficiente per essere utilizzato in più corse. Il materiale dovrebbe essere testato prima dell'uso come controllo dell'estrazione per assicurarsi che generi i risultati previsti per gli HSC elencati in queste istruzioni per l'uso.

Flusso di lavoro dell'analisi

Per iniziare l'analisi, estrarre l'acido nucleico dai campioni del test nasofaringeo insieme a un adeguato Controllo dei Campioni Umani.

Successivamente, eseguire un esperimento qRT-PCR multiplex utilizzando i campioni di RNA estratti e il controllo RNA positivo fornito. Includere un No Template Control (NTC, Controllo senza modello).

Al completamento della corsa qRT-PCR, analizzare i dati per l'amplificazione dei target virali N1 e N2 e il target del gene RNase P umano.

Infine, riportare i risultati dei campioni del test.

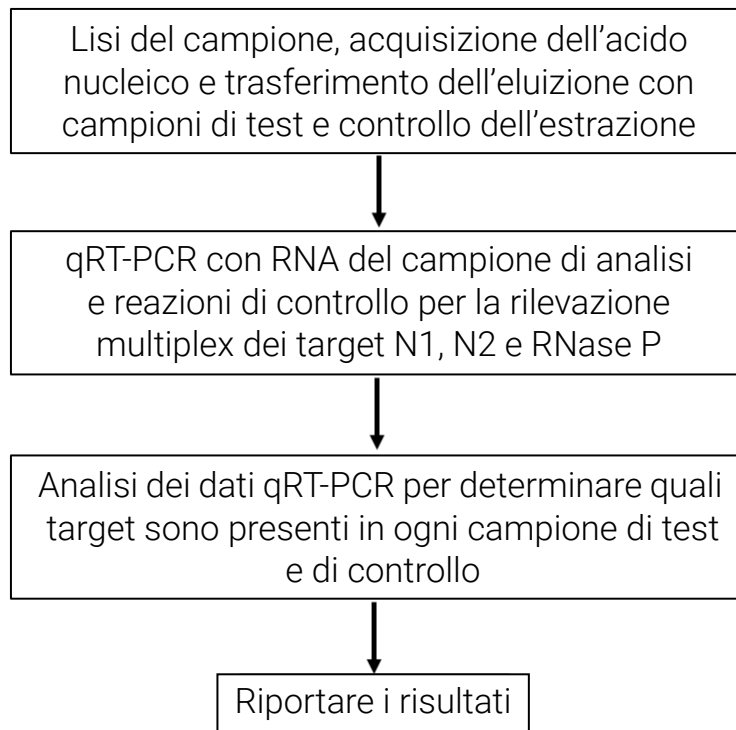


Figura 1 Flusso di lavoro dell'analisi SARS-CoV2 qRT-PCR Dx

2 **Materiali, sicurezza e manipolazione**

Materiali forniti	11
Reagenti, materiali, attrezzatura e software necessari ma non forniti	12
Precauzioni di sicurezza	15
Conservazione e manipolazione	17

Questo capitolo descrive i reagenti e gli altri materiali utilizzati nell'analisi e fornisce le informazioni per l'esecuzione in sicurezza dell'analisi.

Materiali forniti

Tabella 2 elenca i materiali forniti con Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit e i relativi requisiti di temperatura. Vedere la sezione **“Conservazione e manipolazione”** a pagina 17 per ulteriori istruzioni sulla conservazione dei materiali.

Tabella 2 Materiali forniti con Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, c/p K1180A

Materiali	Quantità	Componenti	Temperatura di conservazione
Reagenti Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx, c/p K1180-64100*	Sufficiente per 400 reazioni qRT-PCR (campioni di test e controlli) <i>Ogni piastra di reazione qRT-PCR deve includere almeno 3 pozzetti per le reazioni di controllo.</i>	2 Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	Conservare a -20 °C alla ricezione.
		RT/RNase Block Dx	Conservare a -20 °C alla ricezione.
		Reference Dye Dx [†]	Conservare a -20 °C alla ricezione.
		100 mM DTT Dx	Conservare a -20 °C alla ricezione.
		10 SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx [†]	Conservare a -20 °C alla ricezione.
Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx, c/p K1180-64200 [‡]	Sufficiente per 8 test di analisi	SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Conservare a -80 °C alla ricezione.

* Il kit di reagenti SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx è venduto anche separatamente come Agilent c/p K1180B.

[†] Questo reagente è sensibile alla luce e deve essere tenuto lontano dalla luce quando possibile.

[‡] SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx è venduto anche separatamente come Agilent c/p K1180C.

Reagenti, materiali, attrezzature e software necessari ma non forniti

Tabella 3 elenca le opzioni per la fase di estrazione dell'RNA del protocollo, che viene eseguita su uno strumento per l'automazione. La procedura di estrazione dell'RNA è descritta in **"Istruzioni per l'estrazione degli acidi nucleici"** a pagina 18.

Tabella 3 Opzioni di estrazione dell'RNA: necessario ma non fornito

Kit di estrazione dell'RNA	Strumento
QIAGEN QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, c/p 937055	QIAGEN QIAAsymphony SP, c/p 9001297 (automazione)
Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, Thermo Fisher c/p A48383	Thermo Fisher Scientific KingFisher Flex Purification System, c/p 5400630 (automazione)

Tabella 4 elenca le opzioni per il Controllo dei Campioni Umani. Questo campione di controllo è una preparazione di coltura cellulare umana usata come controllo della procedura di estrazione per dimostrare l'esito positivo del recupero dell'acido nucleico, nonché l'integrità del reagente di estrazione.

Tabella 4 Opzioni del Controllo dei Campioni Umani: necessario ma non fornito

Controllo dei Campioni Umani	Descrizione
Controllo dei Campioni Umani (HSC), 10 fiale x 500 µl, CDC c/p KT0189	Prodotto e venduto dal CDC. L'HSC del CDC consiste in materiale cellulare umano coltivato non infettivo (trattato con beta-propiolattone) fornito come un liquido sospeso in PBS 0,01 M a pH 7,2-7,4.
Materiale del campione umano negativo	Preparato dal laboratorio. Questo tipo di Controllo dei Campioni Umani è un volume di materiale di campione umano (ad es. sieri umani o campioni respiratori negativi in pool) da estrarre e analizzare insieme ai campioni clinici come controllo dell'estrazione. Questo materiale dovrebbe essere preparato in un volume sufficiente per essere utilizzato in più corse. Il materiale dovrebbe essere testato prima dell'uso come controllo dell'estrazione per assicurarsi che generi i risultati previsti per gli HSC elencati in queste istruzioni per l'uso.
Materiale del campione umano programmato	Preparato dal laboratorio. Questo tipo di Controllo dei Campioni Umani è un materiale del campione umano programmato, preparato mediante qualsiasi linea cellulare umana (ad es. A549, HeLa o 293) in PBS. Questo materiale dovrebbe essere preparato in un volume sufficiente per essere utilizzato in più corse. Il materiale dovrebbe essere testato prima dell'uso come controllo dell'estrazione per assicurarsi che generi i risultati previsti per il Controllo dei Campioni Umani elencato in queste istruzioni per l'uso.

Nella **Tabella 5** e **Tabella 6** sono elencati i reagenti, i materiali, l'attrezzatura e gli strumenti necessari per il test ma non forniti con Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Tabella 5 Reagenti e materiali necessari ma non forniti

Reagente o materiale	Categoria
Acqua di grado molecolare, priva di nucleasi	Reagente
Soluzione di candeggina al 10% (diluizione 1:10 di candeggina al 5,25-6% di ipoclorito)	Materiale
DNAZap, Ambion c/p AM9890 o agente decontaminante equivalente	Materiale
RNase AWAY, Fisher Scientific p/n 21-236-21 o agente decontaminante equivalente	Materiale
Guanti privi di polvere e camici chirurgici monouso	Materiale
Puntali sterili per pipette, con barriera di contenimento degli aerosol, privi di nucleasi	Materiale
Provette per microcentrifuga da 1,5 ml prive di nucleasi	Materiale
Provette per microcentrifuga da 2 ml prive di nucleasi	Materiale
Piastre a 96 pozzetti privi di nucleasi, 200 µl <i>Utilizzare piastre compatibili con il sistema PCR in tempo reale selezionato</i>	Materiale
Strisce da 8 provette prive di nucleasi	Materiale
Sigilli adesivi per piastre prive di nucleasi, o strisce di tappi ottici da 8 privi di nucleasi per piastre PCR da 96 pozzetti <i>Utilizzare sigilli o strisce compatibili con il sistema PCR in tempo reale selezionato</i>	Materiale
Tamponi di compressione per pellicole ottiche MicroAmp, Thermo Fisher Scientific, c/p 4312639*	Materiale

* I cuscinetti di compressione sono necessari solo quando si usano guarnizioni adesive per sigillare le piastre per il sistema PCR in tempo reale AriaMx/AriaDx

Tabella 6 Altri strumenti, software e attrezzature necessari ma non forniti

Strumento, software o attrezzatura	Categoria
Sistema PCR in tempo reale <ul style="list-style-type: none"> Sistema PCR in tempo reale Agilent AriaMx (c/p G8830A) o sistema PCR in tempo reale AriaDx (c/p K8930AA) Software: Software Aria versione 1.71 o 1.8 e software di tracciamento elettronico (incluso con c/p K8930AA o disponibile separatamente come c/p G5380AA) Strumento PCR in tempo reale ABI 7500 Fast con computer portatile (c/p 4351106) o computer desktop (c/p 4351107) Software: Software 7500 versione 2.3 e software Design & Analysis versione 2.4.3 Sistema di rivelazione PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96 Touch (c/p 1855195) o sistema di rivelazione PCR in tempo reale CFX96 Touch con Starter Package (c/p 1855196) Software: CFX Maestro Software 2.0 versione 4.1.2 (incluso con c/p 1855196 o disponibile separatamente come c/p 12004110) 	Strumento con computer e software
Software per visualizzare i dati esportati dal software di PCR in tempo reale, ad esempio Microsoft Excel	Software
Miscelatore a vortice	Attrezzatura
Microcentrifuga	Attrezzatura
Centrifuga per piastre a 96 pozzetti	Attrezzatura

Tabella 6 Altri strumenti, software e attrezzature necessari ma non forniti (continued)

Strumento, software o attrezzatura	Categoria
Micropipettatori P10, P20, P200 e P1000	Attrezzatura
Pipettatori multicanale (5-50 μ l)	Attrezzatura
Rack per provette da microcentrifuga	Attrezzatura
Due (2) rack per il freddo da 96 pozzetti	Attrezzatura
Contenitore con ghiaccio	Attrezzatura

Precauzioni di sicurezza

- 1 Il flusso di lavoro Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit dovrebbe essere eseguito da personale qualificato e addestrato per evitare il rischio di risultati errati. Utilizzare aree separate per la preparazione dei campioni dei pazienti e dei controlli per evitare risultati falsi positivi.
- 2 Questo test è stato autorizzato solo per l'individuazione dell'acido nucleico di SARS-CoV-2, non per altri virus o agenti patogeni.
- 3 Leggere attentamente tutte le istruzioni per l'uso.
- 4 I campioni e i controlli devono sempre essere trattati come se fossero infettivi e/o a rischio biologico in conformità alle procedure di laboratorio sicure. Fare riferimento alle Linee guida provvisorie di biosicurezza del laboratorio per la manipolazione e il trattamento dei campioni associati al 2019-nCoV.
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>
- 5 Seguire le precauzioni necessarie quando si maneggiano i campioni. Utilizzare i dispositivi di protezione individuale (DPI) conformemente alle linee guida attuali per la manipolazione di campioni potenzialmente infettivi. In caso di fuoriuscita, disinfettare immediatamente.
- 6 I campioni possono essere infettivi. Usare le precauzioni universali quando si esegue questa analisi. I metodi di manipolazione e smaltimento appropriati devono essere stabiliti dal direttore del laboratorio. Solo il personale adeguatamente addestrato nella manipolazione di materiali infettivi dovrebbe essere autorizzato a eseguire questa procedura diagnostica.
- 7 Se si sospetta un'infezione da 2019-nCoV sulla base degli attuali criteri di screening clinici raccomandati dalle autorità sanitarie pubbliche, i campioni devono essere raccolti con le opportune precauzioni di controllo dell'infezione.
- 8 Utilizzare solo materiale da laboratorio monouso fornito o specificato.
- 9 Utilizzare sempre puntali per pipette con barriere di aerosol. Le punte utilizzate devono essere sterili e prive di DNasi e RNasi.
- 10 Le analisi basate sulla PCR sono sensibili all'introduzione accidentale di prodotti di amplificazione da precedenti reazioni PCR. Qualsiasi contaminazione dei campioni di test o dei reagenti può portare a un risultato errato. Il flusso di lavoro in laboratorio deve procedere in modo unidirezionale. Utilizzare le seguenti migliori prassi per prevenire la contaminazione dei prodotti PCR dei campioni durante il flusso di lavoro:
 - Assegnare workstation separate pre-PCR e post-PCR e usare forniture e reagenti dedicati in ogni area. In particolare, non usare mai materiali destinati al lavoro post-PCR per segmenti pre-PCR del flusso di lavoro. Utilizzare sempre pipettatori pre-PCR dedicati con puntali privi di nucleasi e resistenti all'aerosol per pipettare soluzioni pre-PCR dedicate.
 - Mantenere pulite le aree di lavoro. Pulire le superfici pre-PCR quotidianamente e tra un'analisi e l'altra utilizzando una soluzione di candeggina al 10% e/o un prodotto come DNAzap o RNase AWAY. Rimuovere i residui di candeggina con etanolo al 70%.
 - Indossare un camice pulito e guanti privi di polvere puliti. Praticare una buona igiene di laboratorio, compreso il cambio dei guanti dopo il contatto con qualsiasi superficie potenzialmente contaminata.
 - Cambiare i puntali delle pipette con barriera aerosol tra tutti i trasferimenti manuali di liquidi.

- Quando si estrae l'acido nucleico dai campioni, utilizzare una corretta tecnica asettica per ridurre al minimo il rischio di contaminazione crociata tra i campioni ed evitare l'introduzione involontaria di nucleasi nei campioni.
 - Quando possibile, tenere le provette dei reagenti e di reazione tappate o coperte.
- 11** Non mangiare, bere, fumare o applicare prodotti cosmetici nelle aree di lavoro.
 - 12** Non sono consentite modifiche ai reagenti dell'analisi, al protocollo dell'analisi o alla strumentazione.
 - 13** I reagenti devono essere conservati e manipolati come specificato nella **Tabella 2** a pagina 11 e nella **"Conservazione e manipolazione"** a pagina 17.
 - 14** Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza indicata.
 - 15** Smaltire i rifiuti in conformità ai regolamenti locali, statali e federali.
 - 16** Le schede di sicurezza sono disponibili su www.agilent.com.
 - 17** Non utilizzare materiale che possa contenere tiocianato di guanidinio o qualsiasi materiale contenente guanidina sullo strumento PCR in tempo reale. Composti altamente reattivi e/o tossici possono formarsi se combinati con ipoclorito di sodio (candeggina).
 - 18** Risultati positivi servono a identificare l'RNA di SARS-CoV-2.

Conservazione e manipolazione

Imballaggio del prodotto

Alla ricezione di Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, ispezionare attentamente la confezione del prodotto per rilevare eventuali segni visibili di danneggiamento. Se la confezione del prodotto risulta danneggiata, contattare l'assistenza tecnica Agilent.

Conservazione, manipolazione e stabilità dei reagenti

- Controllare sempre la data di scadenza prima dell'uso. Non utilizzare reagenti scaduti.
- Proteggere le sonde fluorogeniche dalla luce.
- I primer, le sonde (comprese le aliquote) e il master mix enzimatico devono essere scongelati e tenuti sempre in ghiaccio o in un rack per il freddo durante la preparazione e l'uso.
- I controlli devono essere scongelati e tenuti sempre su ghiaccio o su un rack per il freddo durante la preparazione e l'uso.
- Fare riferimento alla **Tabella 2** a pagina 11 per le temperature di conservazione dei reagenti Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Raccolta, manipolazione e conservazione dei campioni

La raccolta, la conservazione e il trasporto di campioni inadeguati o inappropriati possono produrre risultati falsi. La formazione nella raccolta dei campioni è altamente raccomandata in ragione dell'importanza della qualità dei campioni. Si può fare riferimento al CLSI MM13-A come risorsa appropriata.

- Raccolta del campione
 - Fare riferimento alle linee guida provvisorie per la raccolta, la manipolazione e l'analisi di campioni clinici da pazienti sotto indagine (PUI) per il nuovo coronavirus 2019 (2019-nCoV) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
 - Seguire le istruzioni del produttore del dispositivo di raccolta dei campioni per i metodi di raccolta corretti.
- Trasporto di campioni
 - Materiale clinico raccolto dal paziente posto in un sistema di trasporto appropriato. Per il sito Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, questo include i campioni NP nel mezzo di trasporto virale (VTM), nel mezzo di trasporto universale (UTM), nella soluzione fisiologica, nel Liquid Amies o nel mezzo di trasporto del campione (STM).

3 Istruzioni per l'estrazione degli acidi nucleici

Estrazione degli acidi nucleici **19**

Questo capitolo contiene le istruzioni per l'estrazione dell'RNA dai campioni di test clinici e dal Controllo dei Campioni Umani (Human Specimen Control, HSC).

Estrazione degli acidi nucleici

Le prestazioni di Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit dipendono dalla quantità e dalla qualità del modello di RNA purificato dai campioni umani. I seguenti kit e procedure di estrazione dell'RNA disponibili in commercio sono stati qualificati e convalidati per il recupero e la purezza dell'RNA da utilizzare con il kit.

Per l'estrazione del campione devono essere seguite le procedure raccomandate dal produttore (a eccezione di quanto indicato nelle raccomandazioni seguenti). Il Controllo dei Campioni Umani deve essere incluso in ogni lotto di estrazione.

QIAGEN QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, protocollo automazione

Indicazioni: utilizzare 140 µl di campione ed eluire con 60 µl di tampone.

MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, protocollo di automazione

Indicazioni: utilizzare 200 µl di campione ed eluire con 50 µl di tampone.

4 Istruzioni per la preparazione delle reazioni qRT-PCR

Impostazione dell'esperimento con qRT-PCR sul sistema PCR in tempo reale **21**
Preparazione delle reazioni qRT-PCR **41**

Questo capitolo contiene le istruzioni per la preparazione delle reazioni di PCR quantitativa con trascrizione inversa (qRT-PCR) per i campioni di test e i campioni di controllo.

Impostazione dell'esperimento con qRT-PCR sul sistema PCR in tempo reale

Prima di preparare la piastra di reazione per qRT-PCR, impostare l'esperimento nel sistema PCR in tempo reale in modo che lo strumento sia pronto a funzionare non appena la piastra di reazione viene preparata.

Seguire le istruzioni per lo specifico sistema PCR in tempo reale.

Sistema PCR in tempo reale Agilent AriaMx/AriaDx

- Vedere **“Creazione e impostazione dell'esperimento AriaMx/AriaDx (necessario se non è stato ancora creato un modello)”** a pagina 22 se non si dispone di un file modello con le impostazioni necessarie.
- Se invece si è in possesso di un file modello da utilizzare, vedere **“Creazione dell'esperimento AriaMx/AriaDx dal modello salvato”** a pagina 27.

NOTA

Accendere lo strumento AriaMx o AriaDx almeno 3 ore prima dell'uso. Lo strumento può essere lasciato sempre acceso per assicurarsi che sia sempre pronto all'uso.

Come da specifiche dello strumento, le condizioni operative sono 20-30 °C, umidità al 20-80% e ≤ 2.000 metri di altitudine.

Strumento PCR in tempo reale ABI 7500 Fast

- Vedere **“Creazione e impostazione dell'esperimento ABI 7500 Fast (necessario se non è stato ancora creato un modello)”** a pagina 27 se non si dispone di un file modello con le impostazioni necessarie.
- Se invece si è in possesso di un file modello da utilizzare, vedere **“Creazione dell'esperimento ABI 7500 Fast dal modello salvato”** a pagina 33.

Sistema di rilevazione PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96 Touch

- Vedere **“Creazione e impostazione dell'esperimento PCR Bio-Rad CFX96 Touch in tempo reale (necessario se il protocollo salvato e i file della piastra non sono ancora stati creati)”** a pagina 34 se non si dispone di un protocollo salvato e file delle piastre con le impostazioni necessarie.
- Se si dispone di un protocollo salvato e file delle piastre, vedere **“Creazione dell'esperimento PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96 Touch dai file di protocollo e piastra salvati”** a pagina 40.

Creazione e impostazione dell'esperimento AriaMx/AriaDx (necessario se non è stato ancora creato un modello)

Se esiste già un modello per l'esperimento, andare a **"Creazione dell'esperimento AriaMx/AriaDx dal modello salvato"** a pagina 27.

Fase 1. Creazione dell'esperimento

- 1 Dal computer collegato allo strumento, aprire l'applicazione software Aria alla schermata Getting Started.
- 2 In **New Experiment**, fare clic su **Experiment Types** (se non è già selezionato).
- 3 Al centro della schermata, selezionare **Quantitative PCR, Fluorescence Probe**, come mostrato nella **Figura 2**.

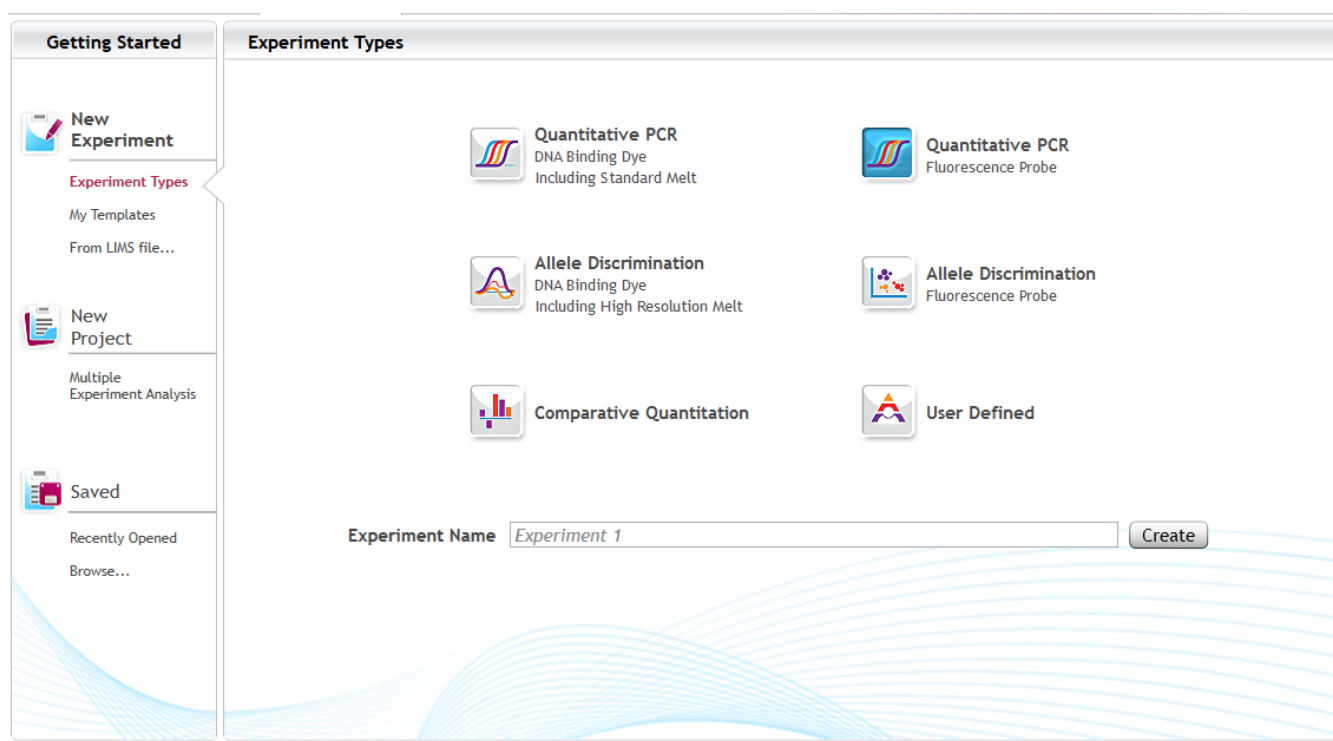


Figura 2 Schermata introduttiva Aria: selezione di **Quantitative PCR, Fluorescence Probe**

- 4 Digitare un nome per l'esperimento nel campo Experiment Name e fare clic su **Create**.

Il nuovo esperimento si apre nella schermata Plate Setup. Tutti i pozzetti nella mappa delle piastre sono selezionati per impostazione predefinita.

La selezione di tutti i 96 pozzetti è appropriata se tutti i pozzetti della piastra includeranno una reazione qRT-PCR. Se uno qualsiasi dei pozzetti della piastra è vuoto, deselegionare tali pozzetti in questo passaggio.

Fase 2. Assegnazione dei tipi di pozzetto e dei nomi dei pozzetti

- 5 Nel pannello Properties sul lato destro della schermata, espandere l'elenco a discesa **Well type** e selezionare **Unknown**.

Tutti i pozzetti sono contrassegnati come sconosciuti nella mappa delle piastre.

- 6 Assegnare il pozzetto A12 come No Template Control (NTC).

a Fare clic sul pozzetto A12 sulla mappa delle piastre per selezionare quel singolo pozzetto.

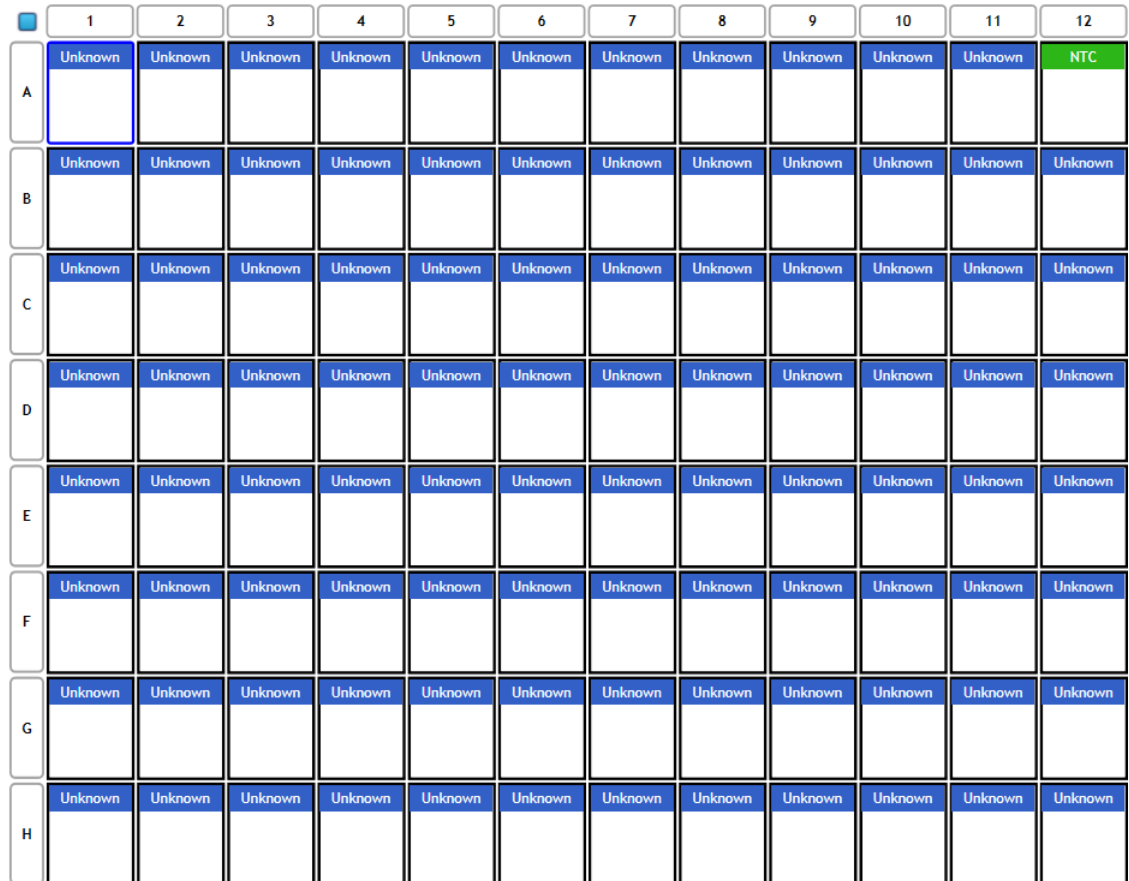
b Nel pannello Properties sul lato destro della schermata, espandere l'elenco a discesa **Well type** e selezionare **NTC**.

Il pozzetto A12 è contrassegnato come NTC nella mappa delle piastre, mentre tutti gli altri pozzetti rimangono assegnati al tipo di pozzetto sconosciuto.

- 7 Sulla mappa delle piastre, riselezionare tutti i pozzetti.

Facendo clic sulla casella di controllo nell'angolo in alto a sinistra della mappa delle piastre si selezionano tutti i pozzetti.

La configurazione della piastra appare ora come mostrato nella **Figura 3**.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	NTC
B	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
C	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
D	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
E	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
F	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
G	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
H	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown

Figura 3 Assegnazioni del tipo di pozzetto nella schermata Aria Plate Setup

- 8 Assegnare i nomi dei pozzetti ai pozzetti di controllo e, se desiderato, ai pozzetti utilizzati per i campioni di test. I nomi dei pozzetti da assegnare ai pozzetti di controllo sono indicati nella **Tabella 7**. È possibile assegnare i nomi dei pozzetti manualmente o importando un foglio di calcolo Excel o un file di testo delimitato da virgola che elenca gli ID dei pozzetti accanto ai nomi dei pozzetti da assegnare.
- Per assegnare manualmente i nomi dei pozzetti, cambiare l'impostazione di visualizzazione da **Type** a **Name**. Selezionare i pozzetti sulla piastra, quindi digitare il nome dei pozzetti selezionati nel campo Well Name.
 - Per assegnare i nomi dei pozzetti da un file Excel o di testo, fare clic con il pulsante destro del mouse sulla mappa delle piastre e selezionare **Import Well Name**. Nella finestra di dialogo che si apre, selezionare il file Excel o di testo. Consultare la guida di Aria per i requisiti di formattazione dei file.

Tabella 7 Assegnazioni dei nomi dei pozzetti per i pozzetti di controllo

ID pozzetto	Nome pozzetto
A12	NTC
B12	HSC*
H12	Pos

* Se si dispone di più di un campione di Controllo dei Campioni Umani che deve essere incluso nella piastra, utilizzare pozzetti aggiuntivi nella colonna 12 per tali reazioni e denominare i pozzetti di conseguenza (ad es. HSC1, HSC2, ecc.).

Fase 3. Assegnazione di coloranti e target

- 9 Nel pannello Properties, in **Add Dyes**, contrassegnare le caselle di controllo per FAM, HEX e Cy5.

I punti con codice colore per ciascuno dei coloranti contrassegnati appaiono in tutti i pozzetti della mappa delle piastre.

- 10 Nell'elenco a discesa Reference Dye, selezionare **ROX**.

Un punto con codice colore etichettato "R" viene visualizzato in tutti i pozzetti della mappa delle piastre.

- 11 Fare clic sulla freccia ► accanto a **Targets**.

- 12 Nei campi Target Name che vengono visualizzati, digitare i nomi target in base alla **Figura 4**.

Add Dyes		Targets
Use	Dye Name	Target Name
<input checked="" type="checkbox"/>	FAM	N1
<input checked="" type="checkbox"/>	ROX	
<input checked="" type="checkbox"/>	HEX	N2
<input checked="" type="checkbox"/>	CY5	RP
<input type="checkbox"/>	CY3	
<input type="checkbox"/>	ATTO425	
Reference Dye		ROX

Figura 4 Assegnazioni di colorante e target nella schermata Aria Plate Setup

Fase 4. Impostazione del profilo termico

13 Sul lato sinistro della schermata, in **Set Up**, fare clic su **Thermal Profile**.

La schermata Thermal Profile si apre mostrando il profilo termico predefinito.

14 Aggiungere un segmento RT all'inizio del programma di cicli.

- a Sul display, passare il cursore sul segmento Hot Start. Fare clic sull'icona + (come mostrato nella **Figura 5**) che viene visualizzato sul lato sinistro del segmento Hot Start.

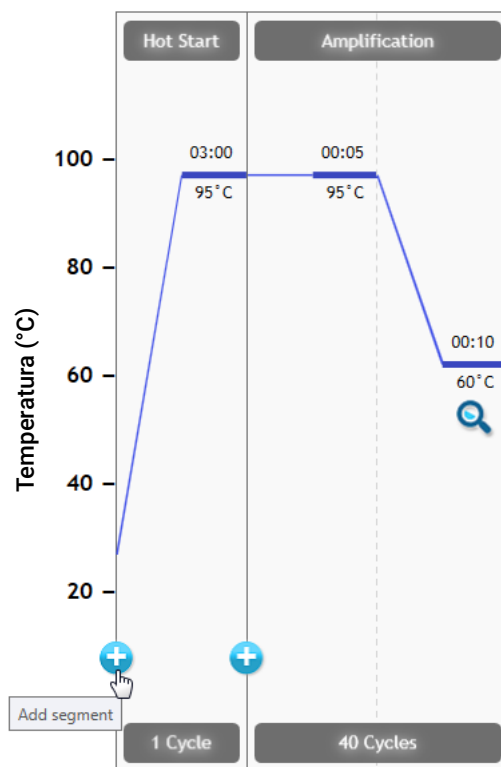


Figura 5 Aggiunta di un nuovo segmento nella schermata Aria Thermal Profile

Il programma apre un segnaposto per il nuovo segmento che elenca i tipi di segmento disponibili.

- b Nel segmento del segnaposto, fare clic su **RT**.
 Il profilo termico appare ora come mostrato nella **Figura 6**.

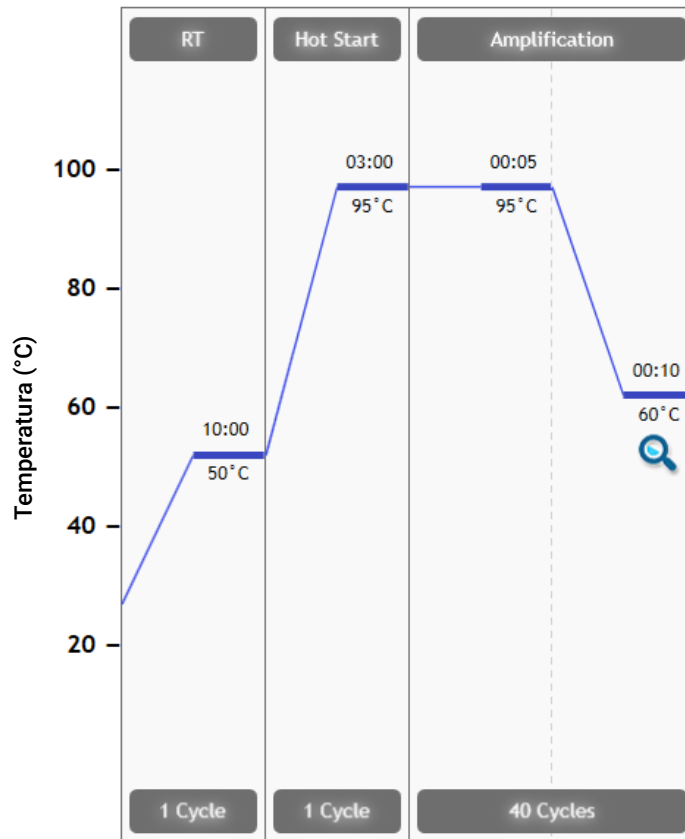


Figura 6 Profilo termico nella schermata Aria Thermal Profile

- 15** Assicurarsi che il profilo termico sulla schermata corrisponda al programma di cicli termici mostrato nella **Tabella 8**.

Tabella 8 Programma di cicli termici per il sistema PCR in tempo reale AriaMx/AriaDx

Numero segmento	Numero cicli	Durata	Temperatura
1	1	10 minuti	50 °C
2	1	3 minuti	95 °C
3	40	5 secondi	95 °C
		10 secondi	60 °C

Fase 5. Salvataggio dell'esperimento come modello

- 16** Fare clic su **File > Save As Template**.

Si apre la finestra di dialogo Save As. Il tipo di file è impostato su **AriaMx Template Files** (estensione file *amxt*) o **AriaDx Template Files** (estensione file *adxt*).

- 17 Selezionare una cartella per il nuovo modello.
- 18 Nel campo File name, digitare **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**.
- 19 Fare clic su **Save**.

La finestra di dialogo si chiude e il programma salva il nuovo file modello nella cartella designata.

Per analisi future, utilizzare il modello salvato per creare e impostare l'esperimento qRT-PCR come descritto in "**Creazione dell'esperimento AriaMx/AriaDx dal modello salvato**".

A questo punto, procedere direttamente a "**Preparazione delle reazioni qRT-PCR**" a pagina 41.

Creazione dell'esperimento AriaMx/AriaDx dal modello salvato

Se non è stato creato un modello dell'esperimento con l'impostazione della piastra e il profilo termico necessari, vedere "**Creazione e impostazione dell'esperimento AriaMx/AriaDx (necessario se non è stato ancora creato un modello)**" a pagina 22.

- 1 Dal computer collegato allo strumento, aprire l'applicazione software Aria alla schermata Getting Started.
- 2 In **New Experiment**, fare clic su **My Templates**.
- 3 Nel campo Experiment Name, digitare il nome per il nuovo esperimento.
- 4 Selezionare il modello **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** e creare l'esperimento.
 - Se il modello si trova nella cartella predefinita, fare clic direttamente sul modello per selezionarlo, quindi fare clic su **Create** (o doppio clic direttamente sul modello). Il programma crea il nuovo esperimento e lo apre nella schermata Plate Setup.
 - Se il modello non si trova nella cartella attualmente selezionata, fare clic sull'icona **Browse to Template** (mostrato sotto) per aprire la finestra del browser. Navigare nella cartella contenente il file modello di **SARS-CoV-2 qRT-PCR Agilent**. Selezionare il file e fare clic su **Open**. Il programma crea il nuovo esperimento e lo apre nella schermata Plate Setup.



A questo punto, procedere direttamente a "**Preparazione delle reazioni qRT-PCR**" a pagina 41.

Creazione e impostazione dell'esperimento ABI 7500 Fast (necessario se non è stato ancora creato un modello)

Se esiste già un modello per l'esperimento, andare a "**Creazione dell'esperimento ABI 7500 Fast dal modello salvato**" a pagina 33.

Fase 1. Creazione dell'esperimento

- 1 Accendere lo strumento ABI 7500 Fast.
- 2 Dal computer collegato allo strumento, aprire l'applicazione software di sistema 7500.

3 Nella schermata iniziale, in **Set Up**, fare clic su **Advanced Setup**.

Si apre la schermata Experiment.

4 In **Experiment Menu** sul lato sinistro della schermata, in **Setup**, fare clic su **Experiment Properties** (se non è già selezionato).

Le impostazioni per le proprietà dell'esperimento sono visualizzate al centro della schermata.

5 Rispondere alle domande su schermo usando le selezioni e le voci mostrate nella **Tabella 9**.

Tabella 9 Impostazioni delle proprietà dell'esperimento

Domanda	Selezioni/inserimenti
How do you want to identify this experiment? (In che modo identificare questo esperimento?)	<ul style="list-style-type: none">• Experiment Name (Nome esperimento): digitare un nome univoco per l'esperimento• Barcode (Codice a barre): lasciare vuoto• User Name (Nome utente): digitare il proprio nome• Comments (Commenti): digitare qualsiasi commento desiderato o lasciare vuoto
Which instrument are you using to run the experiment? (Quale strumento si sta utilizzando per eseguire l'esperimento?)	7500 Fast (96 pozzetti)
What type of experiment do you want to set up? (Quale tipo di esperimento si desidera impostare?)	Quantitation, Standard Curve (Quantificazione, Curva standard)
Which reagents do you want to use to detect the target sequence? (Quali reagenti utilizzare per rilevare la sequenza target?)	Reagenti TaqMan®
Which ramp speed do you want to use in the instrument run? (Quale velocità di rampa utilizzare nella corsa dello strumento?)	Fast

Fase 2. Definizione di target e campioni

6 In **Experiment Menu** sul lato sinistro della schermata, in **Setup**, fare clic su **Plate Setup**. Assicurarsi che la scheda **Define Targets and Samples** sia selezionata in alto.

Gli strumenti per definire i target e i campioni sono visualizzati al centro della schermata.

7 Nella tabella Define Targets, creare i target per N1, N2 e RP come mostrato nella **Figura 7**. Fare clic su **Add New Target** per aggiungere una riga alla tabella secondo necessità.

Per la selezione del **Quencher**, selezionare **NFQ-MGB** per tutti i target. Per la selezione di **Color**, utilizzare il valore predefinito o selezionare il colore desiderato.

Define Targets			
<input type="button" value="Add New Target"/> <input type="button" value="Add Saved Target"/> <input type="button" value="Save Target"/> <input type="button" value="Delete Target"/>			
Target Name	Reporter	Quencher	Color
N1	FAM	NFQ-MGB	
N2	VIC	NFQ-MGB	
RP	CY5	NFQ-MGB	

Figura 7 Definizioni del target sulla schermata Plate Setup del software 7500

- 8 Nella tabella Define Samples, creare i nomi dei campioni come mostrato nella **Figura 8**. Fare clic su **Add New Sample** per aggiungere una riga alla tabella secondo necessità.

I tre campioni sono il Controllo dei Campioni Umani (**HSC**), il controllo senza modello (**NTC**) e il controllo positivo (**Pos**) con controllo RNA positivo sintetico SARS-CoV-2. Ai campioni di test non viene assegnato un nome di campione.

Per la selezione di **Color**, utilizzare il valore predefinito o selezionare il colore desiderato.

Define Samples	
<input type="button" value="Add New Sample"/> <input type="button" value="Add Saved Sample"/> <input type="button" value="Save Sample"/> <input type="button" value="Delete Sample"/>	
Sample Name	Color
HSC	
NTC	
Pos	

Figura 8 Definizioni del campione sulla schermata Plate Setup del software 7500

Fase 3. Assegnazione di target e attività

- 9 Nella parte superiore della schermata, fare clic sulla scheda **Assign Targets and Samples**. Assicurarsi che sia selezionata la scheda **View Plate Layout**.

La schermata visualizza una mappa delle piastre a 96 pozzetti.

- 10 Sulla mappa delle piastre, selezionare tutti i 96 pozzetti.

I pozzetti selezionati sono evidenziati in blu con un ovale bianco al centro.

La selezione di tutti i 96 pozzetti è appropriata se tutti i pozzetti della piastra includeranno una reazione qRT-PCR. Se uno qualsiasi dei pozzetti della piastra è vuoto, non selezionare tali pozzetti in questo passaggio.

- 11 Nella tabella in **Assign target(s) to the selected wells**, contrassegnare tutte e tre le caselle di controllo nella colonna Assign per indicare che tutti e tre i target saranno monitorati e riportati in tutti i pozzetti. Nella colonna Task, assicurarsi che "U" sia selezionato per tutti e tre i target. Fare riferimento alla **Figura 9**.

La mappa delle piastre mostra un simbolo per ogni target in tutti i 96 pozzetti.

Assign target(s) to the selected wells.			
Assign	Target	Task	Quantity
<input checked="" type="checkbox"/>	N1	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N	
<input checked="" type="checkbox"/>	N2	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N	
<input checked="" type="checkbox"/>	RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N	

Figura 9 Assegnazioni target nella scheda View Plate Layout del software 7500

12 Modificare l'attività assegnata per il pozzetto Controllo senza modello.

- a Nella mappa delle piastre, selezionare il pozzetto A12.
- b Nella tabella in **Assign target(s) to the selected wells**, modificare la selezione nella colonna Task in "N" per tutti e tre i target. Assicurarsi che le caselle di controllo nella colonna Assign rimangano contrassegnate.

La mappa delle piastre appare ora come mostrato nella **Figura 10**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP
B	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	
C	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	
D	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	
E	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	
F	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	
G	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	
H	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	<input checked="" type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/> N1 <input checked="" type="checkbox"/> N2 <input checked="" type="checkbox"/> RP	

Figura 10 Mappa delle piastre sulla schermata Plate Setup del Sistema 7500

Fase 4. Assegnazione di campioni di controllo

13 Assegnare il controllo senza modello al pozzetto A12.

- a Selezionare il pozzetto A12 sulla mappa delle piastre.
- b Nella tabella in **Assign sample(s) to the selected wells**, contrassegnare **NTC**.

Il nome del campione NTC viene visualizzato nel pozzetto selezionato.

14 Assegnare il campione del Controllo dei Campioni Umani al pozzetto B12.

a Selezionare il pozzetto B12 sulla mappa delle piastre.

Se si dispone di più di un campione del Controllo dei Campioni Umani che deve essere incluso nella piastra, selezionare il numero necessario di pozzetti aggiuntivi nella colonna 12 della mappa delle piastre.

b Nella tabella in **Assign sample(s) to the selected wells**, contrassegnare **HSC**.

Il nome del campione HSC viene visualizzato nei pozzetti selezionati.

15 Assegnare il campione del controllo RNA positivo sintetico SARS-CoV-2 al pozzetto H12.

a Selezionare il pozzetto H12 sulla mappa delle piastre.

b Nella tabella in **Assign sample(s) to the selected wells**, contrassegnare **Pos**.

Il nome del campione Pos viene visualizzato nel pozzetto selezionato.

Fase 5. Assegnazione del colorante di riferimento

16 Nella tabella in **Select the dye to use as the passive reference**, selezionare **ROX**.

Fase 6. Impostazione del metodo di esecuzione

17 In **Experiment Menu** sul lato sinistro della schermata, in **Setup**, fare clic su **Run Method**.

Fare clic sulla scheda **Tabular View**, in alto.

Gli strumenti per definire il volume di reazione e il profilo termico sono visualizzati al centro della schermata.

18 Assicurarsi che il campo **Reaction Volume Per Well** sia impostato su 20 µl. In caso contrario, digitare **20** nel campo.

19 Regolare il profilo termico in modo che corrisponda a quello mostrato nella **Figura 11**.

Le impostazioni sono anche riassunte nella **Tabella 10**.

Se è necessario aggiungere una nuova fase di mantenimento all'inizio del profilo termico per la fase di trascrizione inversa a 50 °C, seguire i passaggi qui sotto.

a Selezionare il passaggio più a sinistra sull'immagine del profilo termico.

b Fare clic su **Add Stage > Holding**.

Una nuova fase di mantenimento viene aggiunta all'inizio del profilo termico. Regolare la temperatura e la durata in modo che corrispondano a quelle della **Figura 11**.

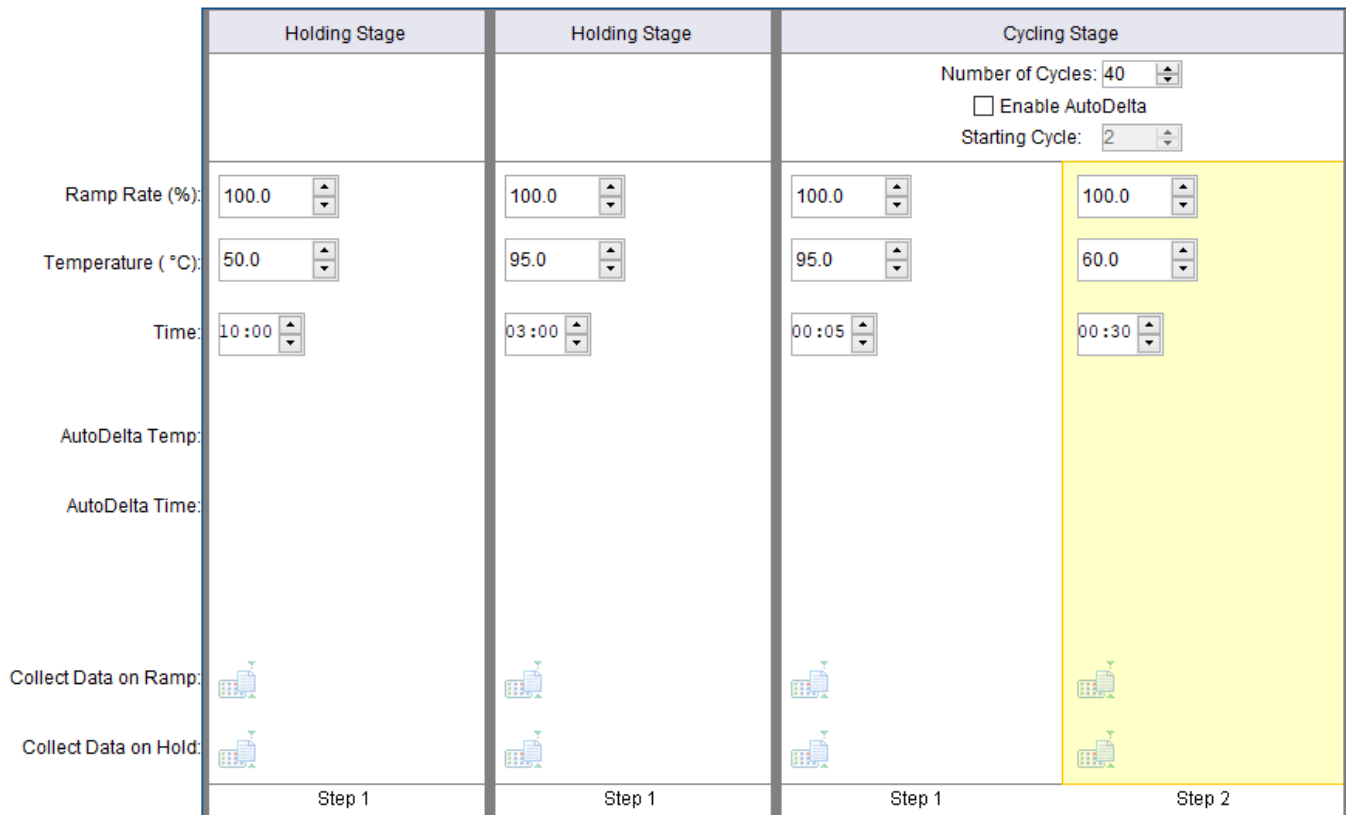


Figura 11 Profilo termico sulla schermata Run Method del software 7500

Tabella 10 Impostazioni del profilo termico per lo strumento PCR in tempo reale 7500 Fast

Numero segmento	Numero cicli	Durata	Temperatura
1	1	10 minuti	50 °C
2	1	3 minuti	95 °C
3	40	5 secondi	95 °C
		30 secondi	60 °C

Fase 7. Salvataggio dell'esperimento

20 Nella parte superiore della schermata, fare clic sulla freccia in basso accanto al pulsante **Save** per espandere il menu delle opzioni di salvataggio.

21 Selezionare **Save As** nel menu.

Si apre la finestra di dialogo Save As.

22 Selezionare una cartella per il nuovo file di esperimento.

23 Nel campo del nome file, digitare un nome per l'esperimento.

24 Assicurarsi che il tipo di file sia impostato su **Experiment Document Single files (*.eds)**.

25 Fare clic su **Save**.

La finestra di dialogo si chiude e il programma salva il nuovo file esperimento nella cartella designata.

Fase 8. Salvataggio dell'esperimento come modello per uso futuro

26 Fare clic sulla freccia in basso accanto al pulsante **Save** per espandere il menu delle opzioni di salvataggio.

27 Selezionare **Save As Template** nel menu.

Si apre la finestra di dialogo Save As Template.

28 Selezionare una cartella per il nuovo modello.

29 Nel campo File name, digitare **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**.

30 Assicurarsi che il tipo di file sia impostato su **Experiment Document Template files (*.edt)**.

31 Fare clic su **Save**.

La finestra di dialogo si chiude e il programma salva il nuovo file modello nella cartella designata.

Per analisi future, utilizzare il modello salvato per creare e impostare l'esperimento qRT-PCR come descritto in "**Creazione dell'esperimento ABI 7500 Fast dal modello salvato**".

A questo punto, procedere direttamente a "**Preparazione delle reazioni qRT-PCR**" a pagina 41.

Creazione dell'esperimento ABI 7500 Fast dal modello salvato

Se non è stato creato un modello dell'esperimento con l'impostazione della piastra e il profilo termico necessari, vedere "**Creazione e impostazione dell'esperimento ABI 7500 Fast (necessario se non è stato ancora creato un modello)**" a pagina 27.

Fase 1. Creazione dell'esperimento

1 Accendere lo strumento ABI 7500 Fast.

2 Dal computer collegato allo strumento, aprire l'applicazione software di sistema 7500.

3 Nella schermata iniziale, in **Set Up**, fare clic su **Template**.

Si apre la finestra di dialogo Open.

4 Nella casella di dialogo, navigare nella cartella in cui si desidera salvare il modello.

5 Fare doppio clic direttamente sul file **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR.edt**.

Lo strumento si inizializza.

Il software del sistema 7500 si apre sulla schermata Experiment con la visualizzazione di Plate Setup.

Fase 2. Salvataggio dell'esperimento

6 Nella parte superiore della schermata, fare clic sulla freccia in basso accanto al pulsante **Save** per espandere il menu delle opzioni di salvataggio.

7 Selezionare **Save As** nel menu.

Si apre la finestra di dialogo Save As.

8 Selezionare una cartella per il nuovo file di esperimento.

9 Nel campo del nome file, digitare un nome per l'esperimento.

10 Assicurarsi che il tipo di file sia impostato su **Experiment Document Single files (*.eds)**.

11 Fare clic su **Save**.

La finestra di dialogo si chiude e il programma salva il nuovo file esperimento nella cartella designata.

A questo punto, procedere direttamente a **“Preparazione delle reazioni qRT-PCR”** a pagina 41.

Creazione e impostazione dell'esperimento PCR Bio-Rad CFX96 Touch in tempo reale (necessario se il protocollo salvato e i file della piastra non sono ancora stati creati)

Se esistono già i file del protocollo e della piastra appropriati, andare a **“Creazione dell'esperimento PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96 Touch dai file di protocollo e piastra salvati”** a pagina 40.

Fase 1. Creazione dell'esperimento

- 1 Accendere lo strumento PCR in tempo reale CFX96 Touch.
- 2 Dal computer collegato allo strumento, aprire l'applicazione software Bio-Rad CFX Maestro.
- 3 Nella procedura guidata di avvio, impostare l'elenco a discesa **Select instrument CFX96**, quindi fare clic su **User-defined**.

La schermata Run Setup si apre sulla scheda Protocol. Il profilo termico predefinito viene visualizzato al centro della schermata.

Fase 2. Impostazione del profilo termico

- 4 Nell'elenco a discesa Express Load, selezionare **2-Step_Amp.prcl**.

Il profilo termico si aggiorna alle impostazioni predefinite per un protocollo di amplificazione a 2 fasi adatto all'uso con sonde fluorescenti.

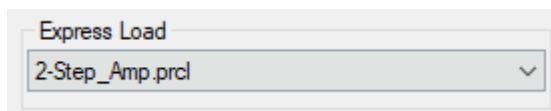


Figura 12 Express Load impostato su **2-Step_Amp.prcl** sulla scheda CFX Maestro Protocol

- 5 Fare clic su **Edit Selected**.

Si apre la finestra Protocol Editor.

- 6 Nella finestra Protocol Editor, aggiungere una fase all'inizio del profilo termico per la trascrizione inversa.
 - a Selezionare la fase 1 nell'immagine del profilo termico.
 - b Nell'elenco a discesa Insert Step, selezionare **Before**.
 - c Fare clic su **Insert Step**.

Una nuova fase 1 viene aggiunta prima della fase selezionata.

- d Modificare le impostazioni per la nuova fase a 50 °C per 10 minuti.

- 7 Regolare le altre fasi del profilo termico in modo che corrispondano alla **Figura 13**. Le impostazioni sono anche riassunte nella **Tabella 11**. Assicurarsi che la fase GOTO (fase 5) sia impostata per essere ripetuta 39 volte.

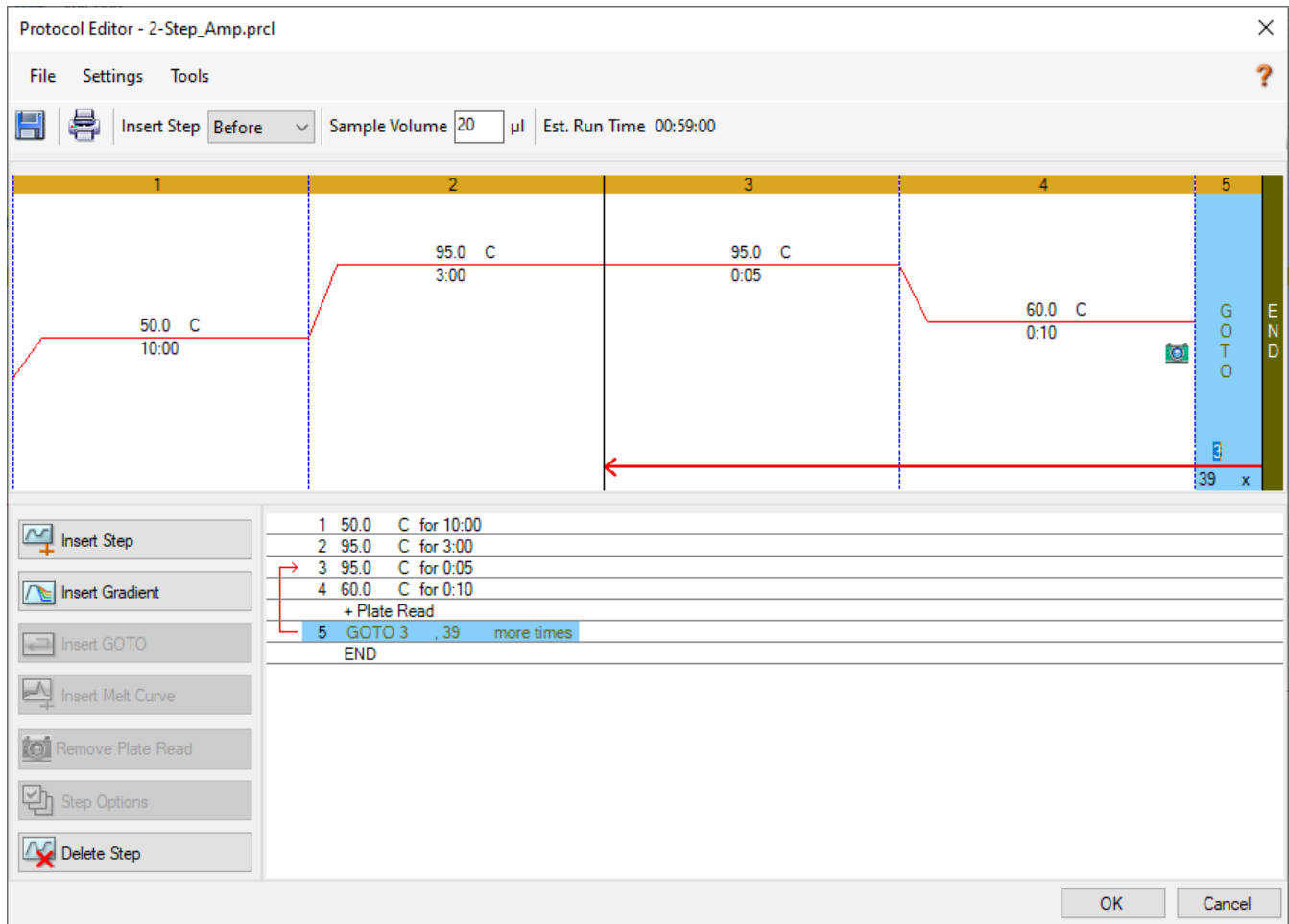


Figura 13 Profilo termico sulla finestra CFX Maestro Protocol Editor

Tabella 11 Programma di cicli termici per lo strumento PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96 Touch

Numero segmento	Numero cicli	Durata	Temperatura
1	1	10 minuti	50 °C
2	1	3 minuti	95 °C
3	40	5 secondi	95 °C
		10 secondi	60 °C

Fase 3. Salvare il file di protocollo.

- 8 Fare clic su **Save**.

La finestra di dialogo Save As si apre chiedendo di salvare il file del protocollo per l'esperimento. Il file di protocollo contiene le impostazioni della scheda Protocol della schermata Run Setup.

- 9 Selezionare una cartella per il nuovo file di protocollo.

- 10 Nel campo File name, digitare **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol**.

- 11 Assicurarsi che il tipo di file sia impostato su **Protocol File (*.prcl)**.

- 12 Fare clic su **Save**.

La finestra di dialogo si chiude e il programma salva il nuovo file protocollo nella cartella designata.

- 13 Fare clic su **OK** per chiudere la finestra Protocol Editor.

Per analisi future, utilizzare il file di protocollo salvato per impostare la scheda Protocol come descritto in **“Creazione dell'esperimento PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96 Touch dai file di protocollo e piastra salvati”**.

Fase 4. Selezione dei fluorofori e assegnazione dei nomi target

- 14 Nella parte inferiore della schermata Run Setup, fare clic su **Next**.

La schermata Run Setup avanza fino alla scheda Plate. Un'immagine della mappa delle piastre viene visualizzata al centro della schermata.

- 15 Assicurarsi che l'elenco a discesa Scan Mode sia impostato su **All Channels**.

- 16 Fare clic su **Edit Selected**.

Si apre la finestra Plate Editor.

- 17 Nella finestra Plate Editor, fare clic su **Select Fluorophores**.

Si apre la finestra di dialogo Select Fluorophores.

- 18 Nella finestra di dialogo, contrassegnare le caselle di controllo per i fluorofori **FAM, HEX e Cy5**. Deselezionare le caselle di controllo per tutti gli altri fluorofori. Fare riferimento alla **Figura 14**.

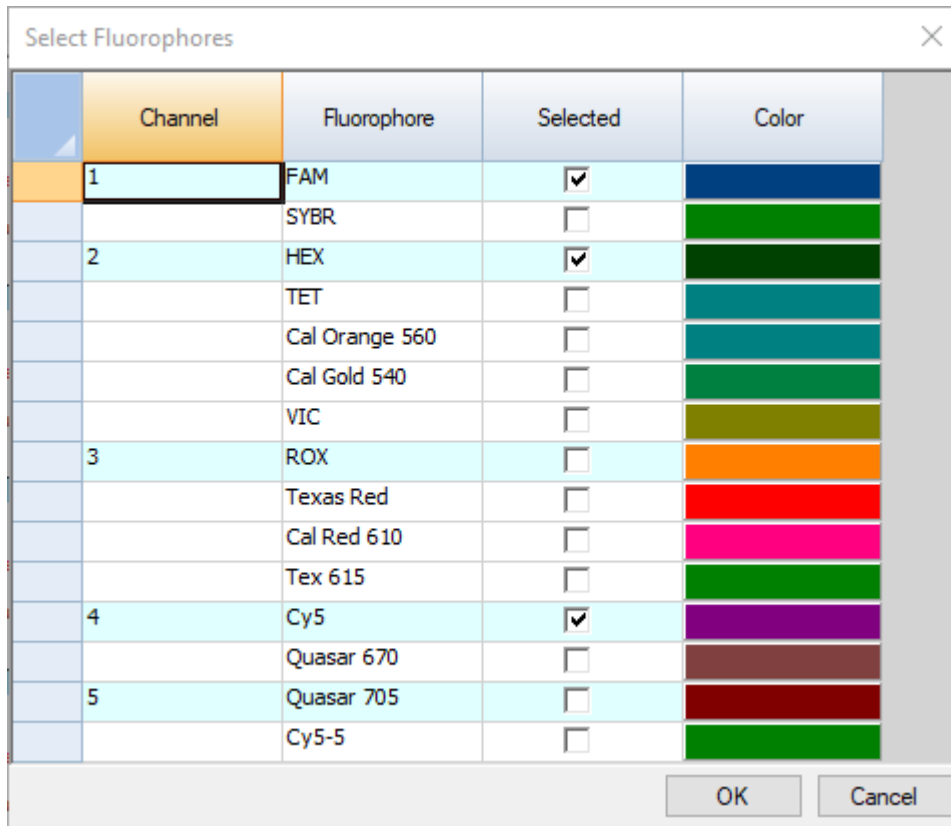


Figura 14 Selezioni di fluorofori nella finestra di dialogo CFX Maestro Select Fluorophores

19 Fare clic su **OK**.

Si chiude la finestra di dialogo Select Fluorophores. I tre fluorofori selezionati sono elencati sul lato destro della finestra Plate Editor in **Target Names**.

20 Selezionare tutti i pozzetti sulla mappa delle piastre.

I pozzetti selezionati sono evidenziati in blu.

La selezione di tutti i 96 pozzetti è appropriata se tutti i pozzetti della piastra includeranno una reazione qRT-PCR. Se uno qualsiasi dei pozzetti della piastra è vuoto, non selezionare tali pozzetti in questo passaggio.

21 In **Target Names**, assicurarsi che tutti e tre i fluorofori siano contrassegnati e che tutti i pozzetti mostrino i nomi di tutti e tre i fluorofori.

22 Nei campi accanto ai nomi dei fluorofori, digitare i nomi target per i fluorofori come mostrato nella **Figura 15**. Premere **Enter** dopo aver digitato ogni nome per applicare il nome ai pozzetti della piastra.

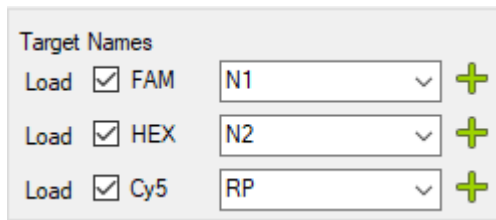


Figura 15 Assegnazioni dei nomi target nella finestra CFX Maestro Plate Editor

Fase 5. Assegnazione di tipi di campioni e nomi di campioni

23 Assegnare il tipo di campione controllo senza modello.

- a Selezionare il pozzetto A12 sulla mappa delle piastre.
- b Nell'elenco a discesa Sample Type, selezionare **NTC**.

L'etichetta **NTC** è visualizzata nella parte superiore del pozzetto A12.

24 Assicurarsi che i pozzetti rimanenti siano assegnati al tipo di campione Unknown, come indicato dall'etichetta **Unk** in cima ai pozzetti, come mostrato nella **Figura 16**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	NTC
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
B	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
C	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
D	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
E	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
F	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
G	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
H	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1	N1
	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP

Figura 16 Assegnazioni dei tipi di campione nella finestra CFX Maestro Plate Editor

25 Assegnare il nome per il campione di Controllo dei Campioni Umani nel pozzetto B12.

a Selezionare il pozzetto B12 sulla mappa delle piastre.

Se si dispone di più di un campione di Controllo dei Campioni Umani che deve essere incluso nella piastra, selezionare il numero necessario di pozzetti aggiuntivi nella colonna 12 della mappa delle piastre.

b Nel campo in **Sample Names**, digitare **HSC**, come mostrato nella **Figura 17**. Premere **Enter**.

Il nome del campione HSC viene visualizzato nei pozzetti selezionati.

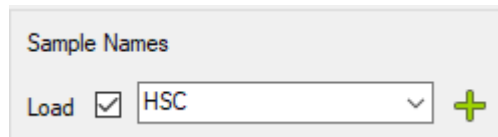


Figura 17 Aggiunta del nome del campione HSC nella finestra CFX Maestro Plate Editor

26 Assegnare il nome per il campione del controllo RNA positivo sintetico SARS-CoV-2 nel pozzetto H12.

a Selezionare il pozzetto H12 sulla mappa delle piastre.

b Nel campo in **Sample Names**, digitare **Pos**. Premere **Enter**.

Il nome del campione Pos viene visualizzato nel pozzetto H12.

Fase 6. Salvataggio del file della piastra

27 Fare clic su **Save**.

La finestra di dialogo Save As si apre chiedendo di salvare il file della piastra per l'esperimento. Il file della piastra contiene le impostazioni della scheda Plate della schermata Run Setup.

28 Selezionare una cartella per il nuovo file della piastra.

29 Nel campo File name, digitare il nome **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate**.

30 Assicurarsi che il tipo di file sia impostato su **Plate File (*.pltd)**.

31 Fare clic su **Save**.

La finestra di dialogo si chiude e il programma salva il file della piastra nella cartella designata.

32 Fare clic su **OK** per chiudere la finestra Plate Editor.

33 Nella parte inferiore della schermata Run Setup, fare clic su **Next**.

La schermata Run Setup avanza fino alla scheda Start Run.

Per analisi future, utilizzare il file di piastra salvato per impostare la scheda Plate come descritto in **“Creazione dell'esperimento PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96 Touch dai file di protocollo e piastra salvati”**.

A questo punto, procedere direttamente a **“Preparazione delle reazioni qRT-PCR”** a pagina 41.

Creazione dell'esperimento PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96 Touch dai file di protocollo e piastra salvati

Se non è stato creato un esperimento con l'impostazione della piastra e il profilo termico necessari, vedere **“Creazione e impostazione dell'esperimento PCR Bio-Rad CFX96 Touch in tempo reale (necessario se il protocollo salvato e i file della piastra non sono ancora stati creati)”** a pagina 34.

Fase 1. Creazione dell'esperimento

- 1 Accendere lo strumento PCR in tempo reale CFX96 Touch.
- 2 Dal computer collegato allo strumento, aprire l'applicazione software Bio-Rad CFX Maestro.
- 3 Nella procedura guidata di avvio, impostare l'elenco a discesa **Select instrument CFX96**, quindi fare clic su **User-defined**.

La schermata Run Setup si apre sulla scheda Protocol. Il profilo termico predefinito viene visualizzato al centro della schermata.

Fase 2. Caricamento del file di protocollo

- 4 Fare clic su **Select Existing**.
- 5 Nella finestra di dialogo, navigare nella cartella in cui è salvato il file **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol.prcl**.
- 6 Fare doppio clic direttamente sul file di protocollo.

Le impostazioni del file di protocollo vengono caricate nell'esperimento.

Fase 3. Caricamento del file di piastra

- 7 Nella parte inferiore della schermata Run Setup, fare clic su **Next**.
- 8 Fare clic su **Select Existing**.
- 9 Nella finestra di dialogo, navigare nella cartella in cui è salvato il file **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate.pltd**.
- 10 Fare doppio clic direttamente sul file di piastra.

Le impostazioni del file di piastra vengono caricate nell'esperimento.

- 11 Nella parte inferiore della schermata Run Setup, fare clic su **Next**.

La schermata Run Setup avanza fino alla scheda Start Run.

A questo punto, procedere direttamente a **“Preparazione delle reazioni qRT-PCR”** a pagina 41.

Preparazione delle reazioni qRT-PCR

ATTENZIONE

Preparare la piastra qRT-PCR immediatamente prima dell'uso e tenerla sempre su ghiaccio o in un rack per il freddo fino a quando non viene caricata nello strumento PCR in tempo reale.

Fase 1. Preparazione della miscela di reagenti qRT-PCR e della piastra nella workstation pre-PCR

- 1 Scongela i reagenti qRT-PCR congelati su ghiaccio. Fare riferimento a **Tabella 12** per un elenco di reagenti necessari. Tenere 10 SAR-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx e Reference Dye Dx al riparo dalla luce.
- 2 Preparare una diluizione 1:500 di Reference Dye Dx fornito con acqua priva di nucleasi (per una concentrazione finale di 30 nM nelle reazioni). Tenere tutte le soluzioni contenenti il colorante di riferimento al riparo dalla luce.

Reference Dye Dx diluito, se conservato in una provetta protetta dalla luce a 4 °C, può essere utilizzato in giornata per impostare ulteriori analisi.

- 3 Preparare la miscela di reagenti combinando i componenti in **Tabella 12** nell'ordine elencato. Preparare una singola miscela di reagenti per tutti i campioni (3 controlli e fino a 93 campioni di test) utilizzando multipli di ogni componente elencato di seguito. Tenere la miscela di reagenti su ghiaccio e al riparo dalla luce. Preparare la miscela di reagenti appena prima dell'uso.
 - Se si preparano 96 reazioni, preparare la miscela di reagenti in una provetta da 2 ml.
 - Se si preparano 48 reazioni, preparare la miscela di reagenti in una provetta da 1,5 ml.

Per praticità, la **Tabella 12** include volumi per la preparazione di 1 reazione, 48 reazioni e 96 reazioni.

Tabella 12 Miscela di reagenti qRT-PCR

Componente	Volume per 1 reazione	Volume per 48 reazioni (incluso sovradosaggio)	Volume per 96 reazioni (incluso sovradosaggio)
Acqua priva di nucleasi	1,5 µl	81 µl	162 µl
2 Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	10 µl	540 µl	1.080 µl
10 SAR-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx	2 µl	108 µl	216 µl
100 mM DTT Dx	0,2 µl	10,8 µl	21,6 µl
Reference Dye Dx diluito (dalla passaggio 2)	0,3 µl	16,2 µl	32,4 µl
RT/RNase Block Dx	1 µl	54 µl	108 µl

- 4 Mescolare delicatamente la miscela di reagenti su un miscelatore a vortice senza creare bolle, quindi far girare la provetta in una microcentrifuga per 5 secondi.

- 5 Distribuire 15 μl di miscela di reagenti nei pozzetti della piastra a 96 pozzetti utilizzando la seguente procedura.
 - a Porre una striscia da 8 provette in un rack per il freddo da 96 pozzetti.
 - b Distribuire 190 μl di miscela di reagenti (se si eseguono 96 reazioni) o 100 μl di miscela di reagenti (se si eseguono 48 reazioni) in ciascuna delle 8 provette della striscia. Se necessario, rimuovere tutte le bolle di grandi dimensioni che possono essere presenti sul fondo delle provette.
 - c Con un pipettatore multicanale, trasferire 15 μl di miscela di reagenti dalla striscia da 8 provette alle colonne della piastra da 96 pozzetti. Tenere la piastra su ghiaccio o in un rack per il freddo a 96 pozzetti, protetta dalla luce, durante l'intero processo.

NOTA

Se si eseguono solo 48 reazioni, lasciare le colonne da 1 a 6 vuote.

- 6 Con la piastra coperta, portare la piastra nell'area della workstation Pre-PCR designata per l'aggiunta dei campioni. Mantenere la piastra su ghiaccio o in un rack per il freddo.

Fase 2. Aggiunta di campioni di controllo e test alla piastra qRT-PCR nella stazione di lavoro Pre-PCR (area di aggiunta dei campioni)

- 7 Diluire il controllo RNA sintetico positivo di SARS-CoV-2 fino a uno stock di lavoro di 10 copie/ μl .
 - a Aggiungere 99 μl di acqua priva di nucleasi in una provetta pulita da 1,5 ml. A questa provetta, aggiungere 1 μl di controllo RNA sintetico positivo di SARS-CoV-2 non diluito. Mescolare bene in un miscelatore a vortice e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.
 - b Aggiungere 99 μl di acqua priva di nucleasi in un'altra provetta pulita da 1,5 ml. A questa provetta, aggiungere 1 μl di controllo RNA sintetico positivo di SARS-CoV-2 diluito preparato durante il **passaggio a**. Mescolare bene in un miscelatore a vortice e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.

La provetta contiene lo stock di lavoro del controllo RNA sintetico positivo di SARS-CoV-2 fino a una concentrazione di 10 copie/ μl .

Lo stock di lavoro, se conservato a 4 °C, può essere utilizzato in giornata per impostare ulteriori analisi. Riportare le scorte originali di controllo RNA sintetico positivo di SARS-CoV-2 a -80 °C.

8 Impostare le reazioni di controllo come mostrato nella **Figura 18**.

- Per il No Template Control (NTC, Controllo senza modello), aggiungere 5 µl di acqua priva di nucleasi al pozzetto A12.
- Per il Controllo dei Campioni Umani (HSC), agitare brevemente nel miscelatore a vortice l'RNA preparato dal Controllo dei Campioni Umani. Quindi, aggiungere 5 µl di RNA al pozzetto B12.

Se si dispone di più di un campione HSC che deve essere incluso nella piastra, utilizzare pozzetti aggiuntivi nella colonna 12 come designato durante l'impostazione della piastra nel software dello strumento qRT-PCR.
- Per il controllo RNA positivo sintetico di SARS-CoV-2 (Pos), aggiungere 5 µl del controllo RNA sintetico positivo di SARS-CoV-2 diluito al pozzetto H12.

9 Impostare le reazioni per i campioni di test (da S1 a S93) come mostrato nella **Figura 18**. Cambiare frequentemente i guanti per evitare contaminazioni.

- Agitare brevemente nel miscelatore a vortice i campioni di RNA preparati dai campioni di test. Quindi, girare in una microcentrifuga per 5 secondi.
- Per ogni campione, aggiungere 5 µl in un pozzetto della piastra qRT-PCR. Tracciare attentamente quale campione è stato aggiunto a ciascun pozzetto. Cambiare le punte dopo ogni aggiunta.
- Se la piastra qRT-PCR deve essere sigillata con un sigillo adesivo, mescolare le reazioni prima della sigillatura pipettando brevemente le miscele su e giù senza creare bolle.

NOTA

Se si eseguono solo 48 reazioni, lasciare i pozzetti della piastra etichettati da S1 a S48 vuoti.

10 Sigillare la piastra con un sigillo adesivo o con strisce di tappi per provette.

11 Se la piastra è sigillata con strisce di tappi per provette, miscelare brevemente su un miscelatore a vortice. (non usare un miscelatore a vortice per le piastre sigillate con sigillo adesivo).

12 Far girare brevemente la piastra in una centrifuga per piastre.

13 Se si sta utilizzando il sistema PCR in tempo reale Agilent AriaMx/AriaDx ed è stata sigillata la piastra con un sigillo adesivo, aggiungere un cuscinetto di compressione sulla piastra.

14 Procedere direttamente all'esecuzione della qRT-PCR sul proprio sistema PCR in tempo reale.

- Vedere **"Esecuzione di qRT-PCR sul sistema PCR in tempo reale Agilent AriaMx/AriaDx"** a pagina 46
- Vedere **"Esecuzione di qRT-PCR sullo strumento PCR in tempo reale ABI 7500 Fast"** a pagina 54
- Vedere **"Esecuzione di qRT-PCR sul sistema di rilevazione PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96 Touch"** a pagina 61

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	NTC
B	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	HSC
C	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S89
D	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S90
E	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85	S91
F	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86	S92
G	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87	S93
H	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88	Pos

Figura 18 Impostazione della piastra per i campioni di test 1-93 e i campioni di controllo (No Template Control [NTC], Controllo dei Campioni Umani [HSC], e Synthetic Positive RNA Control Dx [Pos])

5 Istruzioni per l'esecuzione di qRT-PCR

- Esecuzione di qRT-PCR sul sistema PCR in tempo reale Agilent AriaMx/AriaDx **46**
- Esecuzione di qRT-PCR sullo strumento PCR in tempo reale ABI 7500 Fast **54**
- Esecuzione di qRT-PCR sul sistema di rilevazione PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96 Touch **61**

Questo capitolo contiene istruzioni sull'esecuzione del programma di cicli qRT-PCR sullo strumento PCR in tempo reale selezionato.

Esecuzione di qRT-PCR sul sistema PCR in tempo reale Agilent AriaMx/AriaDx

Questa sezione descrive la procedura per eseguire qRT-PCR su un sistema PCR in tempo reale Agilent AriaMx o AriaDx.

Esecuzione del programma qRT-PCR sul sistema AriaMx/AriaDx

- 1 Assicurarsi che lo strumento AriaMx/AriaDx sia acceso.
- 2 Dal computer collegato allo strumento, aprire l'esperimento creato in precedenza nell'applicazione Aria.
- 3 Navigare nella schermata Thermal Profile, nella schermata Run Status o nella schermata Raw Data Plots.
- 4 Fare clic su **Run**.

Si apre la finestra di dialogo Instrument Explorer.

- 5 Individuare lo strumento da utilizzare per la corsa e fare clic su **Send Config**. (vedere la Guida alla configurazione e all'uso di AriaMx o AriaDx per le istruzioni su come cercare e aggiungere strumenti).
 - Se è la prima volta che ci si collega a uno strumento dall'ultimo avvio del programma Aria, si apre la finestra di dialogo Login. Selezionare il proprio nome utente dall'elenco a discesa, digitare la password di accesso nel campo Password e fare clic su **Login**. Per accedere con un altro account utente, fare clic con il pulsante destro del mouse sul nome dello strumento, quindi fare clic su **Log off current user**. Si può quindi accedere utilizzando l'account utente desiderato.
 - Se l'esperimento non è ancora salvato, viene richiesto di salvare l'esperimento prima di procedere.
 - 6 Portare la piastra di reazione sullo strumento e caricarla nel blocco termico.
 - 7 Sul touchscreen dello strumento, aprire l'esperimento innescato alla schermata Thermal Profile e premere **Run Experiment**.
- Lo strumento inizia a eseguire l'esperimento.
- 8 Ritornare al programma del computer. Il programma indirizza alla schermata Run Status, dove è possibile monitorare il progresso della corsa.

Il monitoraggio della corsa non è necessario. Se si chiude il software Aria prima del completamento della corsa, prendere nota del punto in cui verrà salvato il file dell'esperimento post-corsa.

Assegnazione delle impostazioni di analisi dei dati per l'esperimento AriaMx/AriaDx

Fase 1. Visualizzazione dei grafici di amplificazione per tutti i target in tutti i pozzetti

- 1 Quando la corsa è completa, aprire il file dell'esperimento nel software Aria.
- 2 Fare clic su **Analysis Criteria** sul lato sinistro della schermata.

Si apre la schermata Analysis Criteria con le impostazioni per specificare le impostazioni per l'analisi.

- 3 Assicurarsi che tutti i pozzetti, i tipi di pozzetto e i target siano selezionati per l'analisi, come mostrato nella **Figura 19**.

NOTA

Se la piastra contiene pozzetti vuoti, assicurarsi che questi siano assegnati al tipo di pozzetto vuoto nella scheda Plate Setup.

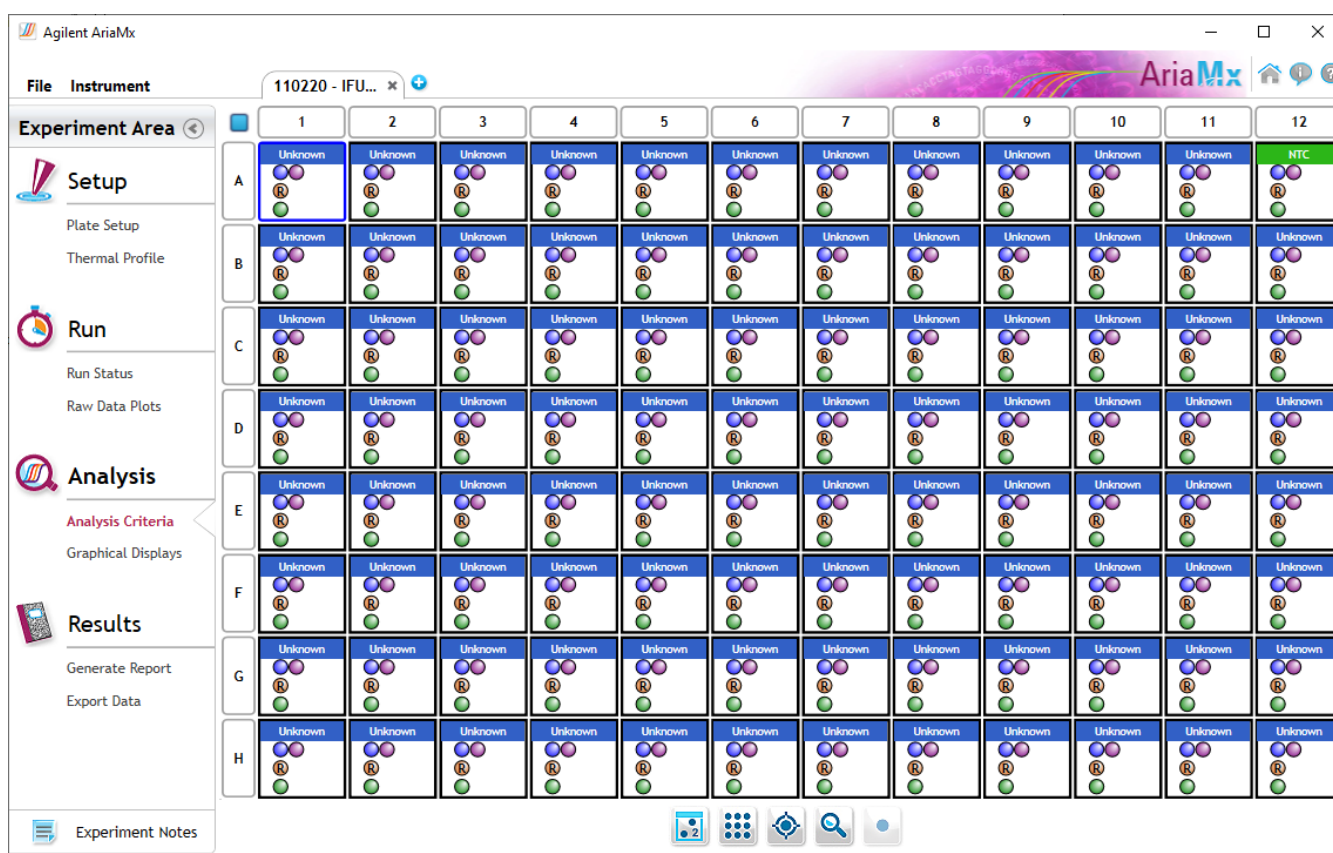


Figura 19 Schermata Aria Analysis Criteria

- 4 Fare clic su **Graphical Displays** sul lato sinistro della schermata.

Si apre la schermata Graphical Displays, che visualizza i dati con strumenti per impostare i parametri di analisi.

- 5 Assicurarsi che lo schermo stia visualizzando il grafico Amplification Plots e che i parametri di analisi predefiniti corrispondano a quelli mostrati nella **Figura 20**.

Se non si visualizza il pannello completo dei parametri di analisi mostrato nella **Figura 20**, fare clic sulla freccia in basso proprio sotto l'impostazione **Smoothing** per espandere il pannello.

I valori di soglia di fluorescenza predefiniti nell'esperimento saranno probabilmente diversi da quelli mostrati nella **Figura 20**. Il software calcola i valori predefiniti in base al livello di rumore di fluorescenza nella gamma dei cicli di fondo. Di conseguenza, i valori predefiniti variano da un esperimento all'altro.

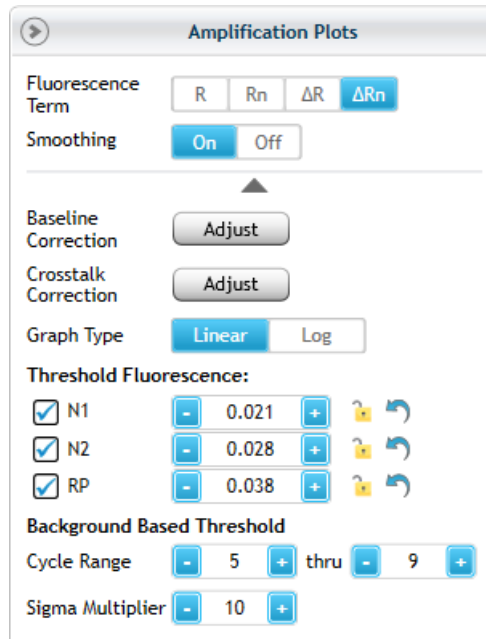


Figura 20 Impostazioni predefinite per i grafici di amplificazione nel software Aria (i valori di soglia di fluorescenza variano tra un esperimento e l'altro)

- 6** In **Background Based Threshold**, assicurarsi che l'intervallo di ciclo predefinito sia da 5 a 9.
- 7** Controllare i grafici di amplificazione con amplificazione precoce (ossia, prima del ciclo 9). Escludere dall'analisi i campioni con amplificazione precoce e ripetere il test a una concentrazione inferiore.

Nei campioni di test con concentrazioni insolitamente alte di RNA virale, l'amplificazione dei target virali può raggiungere livelli rilevabili a un numero di cicli molto precoce (< 9). Come parte dei calcoli di correzione della linea di base, il software può interpretare tali segnali di amplificazione precoce come rumore di fondo e non riuscire ad assegnare un valore Cq ai target virali in tali campioni.

Monitorare la presenza di tali campioni di test visualizzando i grafici di amplificazione senza correzione della linea di base (termine di fluorescenza R o Rn). Se qualcuno dei campioni da analizzare mostra segni di amplificazione prima del ciclo 9, rimuovere tali pozzetti dall'analisi deselezionandoli nella schermata Analysis Criteria. Eseguire nuovamente la reazione qRT-PCR per il campione diluendo l'acido nucleico 1:100 utilizzando il tampone di eluizione appropriato.

Fase 2. Valutazione dei valori di soglia

- 8 Nell'impostazione Graph Type, cambiare la selezione da **Linear** a **Log**. Assicurarsi che il termine di fluorescenza sia impostato su ΔRn .

La visualizzazione dei grafici di amplificazione in valori logici fornisce una migliore visione del rumore di fondo del segnale. Ecco un esempio nella **Figura 21**. La linea di soglia per ogni target è visualizzata come una linea orizzontale.

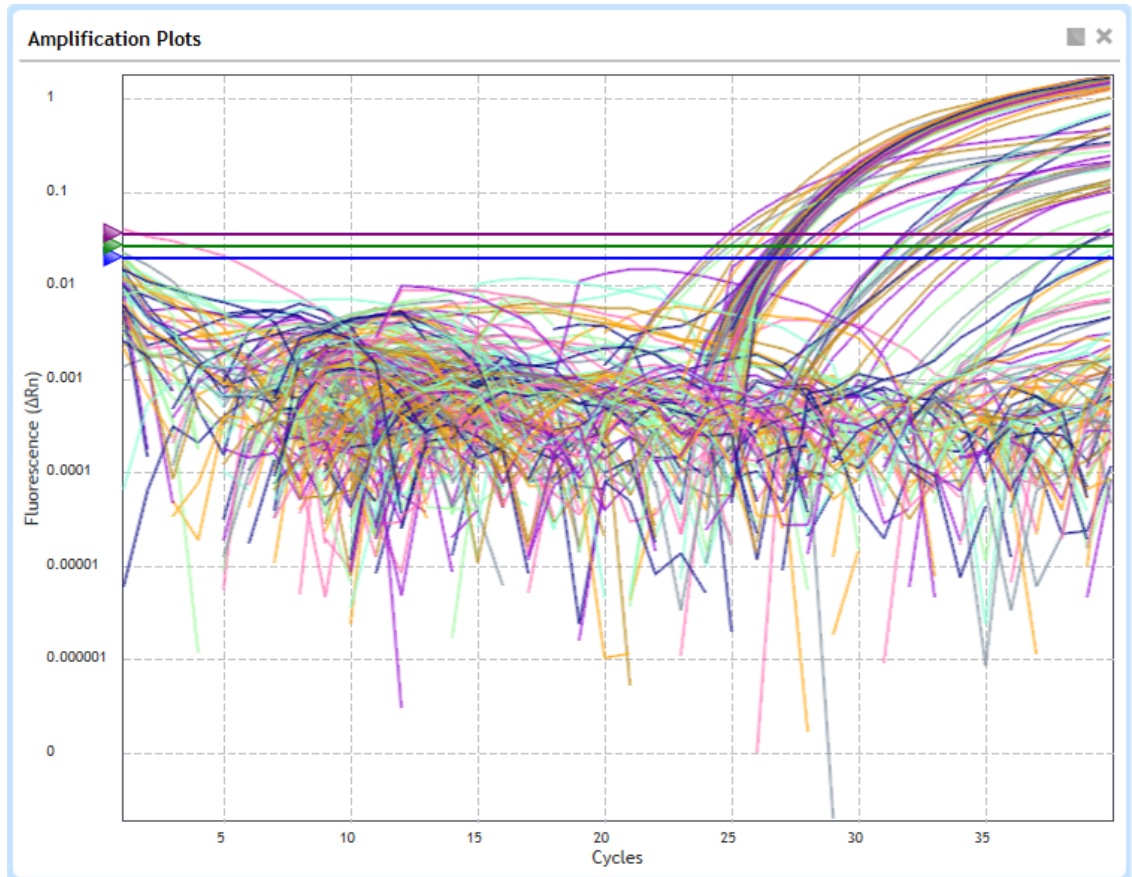




Figura 21 Grafici di amplificazione Aria in scala logaritmica: soglie target visualizzate come linee orizzontali

- 9 Valutare visivamente i grafici di amplificazione e la soglia predefinita per il target N1.

- Fare clic sull'icona di visualizzazione dei target sotto il grafico. 
- Nel menu che si apre, deselezionare le caselle per tutti gli altri target in modo che solo il target N1 sia visualizzato nel grafico Amplification Plots.
- Determinare se la soglia è abbastanza alta da essere al di sopra del rumore di fondo e abbastanza bassa da includere i grafici nella fase di amplificazione esponenziale (fare riferimento alla **Figura 23**). Sulla base di questa determinazione, procedere come indicato nella **Tabella 13**.

- 10 Ripetere il **passaggio 9** per il target N2 e di nuovo per il target RP.

- 11 In **Threshold Fluorescence**, assicurarsi che tutti e tre gli obiettivi siano contrassegnati e che tutti e tre i valori di Threshold Fluorescence siano bloccati, come mostrato nella **Figura 22**.

12 Fare clic sull'icona di visualizzazione dei target sotto il grafico.  Assicurarsi che tutti i target siano selezionati.

Threshold Fluorescence:







<input checked="" type="checkbox"/> N1	-	0.021	+		
<input checked="" type="checkbox"/> N2	-	0.028	+		
<input checked="" type="checkbox"/> RP	-	0.038	+		

Figura 22 Obiettivi selezionati e valori di soglia di fluorescenza bloccati

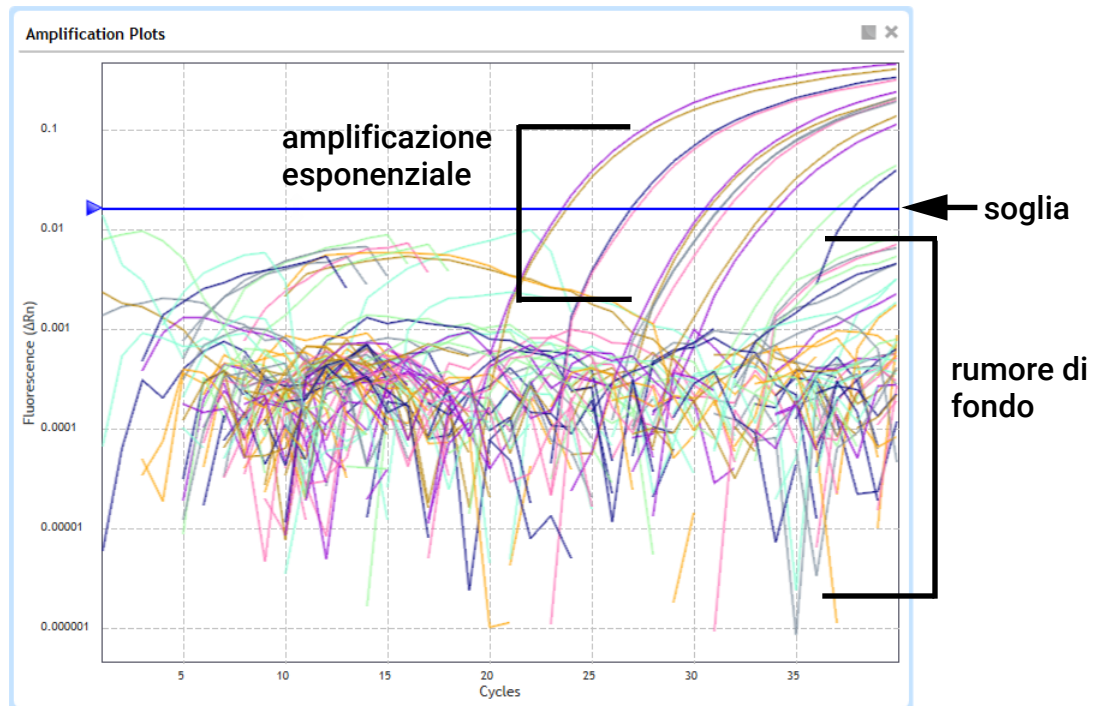


Figura 23 Grafici di amplificazione Aria per il target N1

Tabella 13 Verifica dell'impostazione della soglia ottimale nel software Aria

Posizione soglia	Descrizione	Azione
Posizione ottimale	Al di sopra del rumore di fondo e comprende tutti i grafici in fase di amplificazione esponenziale	<ul style="list-style-type: none"> Bloccare il valore di Threshold Fluorescence sul lato destro della schermata facendo clic sull'icona di blocco. <p>Quando il valore è bloccato, l'icona di blocco è in posizione chiusa. Bloccando il valore si impedisce che quest'ultimo cambi se uno qualsiasi dei criteri di analisi viene modificato.</p>
Troppo alto	Alcuni grafici nella fase di amplificazione esponenziale non superano la soglia	<ul style="list-style-type: none"> Cercare i pozzetti con un rumore di fondo eccezionalmente alto. Questi pozzetti anomali possono indurre il software a impostare la soglia troppo alta. Tornare alla schermata Analysis Criteria per escludere quel pozzetto dall'analisi. Il software ricalcolerà la soglia una volta escluso il pozzetto anomalo. In alternativa, utilizzare il mouse per trascinare manualmente la linea della soglia sul grafico in una nuova posizione. Verificare che la nuova soglia sia in una posizione ottimale e bloccare il valore di Threshold Fluorescence come descritto sopra. Una volta bloccato il nuovo valore, tornare ancora una volta alla schermata Analysis Criteria per reincludere il pozzetto anomalo nell'analisi.* <p>* Se il grafico di amplificazione per il pozzetto anomalo non mostra un'amplificazione esponenziale a nessun numero di ciclo, assicurarsi che la soglia abbassata non faccia sì che il software assegni un valore Cq al pozzetto (a causa del rumore del segnale di fondo che attraversa la soglia). Se ciò avviene, provare a modificare altre impostazioni di analisi per quel pozzetto, ad es. regolando l'impostazione Baseline Correction.</p>
Troppo basso	Alcuni grafici non sono al di sopra del rumore di fondo.	<ul style="list-style-type: none"> Aumentare la soglia appena sopra il livello del rumore di fondo.

Fase 3. Verifica dei risultati nel pozzetto NTC

13 Nella tabella dei risultati, individuare la reazione No Template Control (NTC, Controllo senza modello), situata nel pozzetto A12.

14 Assicurarsi che la colonna Cq per tutti e tre i target indichi "No Cq" o abbia un valore $Cq > 37,00$.

Se la reazione NTC ha un valore $Cq \leq 37,00$ per uno qualsiasi dei target, allora potrebbe essersi verificata una contaminazione del campione. Annullare la corsa e ripetere l'analisi rispettando rigorosamente le linee guida.

Esportazione dei dati dal software Aria

Fase 1. Definizione e salvataggio delle impostazioni di esportazione

Se le impostazioni di esportazione sono già state salvate, andate direttamente a "**Fase 2. Esportazione dei dati**" a pagina 53.

1 Sul lato sinistro della schermata, in **Results**, fare clic su **Export Data**.

Si apre la schermata Export Data.

- 2 Nel pannello Export Configuration, selezionare un tipo di file per i dati esportati, ad esempio **Excel**.
- 3 In **Items**, assicurarsi che la casella di controllo Tabular Results sia contrassegnata. Deselezionare le caselle di controllo per tutte le altre voci. Fare riferimento alla **Figura 24**.

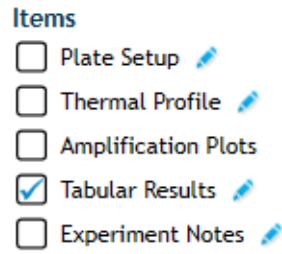
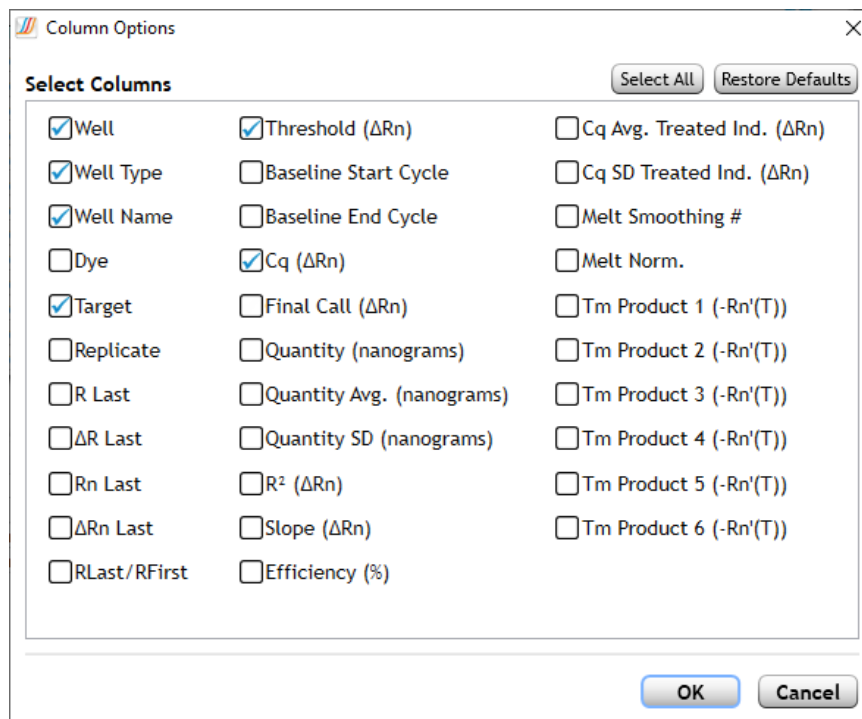


Figura 24 Schermata Aria software Export Data: elementi da esportare

- 4 Fare clic sull'icona della matita accanto a **Tabular Results** per personalizzare le colonne di dati da includere.
Si apre la finestra di dialogo Column Options.
- 5 Regolare le impostazioni in modo che le uniche colonne contrassegnate per l'inclusione siano quelle mostrate nella **Figura 25**.



Colonne
contrassegnate:
Pozzetto
Tipo pozzetto
Nome pozzetto
Target
Soglia
Cq

Figura 25 Finestra di dialogo Column Options

- 6 Fare clic su **OK** per salvare le modifiche e chiudere la finestra di dialogo.
- 7 Salvare le impostazioni di esportazione come una nuova definizione.
 - a Nel pannello Export Configuration, espandere l'elenco a discesa Definition.
 - b Fare clic su **Add New**.

Si apre la finestra di dialogo Add New Definition.

- c Nel campo Definizione name, digitare **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data**. Fare riferimento alla **Figura 26**.
- d Assicurarsi che la casella di controllo Use Current Settings sia contrassegnata.
- e Fare clic su **Add**.

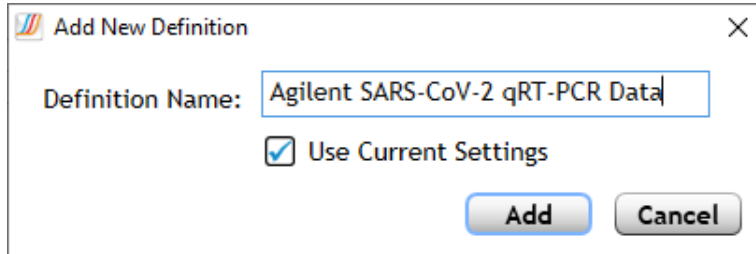


Figura 26 Finestra di dialogo Add New Definition

Fase 2. Esportazione dei dati

- 8 Nel pannello Export Configuration, assicurarsi che l'elenco a discesa Definition sia impostato su **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data**.
- 9 Fare clic su **Export Data**.
Il report si apre nell'applicazione predefinita per il tipo di file selezionato.
- 10 Esaminare i dati C_q per ciascuno dei campioni di test e dei controlli per interpretare i risultati. Vedere **Capitolo 6**, "Analisi e risultati".

Esecuzione di qRT-PCR sullo strumento PCR in tempo reale ABI 7500 Fast

Questa sezione descrive la procedura per eseguire qRT-PCR sullo strumento PCR in tempo reale Applied Biosystems 7500 Fast.

Esecuzione del programma qRT-PCR sullo strumento PCR in tempo reale ABI 7500 Fast

- 1 Assicurarsi che lo strumento ABI 7500 Fast sia acceso.
- 2 Dal computer collegato allo strumento, aprire l'esperimento creato in precedenza nel software 7500.
- 3 Sullo strumento, spingere lo sportello del vassoio per aprire il coperchio. Caricare la piastra di reazione nel blocco termico dello strumento.
- 4 Spingere lo sportello del vassoio per chiudere il coperchio.
- 5 Sul computer, fare clic su **START RUN**.

Lo strumento inizia a eseguire l'esperimento.

Assegnazione delle impostazioni di analisi dei dati per l'esperimento ABI 7500 Fast

Fase 1. Visualizzazione dei grafici di amplificazione per tutti i target in tutti i pozzetti

- 1 Quando la corsa è completa, aprire l'esperimento nel software Design & Analisi.
- 2 Sulla parte superiore della schermata, fare clic sulla scheda Quality Check, se non è già selezionata. Nell'elenco a discesa, assicurarsi che sia selezionato **Amplification Plot**.

La schermata visualizza i grafici di amplificazione, una tabella dei risultati in ogni pozzetto e un diagramma della mappa delle piastre.

NOTA

Se la piastra contiene pozzetti vuoti, omettere tutti i target per quei pozzetti dall'analisi e rianalizzare.

- 3 Fare clic su **Actions > Primary Analysis Setting**.

Si apre la finestra di dialogo Primary Analysis Settings. Le impostazioni predefinite in questa finestra di dialogo sono mostrate nella **Figura 27**.

- 4 Assicurarsi che le impostazioni corrispondano a quelle mostrate nella **Figura 27**. Se necessario, fare clic su **Reset to Default**.

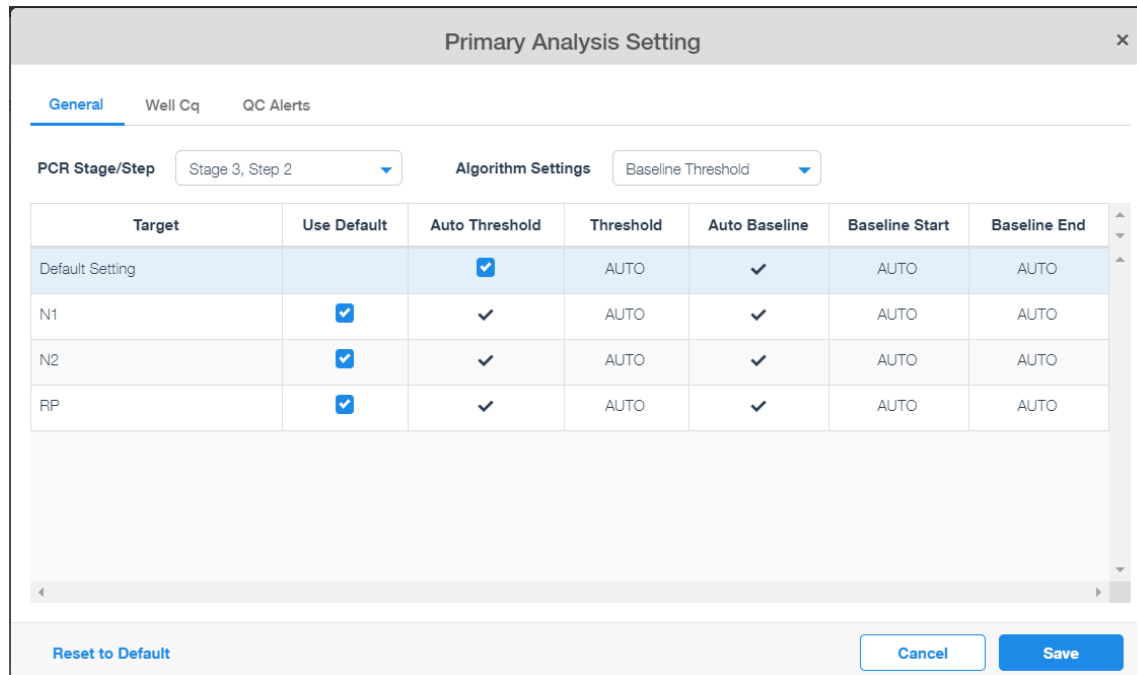


Figura 27 Impostazioni predefinite nella finestra di dialogo Design & Analysis Primary Analysis Setting

5 Fare clic su **Save**.

Si chiude la finestra di dialogo Primary Analysis Setting.

6 Assicurarsi che il pulsante Analyze abbia un segno di spunta verde nell'angolo. In caso contrario, fare clic su **Analyze**.

7 Controllare i grafici di amplificazione con amplificazione precoce (ossia, prima del ciclo 9). Omettere dall'analisi i campioni con amplificazione precoce e ripetere il test a una concentrazione inferiore.

Nei campioni di test con concentrazioni insolitamente alte di RNA virale, l'amplificazione dei target virali può raggiungere livelli rilevabili a un numero di cicli molto precoce (< 9). Come parte dei calcoli di correzione della linea di base, il software può interpretare tali segnali di amplificazione precoce come rumore di fondo e non riuscire ad assegnare un valore Cq ai target virali in tali campioni.

Monitorare la presenza di tali campioni di test visualizzando il diagramma di amplificazione senza correzione della linea di base (impostare **Y Value** su **Rn**). Se qualcuno dei campioni da analizzare mostra segni di amplificazione prima del ciclo 9, rimuovere tali pozzetti dall'analisi omettendoli nella schermata Quality Check. Eseguire nuovamente la reazione qRT-PCR per il campione diluendo l'acido nucleico 1:100 utilizzando il tampone di eluizione appropriato.

Fase 2. Valutazione dei valori di soglia

8 Fare clic sull'icona Settings appena sopra il grafico Amplification Plot.

La finestra di dialogo Settings si apre nella scheda General.

9 Assicurarsi che il valore Y sia impostato su ΔRn .

10 Nell'elenco a discesa Y Scale, cambiare la selezione da **Linear** a **Log**, come mostrato nella **Figura 28**.

La visualizzazione dei grafici di amplificazione in valori logici fornisce una migliore visione del rumore di fondo del segnale. Ecco un esempio nella **Figura 29**. La linea di soglia per ogni target è visualizzata come una linea orizzontale.

General X Axis Y Axis

Plot Title: Amplification Plot

Color By: Target

Y Value: ΔRn Rn

Y Scale: Log

Show: Legend Cq Mark
 Unselected Tooltip
 Replicates of selected
 Threshold Baseline

Reset Setting

Figura 28 Impostazioni generali di Design & Analysis per il grafico di amplificazione

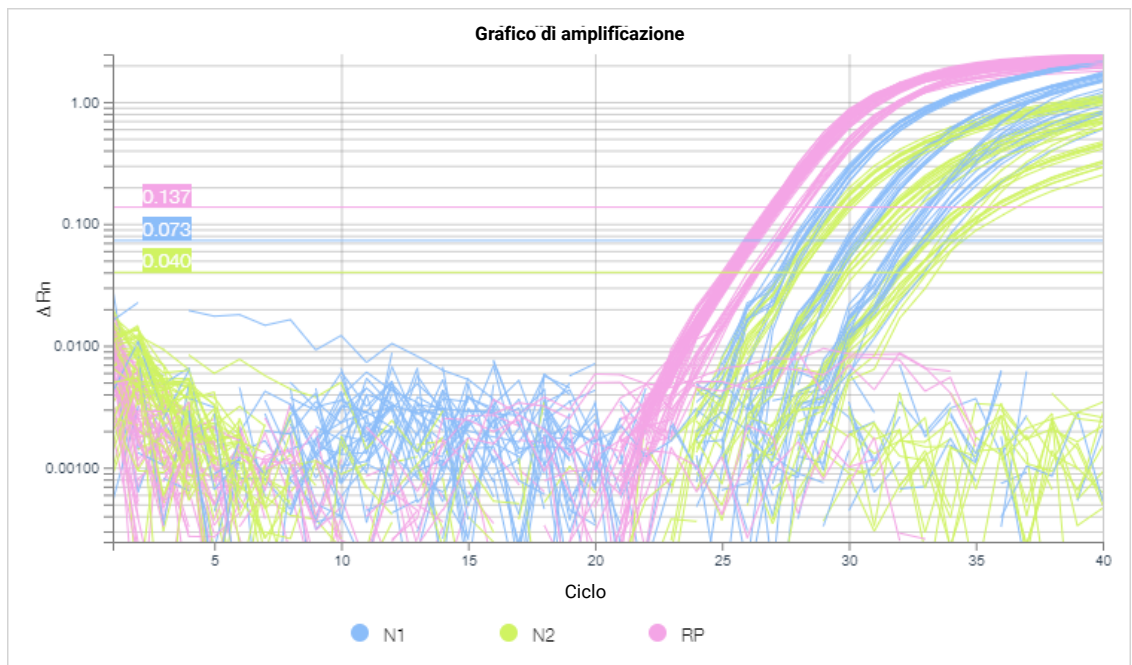


Figura 29 Grafici di amplificazione di Design & Analysis in scala logaritmica: soglie target visualizzate come linee orizzontali

- 11 Valutare visivamente i grafici di amplificazione e la soglia predefinita per il target N1.
 - a Sul lato sinistro della schermata, espandere l'elenco a discesa Targets.
 - b Selezionare solo il target N1, quindi chiudere l'elenco a discesa.
 - c Determinare se la soglia è abbastanza alta da essere al di sopra del rumore di fondo e abbastanza bassa da includere i grafici nella fase di amplificazione esponenziale (fare riferimento alla **Figura 30**). Sulla base di questa determinazione, procedere come indicato nella **Tabella 14**.
- 12 Ripetere il **passaggio 11** per il target N2 e di nuovo per il target RP.
- 13 Sul lato sinistro della schermata, in **Targets**, fare clic su **Clear all** per rimuovere il filtraggio per target.

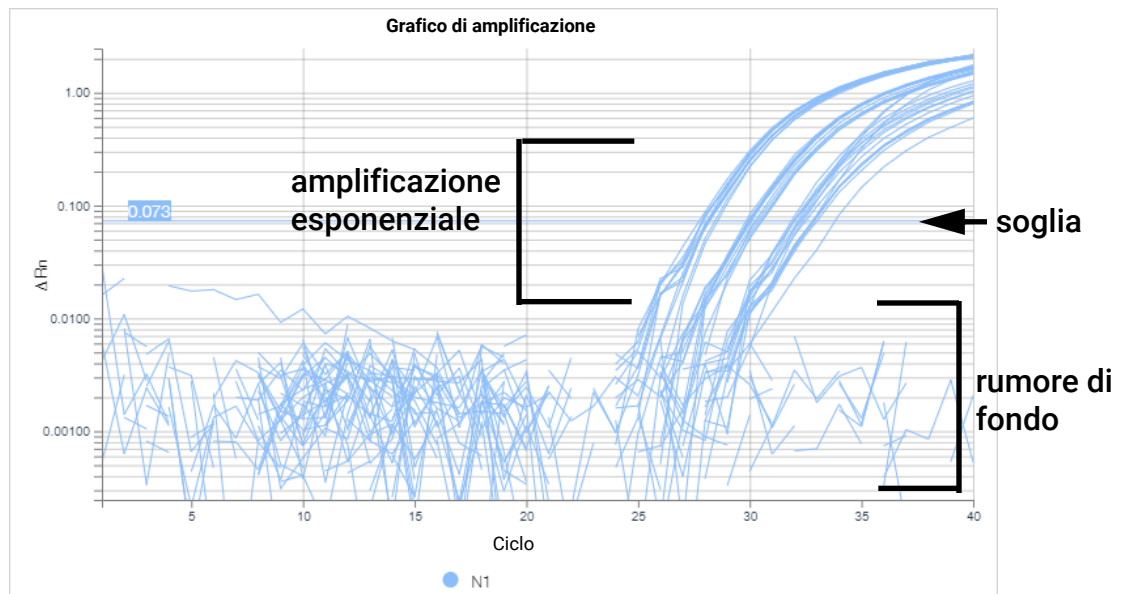


Figura 30 Grafici di amplificazione Design & Analysis per il target N1

Tabella 14 Verifica dell'impostazione della soglia ottimale nel software Design & Analysis

Posizione soglia	Descrizione	Azione
Posizione ottimale	Al di sopra del rumore di fondo e comprende tutti i grafici in fase di amplificazione esponenziale	<ul style="list-style-type: none"> • Lasciare le soglie ai loro valori attuali.
Troppo alto	Alcuni grafici nella fase di amplificazione esponenziale non superano la soglia	<ul style="list-style-type: none"> • Cercare i pozzetti con un rumore di fondo eccezionalmente alto. Questi pozzi anomali possono indurre il software a impostare la soglia troppo alta. • Selezionare il pozzetto anomalo sulla mappa delle piastre. • Nella barra degli strumenti direttamente sulla mappa delle piastre, fare clic sul pulsante con tre punti. Nel menu che si apre, fare clic su Omit Wells. • Fare clic su Analyze. Il software ricalcherà la soglia una volta escluso il pozzetto anomalo. In alternativa, utilizzare il mouse per trascinare manualmente la linea della soglia sul grafico in una nuova posizione. • Selezionare tutti i pozzetti sulla mappa delle piastre per visualizzare tutti i grafici di amplificazione. Verificare che la nuova soglia sia in una posizione ottimale. • Fare di nuovo clic sul pulsante con tre puntini. Nel menu che si apre, fare clic su Unomit Wells per reincludere il pozzetto anomalo nell'analisi.* <p>* Se il grafico di amplificazione per il pozzetto anomalo non mostra un'amplificazione esponenziale a nessun numero di ciclo, assicurarsi che la soglia abbassata non faccia sì che il software assegni un valore Cq al pozzetto (a causa del rumore del segnale di fondo che attraversa la soglia). Se ciò avviene, provare a modificare altre impostazioni di analisi per quel pozzetto, ad es. regolando l'impostazione i numeri del ciclo Baseline Start e/o Baseline End.</p>
Troppo basso	Alcuni grafici non sono al di sopra del rumore di fondo.	<ul style="list-style-type: none"> • Aumentare la soglia appena sopra il livello del rumore di fondo.

Fase 3. Verifica dei risultati nel pozzetto NTC

14 Nella tabella dei pozzetti, individuare la reazione No Template Control (NTC, Controllo senza modello), situata nel pozzetto A12.

15 Assicurarsi che la colonna Cq per tutti e tre i target indichi "Undetermined" (Indeterminato) o abbia un valore Cq > 37,00.

Se la reazione NTC ha un valore Cq ≤ 37,00 per uno qualsiasi dei target, allora potrebbe essersi verificata una contaminazione del campione. Annullare la corsa e ripetere l'analisi rispettando rigorosamente le linee guida.

Esportazione dei dati della tabella dei pozzetti dal software Design & Analysis in un file CSV

Fase 1. Personalizzazione delle colonne incluse nella Tabella dei pozzetti

- 1 Nella barra degli strumenti immediatamente sopra la tabella dei pozzetti, fare clic su **View**.

Si apre un menu, come mostrato nella **Figura 31**, che elenca tutte le colonne della tabella disponibili.

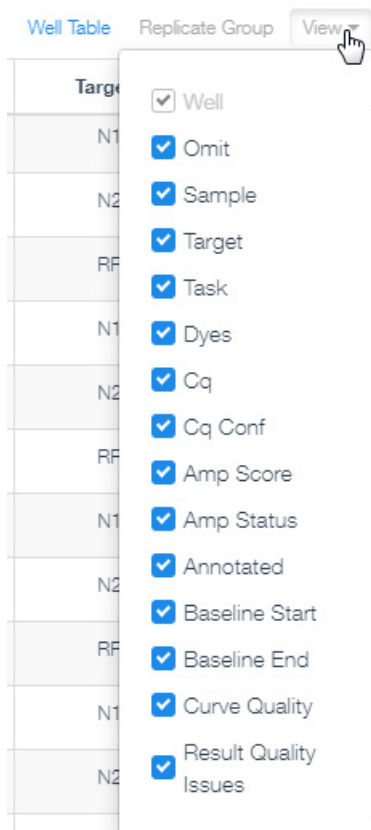
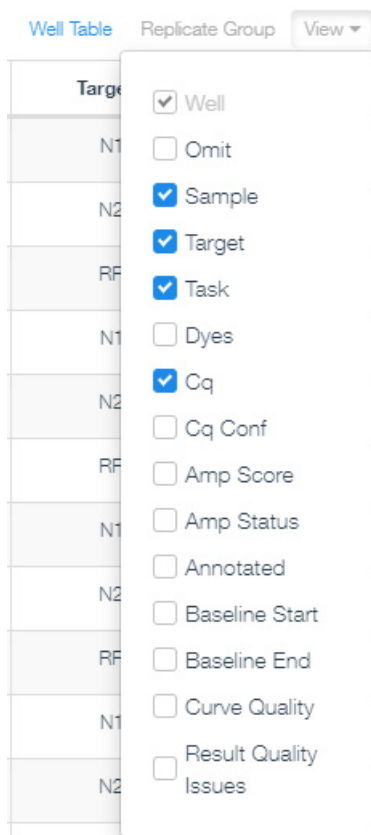


Figura 31 Vista menu per la tabella dei pozzetti Design & Analysis: selezione di colonne predefinita

- 2 Regolare le impostazioni in modo che le uniche colonne contrassegnate per l'inclusione siano Well, Sample, Target, Task e Cq. Fare riferimento alla **Figura 32**.



Colonne
contrassegnate:

Campione

Target

Attività

Cq

Figura 32 Vista menu per la tabella dei pozzetti Design & Analysis: selezione di colonne personalizzate

3 Fare clic su **View** per far comprimere il menu.

Fase 2. Esportazione dei dati

4 Nella barra degli strumenti immediatamente sulla mappa delle piastre, fare clic sul pulsante della barra degli strumenti con tre puntini. **...**

5 Nel menu che si apre, fare clic su **Export**.

Si apre una finestra di dialogo per salvare il file CSV.

6 Selezionare una cartella per il nuovo file.

7 Nel campo del nome File, digitare un nome per il file.

8 Fare clic su **Save**.

La finestra di dialogo si chiude e il programma esporta i dati nel tipo di file CSV e li salva nella cartella designata.

9 Aprire il file ed esaminare i dati Cq per ciascuno dei campioni di test e dei controlli per interpretare i risultati. Vedere **Capitolo 6**, "Analisi e risultati".

Esecuzione di qRT-PCR sul sistema di rilevazione PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96 Touch

Questa sezione descrive la procedura per eseguire qRT-PCR su un sistema di rilevazione PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96 Touch.

Esecuzione del programma qRT-PCR sul sistema di rilevazione PCR in tempo reale CFX96 Touch

- 1 Assicurarsi che lo strumento CFX96 Touch sia acceso.
- 2 Dal computer collegato allo strumento, aprire l'esperimento creato in precedenza nel software CFX Maestro.
- 3 Navigare nella scheda Start Run della schermata Run Setup.
Se lo strumento è acceso ma non è visualizzato in **Block Name**, fare clic su **Detect Instrument(s)** nell'angolo superiore sinistro della schermata.
- 4 Nella tabella, selezionare lo strumento da utilizzare per l'esecuzione dell'esperimento.
- 5 Fare clic su **Open Lid**.
Il coperchio dello strumento si apre.
- 6 Caricare la piastra di reazione nel blocco termico dello strumento.
- 7 Sul computer, fare clic su **Close Lid**.
Il coperchio dello strumento si chiude.
- 8 Fare clic su **Start Run**.
- 9 Salvare il file di esecuzione nella cartella desiderata. Inserire un nome per il file e fare clic su **Save**.
Lo strumento inizia a eseguire l'esperimento.

Assegnazione delle impostazioni di analisi dei dati per il sistema di rilevazione PCR in tempo reale CFX96 Touch

Fase 1. Visualizzazione dei grafici di amplificazione per tutti i target in tutti i pozzetti

- 1 Quando la corsa è completa, aprire l'esperimento nel software CFX Maestro.
L'esperimento si apre nella finestra Data Analysis.
- 2 Sulla parte superiore della finestra, fare clic sulla scheda Quantification, se non è già selezionata.
La finestra visualizza i grafici di amplificazione, una tabella dei risultati in ogni pozzetto e un diagramma della mappa delle piastre.

- 3 Applicare la funzione Fluorescence Drift Correction.
 - Nella parte superiore della finestra Data Analysis, fare clic su **Settings > Baseline Settings > Apply Fluorescence Drift Correction**.

Il software corregge automaticamente qualsiasi deriva del segnale di fluorescenza che può essere presente nell'intervallo del ciclo della linea di base.

- 4 Controllare i grafici di amplificazione con amplificazione precoce (ossia, prima del ciclo 9). Escludere dall'analisi i campioni con amplificazione precoce e ripetere il test a una concentrazione inferiore.

Nei campioni di test con concentrazioni insolitamente alte di RNA virale, l'amplificazione dei target virali può raggiungere livelli rilevabili a un numero di cicli molto precoce (< 9). Come parte dei calcoli di correzione della linea di base, il software può interpretare tali segnali di amplificazione precoce come rumore di fondo e non riuscire ad assegnare un valore Cq ai target virali in tali campioni.

Monitorare la presenza di tali campioni di test visualizzando i grafici di amplificazione senza correzione della linea di base (impostare **Baseline Setting** su **No Baseline Subtraction**). Se qualcuno dei campioni da analizzare mostra segni di amplificazione prima del ciclo 9, rimuovere tali pozzetti dall'analisi dalla finestra Plate Editor. Eseguire nuovamente la reazione qRT-PCR per il campione diluendo l'acido nucleico 1:100 utilizzando il tampone di eluizione appropriato.

Fase 2. Valutazione dei valori di soglia

- 5 Controllare la selezione in **Settings > Baseline Setting** per assicurarsi che sia impostato su **Baseline Subtracted Curve Fit**.
- 6 Fare clic con il pulsante destro del mouse sul grafico dell'amplificazione e selezionare **Show Threshold Values** (se non è già contrassegnato).

La linea di soglia per ogni target è visualizzata come una linea orizzontale.

- 7 Vicino all'angolo in basso a destra del grafico dell'amplificazione, contrassegnare la casella di controllo Log.

La visualizzazione dei grafici di amplificazione in valori logici fornisce una migliore visione del rumore di fondo del segnale.

- 8 Impostare il valore minimo dell'asse Y a 0,0.

- a A destra del grafico dell'amplificazione, fare clic sull'icona Chart Settings. 

Si apre la finestra di dialogo Chart Settings.

- b Fare clic sulla scheda Axes Scale.

- c Deselezionare la casella di controllo Auto Scale.

- d Nella colonna **Min** per l'**asse Y (log 10)**, digitare **0,0**, come mostrato nella **Figura 33**.

- e Fare clic su **OK**.

La finestra di dialogo si chiude e la scala dell'asse Y inizia a 0,0, permettendo di visualizzare il rumore del segnale nei grafici. Ecco un esempio nella **Figura 34**.

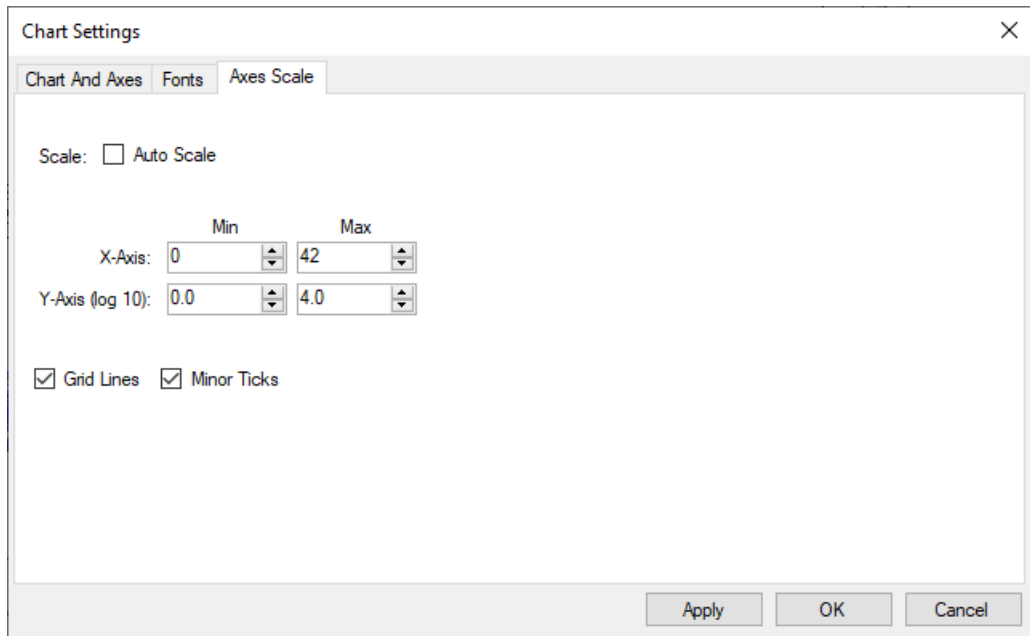


Figura 33 Finestra di dialogo Maestro Chart Settings: scheda Axes Scale

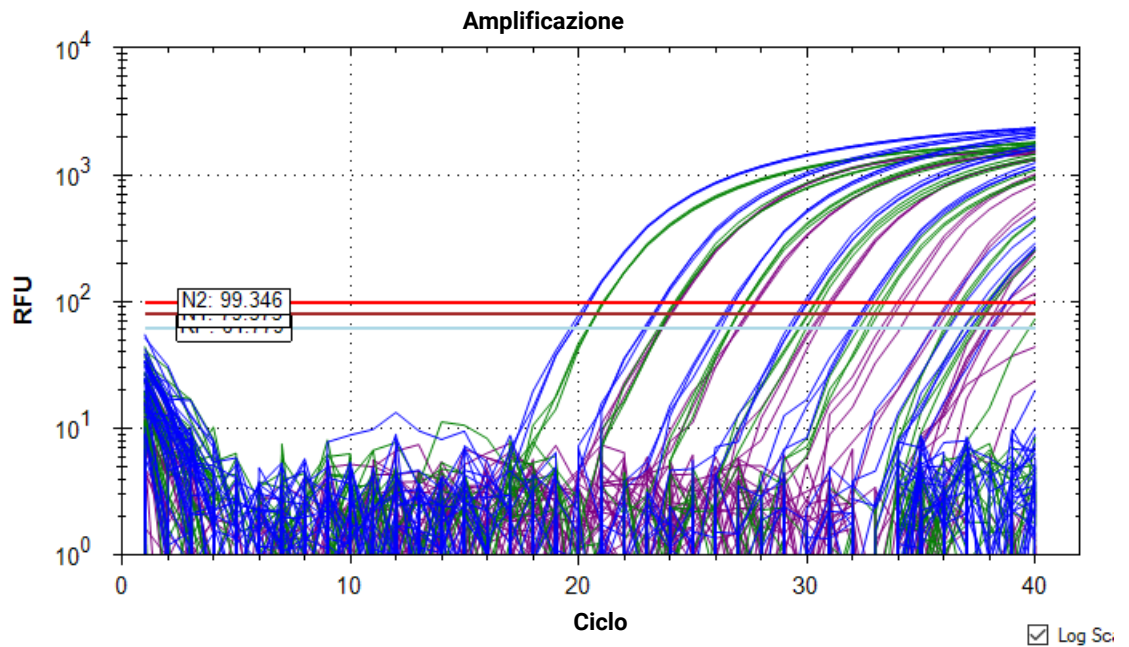


Figura 34 Grafico di amplificazione Aria in scala logaritmica: soglie target visualizzate come linee orizzontali

- 9 Valutare visivamente i grafici di amplificazione e la soglia predefinita per il target N1.
- a Sotto il grafico di amplificazione, usare le caselle di controllo per selezionare solo il target FAM (N1) da visualizzare.
 - b Determinare se la soglia è abbastanza alta da essere al di sopra del rumore di fondo e abbastanza bassa da includere i grafici nella fase di amplificazione esponenziale (fare riferimento alla **Figura 35**). Sulla base di questa determinazione, procedere come indicato nella **Tabella 15**.
- 10 Ripetere il **passaggio 11** per il target N2 e di nuovo per il target RP.

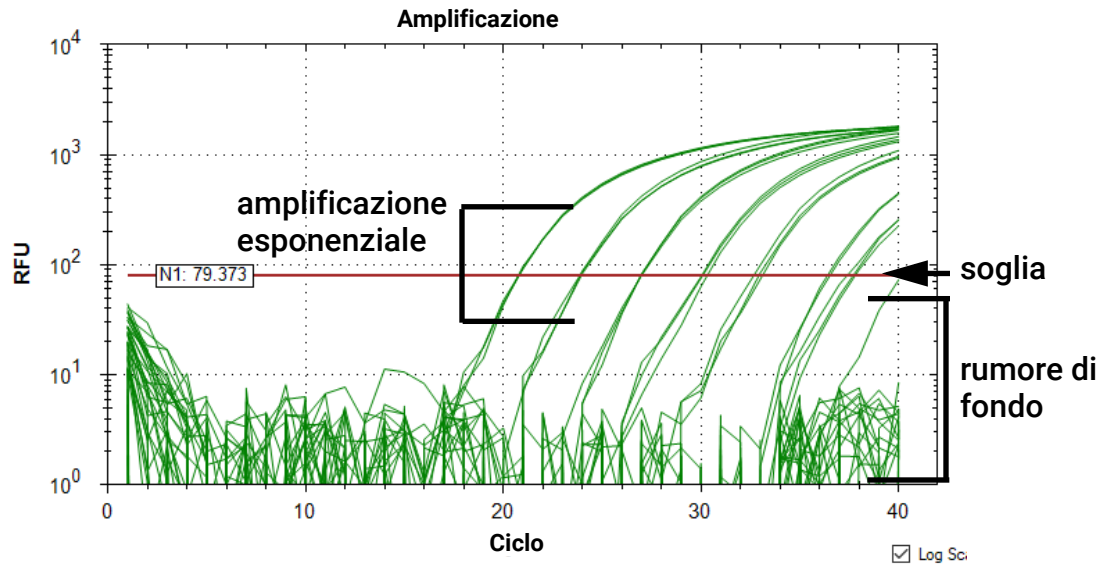


Figura 35 Grafici di amplificazione Maestro per il target N1

Tabella 15 Verifica dell'impostazione della soglia ottimale nel software Design & Analysis

Posizione soglia	Descrizione	Azione
Posizione ottimale	Al di sopra del rumore di fondo e comprende tutti i grafici in fase di amplificazione esponenziale	<ul style="list-style-type: none"> • Lasciare le soglie ai loro valori attuali.
Troppo alto	Alcuni grafici nella fase di amplificazione esponenziale non superano la soglia	<ul style="list-style-type: none"> • Cercare i pozzetti con un rumore di fondo eccezionalmente alto. Questi pozzi anomali possono indurre il software a impostare la soglia troppo alta. • Fare clic su Plate Setup > View/Edit Plate per aprire Plate Editor. • Selezionare il pozzetto anomalo sulla mappa delle piastre. • Nel pannello sul lato destro dell'editor della piastra, contrassegnare la casella di controllo etichettata Exclude Wells in Analysis (situata nella parte inferiore del pannello). • Fare clic su OK. Quando viene chiesto se applicare le modifiche, fare clic su Yes. Il software ricalcolerà la soglia una volta escluso il pozzetto anomalo. In alternativa, utilizzare il mouse per trascinare manualmente la linea della soglia sul grafico in una nuova posizione. • Sul lato destro del grafico di amplificazione, fare clic sull'icona Baseline Threshold per aprire la relativa finestra di dialogo. • In Single Threshold, modificare la selezione da Auto Calculated a User Defined. (ciò impedisce al software di ricalcolare la soglia una volta che il pozzetto anomalo è stato reincluso). Fare clic su OK per chiudere la finestra di dialogo. • Fare clic su Plate Setup > View/Edit Plate per riaprire l'editor piastra. Selezionare il pozzetto anomalo e deselegionare la casella di controllo Exclude Wells in Analysis. Fare clic su OK, quindi su Yes. • Nella mappa delle piastre sotto il grafico di amplificazione, selezionare tutti i pozzetti per reincludere il pozzetto anomalo nell'analisi.* <p>* Se il grafico di amplificazione per il pozzetto anomalo non mostra un'amplificazione esponenziale a nessun numero di ciclo, assicurarsi che la soglia abbassata non faccia sì che il software assegni un valore Cq al pozzetto (a causa del rumore del segnale di fondo che attraversa la soglia). Se ciò avviene, provare a modificare altre impostazioni di analisi per quel pozzetto, ad es. regolando l'impostazione i numeri del ciclo Baseline Begin e/o Baseline End.</p>
Troppo basso	Alcuni grafici non sono al di sopra del rumore di fondo.	<ul style="list-style-type: none"> • Aumentare la soglia appena sopra il livello del rumore di fondo.

Fase 3. Verifica dei risultati nel pozzetto NTC

11 Nella tabella che mostra i risultati, individuare la reazione No Template Control (NTC, Controllo senza modello), situata nel pozzetto A12.

12 Assicurarsi che la colonna Cq per tutti e tre i target indichi "N/A" o abbia un valore Cq > 37,00.

Se la reazione NTC ha un valore Cq ≤ 37,00 per uno qualsiasi dei target, allora potrebbe essersi verificata una contaminazione del campione. Annullare la corsa e ripetere l'analisi rispettando rigorosamente le linee guida.

Esportazione dei dati dal software CFX Maestro

- 1 Nella parte superiore della finestra Data Analysis, fare clic su **Export > Custom Export**.
Si apre la finestra di dialogo Custom Export.
- 2 Nel campo Export Format, selezionare un tipo di file per i dati esportati, ad esempio **Excel 2007 (*.xlsx)**.
Assicurarsi che il computer abbia il software necessario per aprire il tipo di file selezionato.
- 3 Nella finestra di dialogo, contrassegnare le caselle di controllo come mostrato nella **Figura 36**.
Esaminare la sezione Exported Columns per assicurarsi che elenchi **Well**, **Target Name**, **Sample Name** e **Cq**.

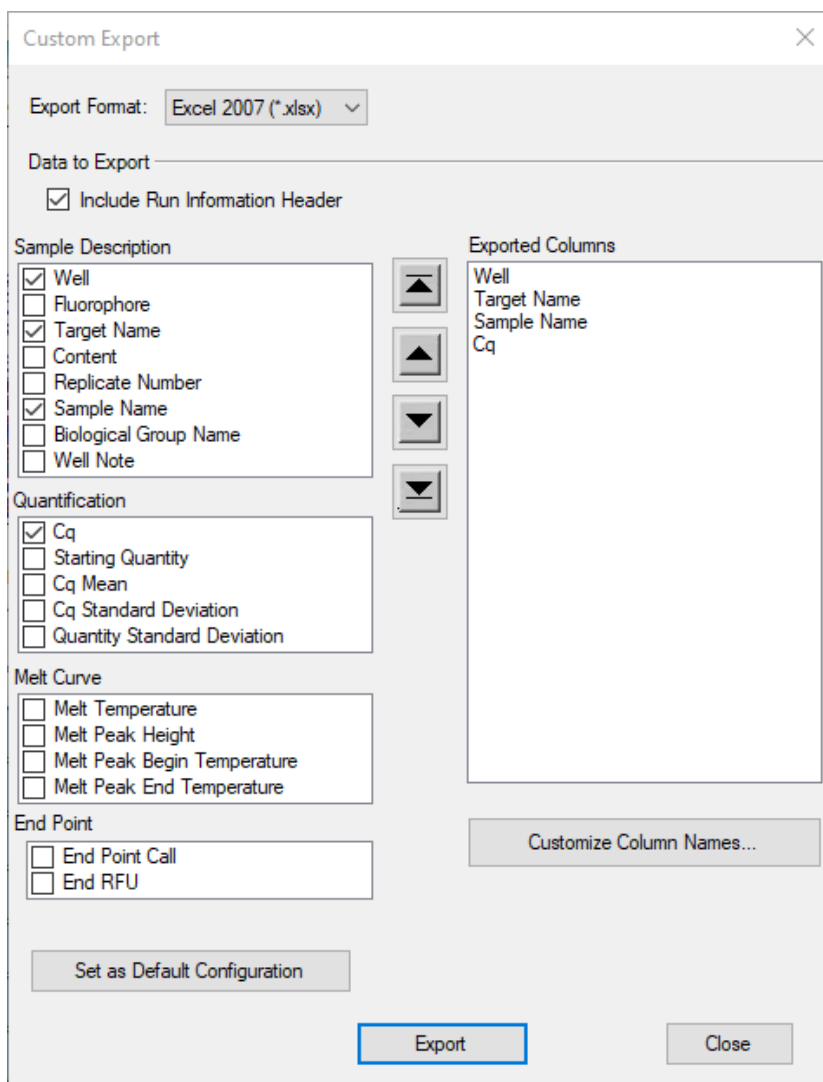


Figura 36 Impostazioni di esportazione dati personalizzate per l'applicazione CFX Maestro

- 4 Fare clic su **Export**.
Si apre la finestra di dialogo Save As.
- 5 Selezionare una cartella per il nuovo file.

- 6 Nel campo del nome File, digitare un nome per il file o utilizzare quello predefinito.
- 7 Fare clic su **Save**.

La finestra di dialogo si chiude e il programma esporta i dati nel tipo di file selezionato e li salva nella cartella designata.

- 8 Aprire il file ed esaminare i dati Cq per ciascuno dei campioni di test e dei controlli per interpretare i risultati. Vedere [Capitolo 6](#), "Analisi e risultati".

6 Analisi e risultati

Interpretazione dei risultati **69**

Il capitolo contiene informazioni sull'interpretazione dei risultati dell'analisi basati sui dati qRT-PCR.

Interpretazione dei risultati

Risultati e interpretazione per i campioni di controllo

Se uno qualsiasi dei controlli non mostra le prestazioni attese come descritto in **Tabella 16**, l'analisi potrebbe essere stata impostata o eseguita in modo improprio o potrebbe essersi verificato un malfunzionamento dei reagenti o delle apparecchiature. In tal caso, annullare la corsa e ripetere l'analisi.

No Template Control (NTC, Controllo senza modello)

L'NTC consiste nell'utilizzare acqua priva di nucleasi nella reazione qRT-PCR al posto dell'RNA. La reazione NTC non dovrebbe mostrare curve di crescita della fluorescenza che attraversano la linea di soglia entro 37,00 cicli per nessuno dei tre target. Se la reazione NTC mostra una curva di crescita con un Cq \leq 37,00, potrebbe essersi verificata una contaminazione del campione. Annullare la corsa e ripetere l'analisi rispettando rigorosamente le linee guida.

SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx

La reazione qRT-PCR per SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx darà un risultato positivo con i target 2019-nCoV_N1 e 2019-nCoV_N2 con un valore Cq inferiore o uguale a 37,00, mentre darà un risultato negativo (riportato come nessun Cq rilevato o Cq > 37,00) con il target del gene RNase P umano.

Controllo dei Campioni Umani

Il Controllo dei Campioni Umani consiste in cellule umane non infette e viene utilizzato come controllo procedurale per l'estrazione dell'RNA per dimostrare la riuscita dell'estrazione dell'RNA e l'integrità del reagente di estrazione. La reazione qRT-PCR per l'RNA estratto dal Controllo dei Campioni Umani deve dare un risultato positivo con il target RP con un valore Cq inferiore o uguale a 37,00. I target N1 e N2 di SARS-CoV-2 dovrebbero dare risultati negativi (riportati come nessun Cq rilevato o Cq > 37,00).

Tabella 16 Prestazioni attese dei controlli

Tipo controllo	Nome controllo	Usato per monitorare	Risultato target N1	Risultato target N2	Risultato target RP
Positivo	SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Fallimento sostanziale dei reagenti, compresa l'integrità del primer e della sonda	Positivo (Cq \leq 37,00)	Positivo (Cq \leq 37,00)	Negativo (nessun Cq rilevato o Cq > 37,00)
Negativo	NTC	Contaminazione dei reagenti e/o dell'ambiente	Negativo (nessun Cq rilevato o Cq > 37,00)	Negativo (nessun Cq rilevato o Cq > 37,00)	Negativo (nessun Cq rilevato o Cq > 37,00)
Estrazione	Controllo dei Campioni Umani	Fallimento nella procedura di lisi ed estrazione, potenziale contaminazione durante l'estrazione	Negativo (nessun Cq rilevato o Cq > 37,00)	Negativo (nessun Cq rilevato o Cq > 37,00)	Positivo (Cq \leq 37,00)

Risultati e interpretazione per i campioni clinici

Tabella 17 elenca i risultati attesi per l'analisi. Se un laboratorio ottiene risultati inaspettati per i controlli dell'analisi o se si ottengono risultati inconcludenti o non validi che non possono essere risolti attraverso la ripetizione del test raccomandata, contattare il CDC per la consultazione e l'eventuale rinvio del campione.

Target del gene umano RNase P (RP)

Tutti i campioni clinici dovrebbero mostrare curve di crescita della fluorescenza per il target RP che attraversano la linea di soglia entro 37,00 cicli ($Cq \leq 37,00$), indicando così la presenza del gene della RNasi P umana. La mancata rilevazione del target RP in qualsiasi campione clinico potrebbe indicare:

- Estrazione impropria di acido nucleico da materiali clinici con conseguente perdita di RNA e/o degradazione dell'RNA o trasporto di sostanze inibitorie.
- Assenza di sufficiente materiale cellulare umano a causa di una scarsa raccolta o della perdita di integrità del campione.
- Impostazione ed esecuzione impropria dell'analisi.
- Malfunzionamento del reagente o dell'attrezzatura.

Se l'analisi RP non produce un risultato positivo per i campioni clinici umani, interpretare come segue:

- Se i target N1 e N2 sono positivi ($Cq \leq 37,00$) anche in assenza di un RP positivo, il risultato dovrebbe essere considerato valido. È possibile che alcuni campioni non riescano a mostrare le curve di crescita della RNasi P a causa del basso numero di cellule nel campione clinico originale o a causa dei target virali che riducono l'efficienza di amplificazione della RP, specialmente nei campioni con un'elevata carica virale. Un segnale RP negativo non preclude la presenza di RNA del virus SARS-CoV-2 in un campione clinico.
- Se il target RP è negativo (nessun Cq rilevato o $Cq > 37,00$) mentre uno o entrambi i target N1 e N2 sono negativi (nessun Cq rilevato o $Cq > 37,00$), il risultato dovrebbe essere considerato non valido per il campione. Se il campione residuo è disponibile, ripetere la procedura di estrazione e ripetere il test. Se tutti i target rimangono negativi dopo un nuovo test, riportare i risultati come non validi e raccogliere un nuovo campione, se possibile.

Target 2019-nCoV_N1 and 2019-nCoV_N2

- Quando tutti i controlli mostrano le prestazioni previste, un campione è considerato **positivo** per SARS-CoV-2 se la seguente condizione è soddisfatta.
 - Le curve di crescita per entrambi i target N1 e N2 attraversano la linea di soglia entro 37,00 cicli ($Cq \leq 37,00$). Il target RP può essere positivo o meno (vedere descrizione sopra) ma il risultato SARS-CoV-2 è ancora valido.
- Quando tutti i controlli mostrano le prestazioni previste, un campione è considerato **negativo** per SARS-CoV-2 se ENTRAMBE le seguenti condizioni sono soddisfatte.
 - Le curve di crescita per i target N1 e N2 NON attraversano la linea di soglia entro 37,00 cicli (nessun Cq rilevato o $Cq > 37,00$).
 - La curva di crescita per il target RP ATTRAVERSA la linea di soglia entro 37,00 cicli ($Cq \leq 37,00$).

- Quando tutti i controlli mostrano le prestazioni previste, un campione è considerato **inconcludente** per SARS-CoV-2 se UNA DELLE DUE seguenti condizioni è soddisfatta.
 - La curva di crescita per uno dei target 2019-nCoV attraversa la linea di soglia entro 37,00 cicli ($Cq \leq 37,00$) mentre la curva di crescita per l'altro target 2019-nCoV non attraversa la linea di soglia entro 37,00 cicli (nessun Cq rilevato o $Cq > 37,00$). La curva di crescita per il target RP attraversa la linea di soglia entro 37,00 cicli ($Cq \leq 37,00$).

Per i campioni inconcludenti, l'RNA estratto dal campione deve essere nuovamente analizzato. Se l'RNA residuo non è disponibile, estrarre nuovamente l'RNA dal campione residuo e ripetere il test. Se si ottiene lo stesso risultato, riportare il risultato inconcludente.

- Se il Controllo dei Campioni Umani è positivo per N1 o N2 ($Cq \leq 37,00$), potrebbe essersi verificata una contaminazione durante l'estrazione o il trattamento del campione. Invalidare tutti i risultati per i campioni estratti insieme al Controllo dei Campioni Umani. Estrarre nuovamente i campioni e il Controllo dei Campioni Umani e ripetere il test.

Tabella 17 Risultati attesi per l'analisi qRT-PCR di SARS-CoV-2

2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	Gene umano RNase P	Interpretazione dei risultati*	Report	Azioni
Positivo ($Cq \leq 37,00$)	Positivo ($Cq \leq 37,00$)	Positivo o negativo	Rilevato SARS-CoV-2	Positivo SARS-CoV-2	Riportare i risultati al CDC e al mittente
Negativo (nessun Cq rilevato o $Cq > 37,00$)	Negativo (nessun Cq rilevato o $Cq > 37,00$)	Positivo ($Cq \leq 37,00$)	SARS-CoV-2 non rilevato	Non rilevato	Riportare i risultati al mittente. Considerare il test per altri virus respiratori. [†]
Positivo ($Cq \leq 37,00$)	Negativo (nessun Cq rilevato o $Cq > 37,00$)	Positivo ($Cq \leq 37,00$)	Risultato inconcludente	Inconcludente	Ripetere il test del campione estratto e/o ripetere l'estrazione e qRT-PCR.
Negativo (nessun Cq rilevato o $Cq > 37,00$)	Positivo ($Cq \leq 37,00$)	Positivo ($Cq \leq 37,00$)	Risultato inconcludente	Inconcludente	Ripetere il test del campione estratto e/o ripetere l'estrazione e qRT-PCR.
Se uno o entrambi i target 2019-nCoV è negativo (nessun Cq rilevato o $Cq > 37,00$)		Negativo (nessun Cq rilevato o $Cq > 37,00$)	Risultato non valido	Non valido	Ripetere l'estrazione e qRT-PCR. Se il risultato ripetuto rimane non valido, considerare la raccolta di un nuovo campione dal paziente.

* I laboratori dovrebbero riportare il loro risultato diagnostico come appropriato e in conformità al loro specifico sistema di segnalazione.

[†] Non sono stati determinati i tipi di campioni e i tempi ottimali per i livelli virali di picco durante le infezioni causate dal 2019-nCoV. La raccolta di più campioni dallo stesso paziente può essere necessaria per rilevare il virus. La possibilità di un risultato falso negativo dovrebbe essere considerata soprattutto se le recenti esposizioni del paziente o la presentazione clinica suggeriscono che l'infezione da 2019-nCoV è possibile, e i test diagnostici per altre cause di malattia (ad es. altre malattie respiratorie) sono negativi. Se si sospetta ancora un'infezione da 2019-nCoV, si dovrebbe prendere in considerazione un nuovo test in consultazione con le autorità sanitarie pubbliche.

7 Controllo della qualità

Controllo della qualità **73**

Questo capitolo contiene informazioni sulle misure di controllo della qualità dell'analisi.

Controllo della qualità

- I requisiti di controllo della qualità devono essere eseguiti in conformità ai regolamenti locali, statali e federali o ai requisiti di accreditamento e alle procedure standard di controllo della qualità del laboratorio dell'utente.
- Le procedure di controllo della qualità hanno lo scopo di monitorare le prestazioni dei reagenti e delle analisi.
- Testare tutti i controlli positivi prima di analizzare i campioni diagnostici con ogni nuovo lotto di kit per garantire che tutti i reagenti e i componenti del kit funzionino correttamente.
- La buona pratica di laboratorio (cGLP) raccomanda di includere un controllo di estrazione positivo in ogni lotto di isolamento dell'acido nucleico.
- Il Controllo dei Campioni Umani **deve** procedere all'estrazione dell'acido nucleico con ogni lotto di campioni da analizzare.
- Includere **sempre** un controllo senza modello (NTC) e il controllo RNA positivo sintetico di SARS-CoV-2 in ogni ciclo di amplificazione e rilevazione.
- Il set di sonde/primer per il gene RNase P umano (incluso nella miscela di primer/sonde 10 SARS-CoV-2) controlla la qualità dei campioni e l'estrazione.

8 Limiti delle analisi

Limiti 75

Questo capitolo descrive i limiti delle analisi eseguite con Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Limiti

- 1 L'uso di questa analisi è limitato al personale formato sulla procedura. Il mancato rispetto di queste istruzioni può portare a risultati errati.
- 2 Risultati affidabili dipendono da adeguata raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni.
- 3 Evitare la contaminazione aderendo alle buone pratiche di laboratorio e alle procedure specificate in queste istruzioni per l'uso.
- 4 I risultati negativi non escludono l'infezione da SARS-CoV-2 e non dovrebbero essere usati come unica base per decidere il trattamento o prendere altre decisioni sulla gestione.
- 5 Un risultato positivo indica il rilevamento dell'acido nucleico del virus in questione. L'acido nucleico può persistere anche dopo che il virus non è più vitale.
- 6 Le prestazioni dell'analisi Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit sono state stabilite utilizzando campioni di tampone nasofaringeo raccolti in mezzi di trasporto UTM o VCM. I tamponi orofaringei, i tamponi nasali e i tamponi nasali del turbinato medio sono considerati tipi di campioni accettabili per l'uso con l'analisi Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ma le prestazioni con questi tipi di campioni non sono state stabilite. Il test di tamponi orofaringei, tamponi nasali e tamponi nasali del turbinato medio (raccolti autonomamente sotto la supervisione di un operatore sanitario o raccolti da quest'ultimo) è limitato ai pazienti con sintomi di COVID-19.
- 7 Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit non include un campione da utilizzare come Controllo dei Campioni Umani. Il campione utilizzato come controllo deve essere convalidato dal laboratorio.

9 Caratteristiche prestazionali

Caratteristiche prestazionali **77**

Questo capitolo descrive le caratteristiche prestazionali di Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Caratteristiche prestazionali

I seguenti dati dimostrano le caratteristiche prestazionali di Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit. Tutte le estrazioni di campioni hanno utilizzato i volumi di ingresso del campione e i volumi di eluizione raccomandati nella sezione “**Estrazione degli acidi nucleici**” a **pagina 19**.

Sensibilità analitica (limite di rilevamento)

Agilent ha condotto uno studio sul limite di rilevamento (LoD) per stabilire la più bassa concentrazione virale di SARS-CoV-2 (espressa come numero di copie del genoma virale) che può essere rilevata da Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit almeno il 95% delle volte con ciascuna delle procedure di estrazione dell'acido nucleico supportate su ciascuno dei tre sistemi PCR in tempo reale supportati.

I pannelli di campioni per i test LoD sono stati creati diluendo un campione disponibile in commercio di SARS-CoV-2 standard quantificato con un pool di campioni clinici negativi (matrice negativa) per ottenere una serie di concentrazioni target desiderate di SARS-CoV-2. Tutti i campioni clinici erano tamponi nasofaringei precedentemente testati per SARS-CoV-2 dal fornitore utilizzando un test per SARS-CoV-2 con autorizzazione all'uso di emergenza e ulteriormente confermati da Agilent.

L'esperienza preliminare di LoD dell'intera analisi ha utilizzato una gamma di concentrazioni virali con tre replicati per concentrazione. La gamma di concentrazione è stata regolata nell'esperienza preliminare per analizzare concentrazioni da 0,75 a 3 copie/μl. I risultati dell'esperienza preliminare hanno indicato che il LoD finale rientrerebbe probabilmente in questo intervallo e varierebbe in base al metodo di estrazione e del sistema PCR in tempo reale.

L'esperienza finale di conferma del LoD dell'intera analisi è stato condotto su tre livelli di input target: 0,75, 1 e 1,5 copie/μl. Per ciascuno dei tre livelli di input target, sono stati testati 20 singoli replicati di estrazione attraverso tutte le possibili combinazioni di metodo di estrazione/sistema PCR in tempo reale. **Tabella 18** mostra i tassi di rilevamento positivo di tale esperimento. Un tasso di rilevamento di 20/20 indica che tutti i 20 replicati di estrazione erano rilevabili con quella particolare combinazione di metodo di estrazione e sistema PCR in tempo reale.

Tabella 18 Conferma del limite finale di rilevamento: tassi di rilevamento positivo* con ciascun metodo di estrazione dell'acido nucleico su ciascun sistema di PCR in tempo reale (Agilent AriaMx, ABI 7500 e Bio-Rad CFX96)

Livello di ingresso virale SARS-CoV-2 prima dell'estrazione (copie/μl)	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit con QIASymphony (estrazione automatica)			MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit con KingFisher Flex (estrazione automatica)		
	AriaMx	7500	CFX96	AriaMx	7500	CFX96
1,5	19/19 (1)	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
1	1/10 (10)	20/20	17/18 (2)	19/19 (1)	18/19 (1)	18/18 (2)
0,75	3/13 (7)	15/16 (4)	18/18 (2)	15/16 (4)	19/19 (1)	16/16 (4)

* I tassi di rilevamento sono espressi come il numero di replicati positivi sul numero totale di replicati positivi e negativi. I numeri tra parentesi, quando presenti, indicano il numero di replicati inconcludenti. In questi casi, il numero totale di replicati positivi e negativi è inferiore a 20.

Tabella 19 riassume i valori LoD finali per ogni combinazione di metodo di estrazione/sistema PCR in tempo reale. Questi valori rappresentano il numero di copie virali per μl di estratto di acido nucleico che può essere rilevato da Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit almeno il 95% delle volte.

Tabella 19 Riepilogo del limite finale di rilevamento: LoD per ciascun metodo di estrazione dell'acido nucleico su ciascun sistema di PCR in tempo reale (Agilent AriaMx, ABI 7500 e Bio-Rad CFX96)

Metodo di estrazione dell'acido nucleico	Intero limite di rilevamento dell'analisi (copie/ μl)		
	AriaMx	7500	CFX96
QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit con QIASymphony (estrazione automatica)	1,5	1	1,5
MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit con KingFisher Flex (estrazione automatica)	1	1,5	1,5

Inclusività analitica

In Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, le sequenze dei primer e delle sonde oligonucleotidiche per i target virali N1 e N2 e per il gene RNase P umano sono identiche nella sequenza a quelle utilizzate nel pannello diagnostico RT-PCR in tempo reale CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) solo per uso di emergenza. L'inclusività di questo pannello è stata stabilita in precedenza.

Reattività crociata

In Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, le sequenze dei primer e delle sonde oligonucleotidiche per i target virali N1 e N2 e per il gene RNase P umano sono identiche nella sequenza a quelle utilizzate nel pannello diagnostico RT-PCR in tempo reale CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) solo per uso di emergenza. La reattività crociata di questo pannello è stata precedentemente stabilita.

Valutazione clinica

Uno studio di valutazione clinica è stato condotto con Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit utilizzando campioni di tamponi nasofaringei (NP) umani. Per ogni condizione di test, sono stati testati in totale 80 campioni: 40 campioni NP negativi e 40 campioni NP positivi. Lo stato positivo o negativo di ogni campione è stato confermato da un'analisi qRT-PCR per SARS-CoV-2 con autorizzazione all'utilizzo di emergenza (EUA). L'obiettivo della valutazione clinica era quello di valutare l'accordo clinico (positivo/negativo) dei risultati dei test ottenuti con Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit rispetto a quelli ottenuti con l'analisi comparativa EUA qRT-PCR per SARS-CoV-2.

L'estrazione dell'acido nucleico è stata eseguita su ciascun campione utilizzando entrambe le piattaforme di estrazione automatica supportate (QIAGEN QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit con il QIASymphony SP e Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit con KingFisher Flex Purification System) utilizzando il protocollo del produttore e le raccomandazioni fornite in queste istruzioni per l'uso. Ogni campione estratto è stato poi testato su tutti e tre i sistemi PCR in tempo reale supportati (Agilent AriaMx, ABI 7500 e Bio-Rad CFX96), come descritto in queste istruzioni per l'uso. Quindi, ogni campione è stato testato in sei

(6) condizioni diverse durante questo studio. Come criterio di accettazione, è stato richiesto un minimo del 95% di accordo positivo e negativo tra Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit e l'analisi di confronto. I risultati dell'accordo sono riassunti nella **Tabella 20**.

Tabella 20 Percentuale di accordo positivo (PPA), percentuale di accordo negativo (NPA) e accordo complessivo (OA) tra Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit e l'analisi EUA qRT-PCR di confronto per SARS-CoV-2

Piattaforma di estrazione:	QIASymphony	QIASymphony	QIASymphony	KingFisher	KingFisher	KingFisher
Sistema PCR in tempo reale:	AriaMx	7500	CFX96	AriaMx	7500	CFX96
PPA	97,4%	100,0%	100,0%	97,5%	97,5%	97,5%
NPA	100,0%	97,5%	100,0%	97,5%	97,5%	97,5%
OA	98,7%	98,8%	100,0%	97,5%	97,5%	97,5%

10

Riferimenti

Etichette dei prodotti **81**

Questo capitolo contiene copie delle etichette dei prodotti per Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Etichette dei prodotti

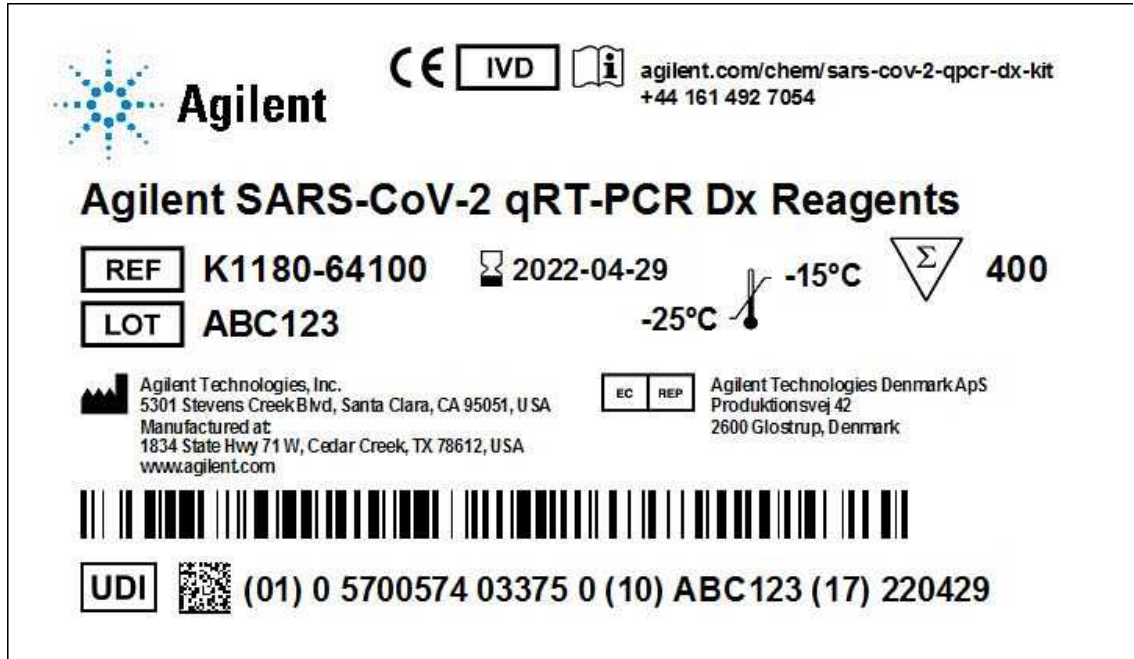


Figura 37 Etichetta della confezione per K1180-64100

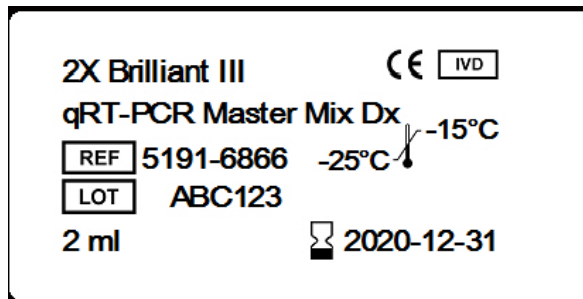


Figura 38 Etichetta del flacone per 5191-6866

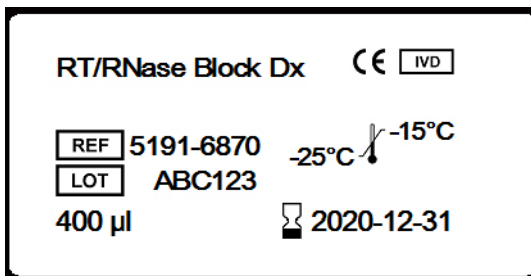


Figura 39 Etichetta della provetta per 5191-6870

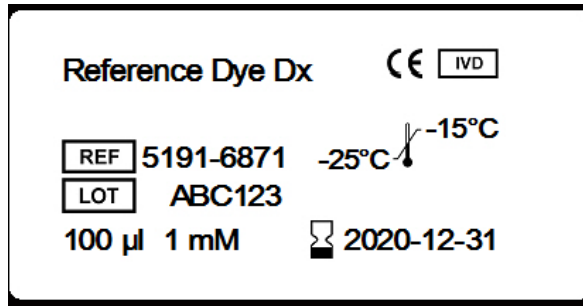


Figura 40 Etichetta della provetta per 5191-6871

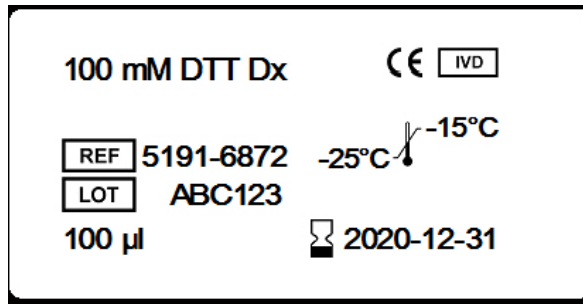


Figura 41 Etichetta della provetta per 5191-6872

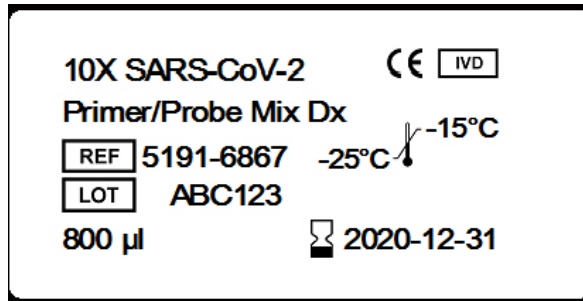


Figura 42 Etichetta della provetta per 5191-6867



Agilent



agilent.com/chem/sars-cov-2-qpcr-dx-kit
+44 161 492 7054

Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx

REF K1180-64200	2022-04-29	-75°C	
LOT ABC123		-85°C	

Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, USA
Manufactured at:
1834 State Hwy 71 W, Cedar Creek, TX 78612, USA
www.agilent.com

EC REP Agilent Technologies Denmark ApS
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, Denmark



UDI (01) 0 5700574 03376 7 (10) ABC123 (17) 220429

Figura 43 Etichetta della confezione per K1180-64200

SARS-Cov-2 Synthetic

Positive RNA Control Dx

REF 5191-6868	-85°C	-75°C
LOT ABC123		
16 µl	2020-12-31	

Figura 44 Etichetta della provetta per 5191-6868

Prodotto da



Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, USA
Prodotto a:
1834 State Hwy 71 W, Cedar Creek, TX 78612, USA
www.agilent.com

Rappresentante autorizzato per l'Unione europea



Agilent Technologies Denmark ApS
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, Denmark

Assistenza tecnica Agilent

Visitare www.agilent.com/en/contact-us/page per trovare i numeri di telefono specifici del Paese

Oppure inviare un'e-mail a covid.support@agilent.com

© Agilent Technologies, Inc. 2021–2022

Nessuna parte di questo manuale può essere riprodotta in qualsiasi forma o con qualsiasi mezzo (compresa la memorizzazione elettronica e il recupero o la traduzione in una lingua straniera) senza previo accordo e consenso scritto da parte di Agilent Technologies, Inc., come disciplinato dalle leggi degli Stati Uniti e internazionali sul copyright.

