



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



Instruções de uso

Para utilização em diagnóstico in vitro
Apenas para exportação. Não à venda nos Estados Unidos.
Revisão B2, Maio de 2022

Tabela de símbolos

	Conformidade europeia		Cuidado
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro		Número do catálogo/código
	Fabricante		Consulte as instruções de uso
	Data de validade		Contém o suficiente para <N> testes
	Código do lote		Não reutilize
	Limite de temperatura		Identificador único do dispositivo
	Representante autorizado na Comunidade Europeia		

Aviso ao comprador: Licença limitada

Este produto é vendido sob acordos de licenciamento entre a Agilent e a Life Technologies Corporation. O valor de compra deste produto inclui direitos limitados e intransferíveis de propriedade da Life Technologies Corporation para uso de apenas esta quantidade do produto em testes *in vitro* de SARS-CoV-2 em humanos, de acordo com as instruções de uso que acompanham este produto. Nenhum outro direito é concedido. Mais informações sobre a compra de licenças sob a patente acima podem ser obtidas entrando em contato com o Departamento de Licenciamento, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. E-mail: outlicensing@lifetech.com.

1 Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit Informações sobre o produto

Uso previsto	6
Descrição do produto	7
Visão geral do produto/princípio do teste	7
Descrição das etapas do teste	7
Materiais de controle a serem usados com o Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit	7
Fluxo de trabalho do ensaio	9

2 Materiais, segurança e manuseio

Materiais fornecidos	11
Reagentes, materiais, equipamentos e software necessários, mas não fornecidos	12
Precauções de segurança	15
Armazenamento e manuseio	17
Embalagem do produto	17
Armazenamento, manuseio e estabilidade dos reagentes	17
Coleta, manuseio e armazenamento de amostras	17

3 Instruções para extração de ácidos nucleicos

Extração de ácidos nucleicos	19
------------------------------	----

4 Instruções para o preparo das reações RT-qPCR

Configure o teste de RT-qPCR no sistema de PCR em tempo real	21
Criar e configurar o teste AriaMx/AriaDx (necessário se ainda não tiver sido criado um modelo)	22
Criar o teste AriaMx/AriaDx a partir do modelo salvo	27
Criar e configurar o teste ABI 7500 Fast (necessário se ainda não tiver sido criado um modelo)	27
Criar o teste ABI 7500 Fast a partir do modelo salvo	33
Criar e configurar o teste de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch (necessário se ainda não tiverem sido criados arquivos de protocolo e de placa salvos)	33
Criar o teste de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch a partir de arquivos de protocolo e de placa salvos	39
Preparo das reações RT-qPCR	41

5 Instruções para a execução da RT-qPCR

Realizar a RT-qPCR no Sistema de PCR em tempo real Agilent AriaMx/AriaDx	46
Execute o programa da RT-qPCR no sistema AriaMx/AriaDx	46
Atribua as configurações de análise de dados para o teste AriaMx/AriaDx	47
Exporte os dados a partir do software Aria	51
Realizar a RT-qPCR no instrumento de PCR em tempo real ABI 7500 Fast	54
Execute o programa da RT-qPCR no instrumento de PCR em tempo real ABI 7500 Fast	54
Atribua as configurações de análise de dados para o teste ABI 7500 Fast	54
Exporte os dados da tabela de poços do software Design & Analysis para um arquivo CSV	58

Realizar a RT-qPCR no sistema de detecção de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch	61
Execute o programa da RT-qPCR no sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch	61
Atribua as configurações de análise de dados para o sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch	61
Exporte os dados a partir do software CFX Maestro	66

6 Análise e resultados

Interpretação de resultados	69
Resultados e interpretação para amostras de controle	69
Resultados e interpretação para amostras clínicas	70

7 Controle de qualidade

Controle de qualidade	73
-----------------------	----

8 Limitações do ensaio

Limitações	75
------------	----

9 Características de desempenho

Características de desempenho	77
Sensibilidade analítica (Limite de detecção)	77
Especificidade analítica	78
Reatividade cruzada	78
Avaliação clínica	78

10 Referência

Rótulos do produto	81
--------------------	----

1

Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit Informações sobre o produto

Uso previsto 6

Descrição do produto 7

Fluxo de trabalho do ensaio 9

Este capítulo contém informações introdutórias sobre o ensaio.

Uso previsto

O Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit é um teste de diagnóstico in vitro de RT-PCR em tempo real destinado para a detecção qualitativa de RNA de SARS-CoV-2 isolado e purificado de amostras de swab nasofaríngeo (NP), nasal e orofaríngeo (OP) obtidos de indivíduos que atendam aos critérios clínicos e/ou epidemiológicos da COVID-19.*

Os resultados são para a identificação do RNA de SARS-CoV-2. O RNA de SARS-CoV-2 geralmente é detectável em amostras do trato respiratório superior durante a fase aguda da infecção. Os resultados positivos são um indicativo da presença de RNA de SARS-CoV-2; é necessária correlação clínica com o histórico do paciente e outras informações de diagnóstico para determinar o status da infecção do paciente. Os resultados positivos não descartam infecções bacterianas ou coinfeções com outros vírus. O agente detectado pode não ser a causa definitiva da doença.

Os resultados negativos não excluem a infecção por SARS-CoV-2 e não devem ser usados como único embasamento para decisões de tratamento do paciente. Os resultados negativos devem ser combinados com outras observações clínicas, histórico do paciente e informações epidemiológicas.

O Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit destina-se ao uso por técnicos de laboratório clínico treinados e qualificados, especificamente instruídos e treinados para operação do sistema Agilent e procedimentos de diagnóstico in vitro.

* O desempenho do ensaio Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit foi estabelecido usando o tipo de amostra de swab nasofaríngeo coletada em meio de transporte UTM ou VCM. Os swabs orofaríngeos, swabs nasais e swabs da concha nasal média são considerados tipos de amostras aceitáveis para uso com o ensaio Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, mas o desempenho com esses tipos de amostras não foi estabelecido. Os testes com swabs orofaríngeos, swabs nasais e swabs da concha nasal média (autocoletados sob a supervisão de, ou coletados por, um profissional de saúde) são limitados a pacientes com sintomas de COVID-19.

Descrição do produto

Visão geral do produto/princípio do teste

O Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit é um teste de transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR) em tempo real. O primer e o(s) conjunto(s) de probe de SARS-CoV-2 foram projetados para detectar RNA de SARS-CoV-2 em amostras de swab nasofaríngeo (NP), nasal e orofaríngeo (OP) de pacientes com suspeita de COVID-19 por seus profissionais de saúde.

Descrição das etapas do teste

Os ácidos nucleicos são isolados e purificados a partir de aproximadamente 140 a 200 µl (dependendo do método de extração) de amostras de swab nasofaríngeo (NP) usando um sistema de extração automatizado (Qiagen QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit com QIAasymphony, ThermoFisher MagMAX Viral/Pathogen II com KingFisher Flex). O ácido nucleico purificado (5 µl) é transcrito de forma reversa no cDNA e posteriormente amplificado em uma reação RT-qPCR de uma etapa usando os reagentes Agilent Brilliant III qRT-PCR em instrumentos compatíveis com PCR em tempo real. No processo, a probe se emparelha com uma sequência alvo específica localizada entre os primers senso e antissenso. Durante a fase de extensão do ciclo da PCR, a atividade da nuclease 5' da *Taq* polimerase degrada a probe, fazendo com que o corante repórter se separe do corante supressor, gerando um sinal fluorescente. Em cada ciclo, moléculas de corante repórter adicionais são clivadas de suas respectivas sondas, aumentando a intensidade da fluorescência. A intensidade da fluorescência é monitorada em cada ciclo da PCR por instrumentos compatíveis com PCR em tempo real (Agilent AriaMx/AriaDx, ABI 7500 Fast ou Bio-Rad CFX96).

Materiais de controle a serem usados com o Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

- Um controle “sem molde” (negativo) é necessário para verificar contaminações no processo do ensaio que possam levar a resultados falsos positivos e devem ser usados ao menos uma vez por placa de PCR. O usuário adiciona água no local do RNA extraído para ser usado como um controle negativo sem molde.
- Um controle de molde positivo é necessário para garantir que o mecanismo para detectar o RNA alvo do SARS-CoV-2 não esteja comprometido e deve ser usado ao menos uma vez por placa de PCR (50 cópias/reação). O controle positivo no kit é um RNA sintético correspondente às sequências virais alvo.
- Um controle de extração (controle de amostra de humanos ou HSC) é necessário para garantir que o RNA na amostra original seja bem conservado durante a extração e deve ser usado ao menos uma vez por lote de extração.

- Um controle interno (gene da RNase P humana) é necessário para garantir que o RNA da amostra original seja detectável na reação RT-qPCR. Espera-se que seja detectado no HSC, bem como na maioria das amostras de humanos com RNA celular suficiente. Em amostras de humanos, o controle interno pode não ser detectado se o RNA viral do SARS-CoV-2 estiver presente em altas concentrações.

Controles fornecidos com o kit

Tabela 1 Controle fornecido com o Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

Tipo de controle	Nome do controle	Nome do fornecedor	N/p do fornecedor
Positivo	Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx	Agilent	K1180-64200

Controles necessários, mas não fornecidos com o kit

- Água livre de nucleases, grau molecular, para ser usada como controle “sem molde” (negativo)
- Controle de extração: várias opções estão disponíveis para o cliente com base nas recomendações do CDC
 - Controle de amostra de humanos, fabricado pelo CDC, KT0189
 - Material de amostra de humanos negativo: Os laboratórios podem preparar um volume de material de amostra de humanos (por exemplo, soros humanos ou restante de amostras respiratórias negativas em pool) para extrair e correr juntamente com amostras clínicas como um controle de extração. Este material deve ser preparado em volume suficiente para ser usado em várias corridas. O material deve ser testado antes de ser usado como controle de extração para garantir que gere os resultados esperados para o HSC listado nessas instruções de uso.
 - Material de amostra de humanos artificial: Os laboratórios podem preparar materiais de amostras artificiais de humanos suspendendo qualquer linhagem celular humana (por exemplo, A549, Hela ou 293) em PBS. Este material deve ser preparado em volume suficiente para ser usado em várias corridas. O material deve ser testado antes de ser usado como controle de extração para garantir que gere os resultados esperados para o HSC listado nessas instruções de uso.

Fluxo de trabalho do ensaio

Para começar o ensaio, extraia o ácido nucleico das amostras de teste nasofaríngeo juntamente com um controle de amostra de humanos adequado.

Em seguida, corra um teste de RT-qPCR multiplex usando as amostras de RNA extraídas e o controle de RNA positivo fornecido. Inclua um Controle negativo sem molde (NTC).

Após concluir a corrida da RT-qPCR, analise os dados para amplificação dos alvos virais N1 e N2 e o alvo do gene da RNase P humana.

Por fim, reporte os resultados para as amostras do teste.

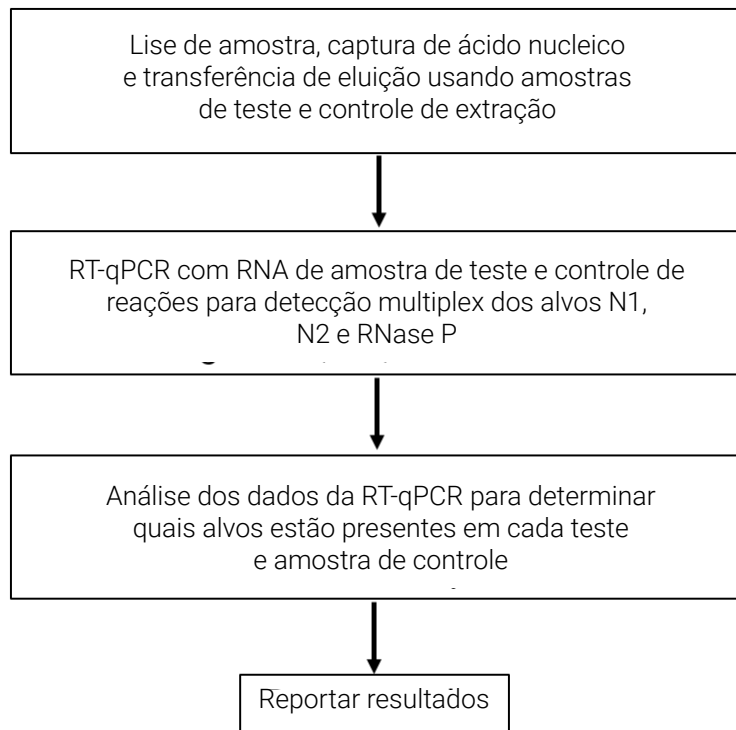


Figura 1 Fluxo de trabalho do ensaio de SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx

2 Materiais, segurança e manuseio

Materiais fornecidos	11
Reagentes, materiais, equipamentos e software necessários, mas não fornecidos	12
Precauções de segurança	15
Armazenamento e manuseio	17

Este capítulo descreve os reagentes e outros materiais utilizados no ensaio e fornece informações para realizar o ensaio com segurança.

Materiais fornecidos

A **Tabela 2** lista os materiais fornecidos com o Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit e seus requisitos de temperatura. Consulte **“Armazenamento e manuseio”** na página 17 para obter instruções adicionais sobre o armazenamento dos materiais.

Tabela 2 Materiais fornecidos com o Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, n/p K1180A

Materiais	Quantidade	Componentes	Temperatura de armazenamento
Reagentes do Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx, n/p K1180-64100*	Suficiente para 400 reações RT-qPCR (amostras de teste e controles) <i>Observe que cada placa de reação RT-qPCR deve incluir pelo menos 3 poços para reações de controle.</i>	2 x Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	Armazene a –20°C após o recebimento.
		RT/RNase Block Dx	Armazene a –20°C após o recebimento.
		Reference Dye Dx [†]	Armazene a –20°C após o recebimento.
		100 mM DTT Dx	Armazene a –20°C após o recebimento.
		10 x SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx [†]	Armazene a –20°C após o recebimento.
Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx, n/p K1180-64200 [‡]	Suficiente para 8 testes do ensaio	SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Armazene a –80°C após o recebimento.

* O kit de reagentes do SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx também é vendido separadamente como n/p K1180B da Agilent.

[†] Este reagente é sensível à luz e deve ser mantido distante da luz, sempre que possível.

[‡] O SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx também é vendido separadamente como n/p K1180C da Agilent.

Reagentes, materiais, equipamentos e software necessários, mas não fornecidos

A **Tabela 3** lista as opções para a etapa de extração de RNA do protocolo, que é realizada em um instrumento para automação. O procedimento de extração de RNA é descrito em “**Instruções para extração de ácidos nucleicos**” na página 18.

Tabela 3 Opções de extração de RNA – necessárias, mas não fornecidas

Kit de extração de RNA	Instrumento
QIAGEN QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, n/p 937055	QIAGEN QIAAsymphony SP, n/p 9001297 (automação)
Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, Thermo Fisher n/p A48383	Thermo Fisher Scientific KingFisher Flex Purification System, n/p 5400630 (automação)

A **Tabela 4** lista as opções para o Controle de amostra de humanos. Esta amostra de controle é uma preparação de cultura celular humana usada como controle do procedimento de extração para demonstrar a recuperação bem-sucedida do ácido nucleico, bem como a integridade do reagente de extração.

Tabela 4 Opções de Controle de amostra de humanos – necessário, mas não fornecido

Controle de amostra de humanos	Descrição
Controle de amostra de humanos (HSC), 10 frascos × 500 µl, CDC n/p KT0189	Fabricado e vendido pelo CDC. O CDC HSC consiste em material de células humanas cultivadas, não infecciosas (tratadas com beta-propiolactona), fornecido como um líquido suspenso em PBS 0,01 M com pH 7,2 a 7,4.
Material de amostra de humanos negativo	Preparado pelo laboratório. Este tipo de Controle de amostra de humanos é um volume de material de amostra de humanos (por exemplo, soros humanos ou restante de amostras respiratórias negativas em pool) para extrair e executar juntamente com amostras clínicas como um controle de extração. Este material deve ser preparado em volume suficiente para ser usado em várias corridas. O material deve ser testado antes de ser usado como controle de extração para garantir que gere os resultados esperados para o HSC listado nessas instruções de uso.
Material de amostra de humanos artificial	Preparado pelo laboratório. Este tipo de Controle de amostra de humanos é composto por materiais de amostra de humanos artificiais, preparados pela suspensão de qualquer linhagem celular humana (por exemplo, A549, Hela ou 293) em PBS. Este material deve ser preparado em volume suficiente para ser usado em várias corridas. O material deve ser testado antes de ser usado como controle de extração para garantir que gere os resultados esperados para o Controle de amostra de humanos listado nessas instruções de uso.

A **Tabela 5** a **Tabela 6** listam reagentes, materiais, equipamentos e instrumentos adicionais que são necessários, mas não fornecidos com o Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Tabela 5 Reagentes e materiais necessários, mas não fornecidos

Reagente ou material	Forma
Água de grau molecular, livre de nucleases	Reagente
Solução de alvejante a 10% (diluição de 1:10 de alvejante de hipoclorito a 5,25 a 6%)	Material
DNAZap, Ambion n/p AM9890 ou agente de descontaminação equivalente	Material
RNase AWAY, Fisher Scientific n/p 21-236-21 ou agente de descontaminação equivalente	Material
Luvas sem pó e aventais cirúrgicos descartáveis	Material
Ponteiras de pipetas estéreis com barreira de aerossol livre de nucleases	Material
Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, livre de nucleases	Material
Tubos de microcentrífuga de 2 ml, livre de nucleases	Material
Placas de 96 poços, livre de nucleases, 200 µl <i>Use placas que sejam compatíveis com o sistema de PCR em tempo real selecionado</i>	Material
Tiras de 8 x tubos, livre de nucleases	Material
Fitas autolocantes para placas, livre de nucleases, ou 8 x tiras de tampa óptica livre de nucleases para placas de PCR de 96 poços <i>Use placas ou tiras que sejam compatíveis com o sistema de PCR em tempo real selecionado</i>	Material
MicroAmp Optical Film Compression Pads, Thermo Fisher Scientific, n/p 4312639*	Material

* Os blocos de compressão são necessários apenas ao usar fitas autocolantes para selar placas para o sistema de PCR em tempo real AriaMx/AriaDx

Tabela 6 Instrumentos, software e equipamentos necessários, mas não fornecidos

Instrumento, software ou equipamento	Forma
Sistema de PCR em tempo real <ul style="list-style-type: none"> Sistema de PCR em tempo real da Agilent AriaMx (n/p G8830A) ou sistema de PCR em tempo real AriaDx (n/p K8930AA) Software: Software Aria versão 1.71 OU 1.8 e software de rastreamento eletrônico (incluído com n/p K8930AA ou disponível separadamente como n/p G5380AA) Instrumento para PCR em tempo real ABI 7500 Fast com computador laptop (n/p 4351106) ou computador desktop (n/p 4351107) Software: Software 7500 versão 2.3 e Software Design & Analysis versão 2.4.3 Sistema de detecção de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch (n/p 1855195) ou Sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch com pacote inicial (n/p 1855196) Software: Software CFX Maestro 2.0 versão 4.1.2 (incluído com n/p 1855196 ou disponível separadamente como n/p 12004110) 	Instrumento com computador e software
Software para visualizar dados exportados pelo software de PCR em tempo real, por exemplo, Microsoft Excel	Software

Tabela 6 Instrumentos, software e equipamentos necessários, mas não fornecidos (continued)

Instrumento, software ou equipamento	Forma
Agitador vortex	Equipamento
Microcentrífuga	Equipamento
Centrífuga de placas para placas de 96 poços	Equipamento
Micropipetas P10, P20, P200 e P1000	Equipamento
Pipetas multicanal (5 a 50 µl)	Equipamento
Suportes para tubos de microcentrífuga	Equipamento
Dois (2) racks térmicos para 96 poços	Equipamento
Balde de gelo	Equipamento

Precauções de segurança

- 1 O fluxo de trabalho do Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit deve ser executado por uma equipe treinada e qualificada para evitar o risco de resultados errôneos. Use áreas separadas para a preparação das amostras do paciente e dos controles para evitar resultados falso-positivos.
- 2 Este teste foi autorizado apenas para a detecção de ácido nucleico do SARS-CoV-2, não para qualquer outro vírus ou patógeno.
- 3 Leia atentamente todas as instruções de uso.
- 4 As amostras e controles devem sempre ser tratados como infecciosos e/ou de risco biológico, de acordo com os procedimentos laboratoriais de segurança. Consulte as Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with 2019-nCoV (Diretrizes provisórias de biossegurança de laboratório para manuseio e processamento de amostras associadas ao 2019-nCoV).
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>
- 5 Tome as precauções necessárias ao manusear as amostras. Use equipamentos de proteção individual (EPI) compatíveis com as diretrizes atuais para o manuseio de amostras potencialmente infecciosas. Se ocorrer um derramamento, desinfete imediatamente.
- 6 As amostras podem ser infecciosas. Tome precauções universais ao executar este ensaio. Métodos adequados de manuseio e descarte devem ser estabelecidos pelo diretor do laboratório. Apenas técnicos devidamente treinados para o manuseio de materiais infecciosos devem estar autorizados a executar este procedimento diagnóstico.
- 7 Se houver suspeita de infecção pelo 2019-nCoV com base nos critérios de triagem clínica atuais recomendados pelas autoridades de saúde pública, as amostras devem ser coletadas com as devidas precauções de controle de infecção.
- 8 Use apenas vestuário de laboratório descartável fornecido ou especificado.
- 9 Sempre use ponteiros de pipetas com barreiras de aerossol. As ponteiros usadas devem ser estéreis e livres de DNases e RNases.
- 10 Ensaio baseado em PCR são sensíveis à introdução acidental de produtos de amplificação de reações PCR anteriores. Qualquer contaminação das amostras de teste ou reagentes pode resultar em um resultado incorreto. O fluxo de trabalho no laboratório deve prosseguir de maneira unidirecional. Use as seguintes práticas recomendadas para evitar a contaminação das amostras pelo produto de PCR ao longo do fluxo de trabalho:
 - Designe estações de trabalho pré-PCR e pós-PCR separadas e use suprimentos e reagentes exclusivos em cada área. Em particular, nunca use materiais designados para o trabalho pós-PCR para segmentos pré-PCR do fluxo de trabalho. Sempre use pipetas pré-PCR exclusivas com ponteiros resistentes ao aerossol, livre de nucleases, para pipetar soluções pré-PCR exclusivas.
 - Mantenha as áreas de trabalho limpas. Limpe as superfícies pré-PCR diariamente e entre cada ensaio usando uma solução de alvejante a 10% e/ou um produto, como DNAZap ou RNase AWAY. Remova o alvejante residual com álcool 70%.
 - Use um jaleco limpo e luvas limpas e sem pó. Tenha uma boa higiene laboratorial, incluindo a troca de luvas após o contato com quaisquer superfícies potencialmente contaminadas.
 - Troque as ponteiros de pipetas com barreira de aerossol entre todas as transferências manuais de líquidos.

- Ao extrair ácido nucleico de amostras, use uma técnica asséptica adequada para minimizar o risco de contaminação cruzada entre as amostras e evitar a introdução inadvertida de nucleases nas amostras.
 - Sempre que possível, mantenha o reagente e os tubos de reação tampados ou cobertos.
- 11** Não coma, beba, fume ou aplique produtos cosméticos nas áreas de trabalho.
 - 12** Não são permitidas modificações nos reagentes de ensaio, protocolo de ensaio ou instrumentação.
 - 13** Os reagentes devem ser armazenados e manuseados como especificado na **Tabela 2** na página 11 e em **“Armazenamento e manuseio”** na página 17.
 - 14** Não utilize o kit após a data de vencimento indicada.
 - 15** Descarte os resíduos em conformidade com os regulamentos municipais, estaduais e federais.
 - 16** As fichas de dados de segurança estão disponíveis em www.agilent.com.
 - 17** Não use material que possa conter tiocianato de guanidina ou qualquer material que contenha guanidina no instrumento de PCR em tempo real. Compostos altamente reativos e/ou tóxicos podem ser formados se combinados com hipoclorito de sódio (alvejante).
 - 18** Os resultados positivos são indicativos da presença de RNA do SARS-CoV-2.

Armazenamento e manuseio

Embalagem do produto

Após o recebimento do Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, inspecione a caixa do produto com cuidado em busca de sinais visíveis de danos. Se for detectado dano na caixa do produto, entre em contato com o suporte técnico da Agilent.

Armazenamento, manuseio e estabilidade dos reagentes

- Sempre verifique a data de vencimento antes de usar. Não use reagentes vencidos.
- Proteja as sondas fluorogênicas contra luz.
- Os primers, as sondas (incluindo as alíquotas) e a mistura principal de enzimas devem ser descongelados e mantidos no gelo ou em um rack térmico o tempo todo durante a preparação e o uso.
- Os controles devem ser descongelados e mantidos no gelo ou em um rack térmico o tempo todo durante a preparação e o uso.
- Consulte a **Tabela 2** na página 11 para obter as temperaturas de armazenamento dos reagentes do Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Coleta, manuseio e armazenamento de amostras

A coleta, armazenamento e transporte inadequados ou impróprios das amostras provavelmente produzirão resultados de teste falsos. É altamente recomendado um treinamento de coleta de amostras devido à importância da qualidade das amostras. A CLSI MM13-A pode ser consultada como um recurso adequado.

- Coleta da amostra
 - Consulte as Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Patients Under Investigation (PUIs) for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) (Diretrizes provisórias para coleta, manuseio e teste de amostras clínicas de pacientes sob investigação [PUIs] para o novo Coronavírus 2019 [2019-nCoV]) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
 - Siga as instruções do fabricante do dispositivo de coleta de amostras para métodos de coleta adequados.
- Transporte das amostras
 - Material clínico coletado de paciente colocado em sistema de transporte adequado. Para o Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, isso inclui amostras de NP em meio de transporte viral (VTM), meio de transporte universal (UTM), solução salina, Amies líquido ou meio de transporte de amostra (STM).

3 Instruções para extração de ácidos nucleicos

Extração de ácidos nucleicos 19

Este capítulo contém instruções para extração de RNA de amostras de testes clínicos e do Controle de amostra de humanos.

Extração de ácidos nucleicos

O desempenho do Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit depende da quantidade e da qualidade do molde de RNA purificado a partir de amostras de humanos. Os seguintes kits e procedimentos de extração de RNA disponíveis comercialmente foram qualificados e validados para recuperação e purificação do RNA para uso com o kit.

Devem ser seguidos os procedimentos recomendados pelo fabricante (exceto como indicado nas recomendações abaixo) para a extração de amostras. O Controle de amostra de humanos deve ser incluído em cada lote de extração.

QIAGEN QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, protocolo automatizado

Recomendação: Utilize 140 µl de amostra e dilua com 60 µl de tampão.

MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, protocolo automatizado

Recomendação: Utilize 200 µl de amostra e dilua com 50 µl de tampão.

4 Instruções para o preparo das reações RT-qPCR

Configure o teste de RT-qPCR no sistema de PCR em tempo real **21**

Preparo das reações RT-qPCR **41**

Este capítulo contém instruções para o preparo das reações de PCR de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) para amostras de teste e amostras de controle.

Configure o teste de RT-qPCR no sistema de PCR em tempo real

Antes de configurar a placa de reação RT-qPCR, configure o teste no sistema de PCR em tempo real para que o instrumento esteja pronto para executar assim que a placa de reação estiver preparada.

Siga as instruções para o seu sistema específico de PCR em tempo real.

Sistema de PCR em tempo real Agilent AriaMx/AriaDx

- Consulte **“Criar e configurar o teste AriaMx/AriaDx (necessário se ainda não tiver sido criado um modelo)”** na página 22 se você não tiver um arquivo modelo com as configurações necessárias.
- Se você tem um arquivo modelo para usar, consulte **“Criar o teste AriaMx/AriaDx a partir do modelo salvo”** na página 27.

NOTA

Ligue o instrumento AriaMx ou AriaDx pelo menos 3 horas antes do uso. O instrumento pode ser deixado sempre ligado para garantir que esteja sempre preparado para o uso.

De acordo com as especificações do instrumento, as condições de operação são 20 a 30°C, 20 a 80% de umidade e ≤ 2.000 metros de elevação.

Instrumento de PCR em tempo real ABI 7500 Fast

- Consulte **“Criar e configurar o teste ABI 7500 Fast (necessário se ainda não tiver sido criado um modelo)”** na página 27 se você não tiver um arquivo modelo com as configurações necessárias.
- Se você tem um arquivo modelo para usar, consulte **“Criar o teste ABI 7500 Fast a partir do modelo salvo”** na página 33.

Sistema de detecção de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch

- Consulte **“Criar e configurar o teste de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch (necessário se ainda não tiverem sido criados arquivos de protocolo e de placa salvos)”** na página 33 se você não tiver arquivos de protocolo e da placa salvos com as configurações necessárias.
- Se você tem arquivos de protocolo e da placa salvos, consulte **“Criar o teste de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch a partir de arquivos de protocolo e de placa salvos”** na página 39.

Criar e configurar o teste AriaMx/AriaDx (necessário se ainda não tiver sido criado um modelo)

Se já existe um modelo para o teste, vá para “**Criar o teste AriaMx/AriaDx a partir do modelo salvo**” na página 27.

Etapa 1. Crie o teste

- 1 No PC conectado ao instrumento, abra o aplicativo do software Aria na tela Getting Started.
- 2 Em **New Experiment**, clique em **Experiment Types** (se ainda não estiver selecionado).
- 3 No centro da tela, selecione **Quantitative PCR, Fluorescence Probe**, como mostrado na **Figura 2**.

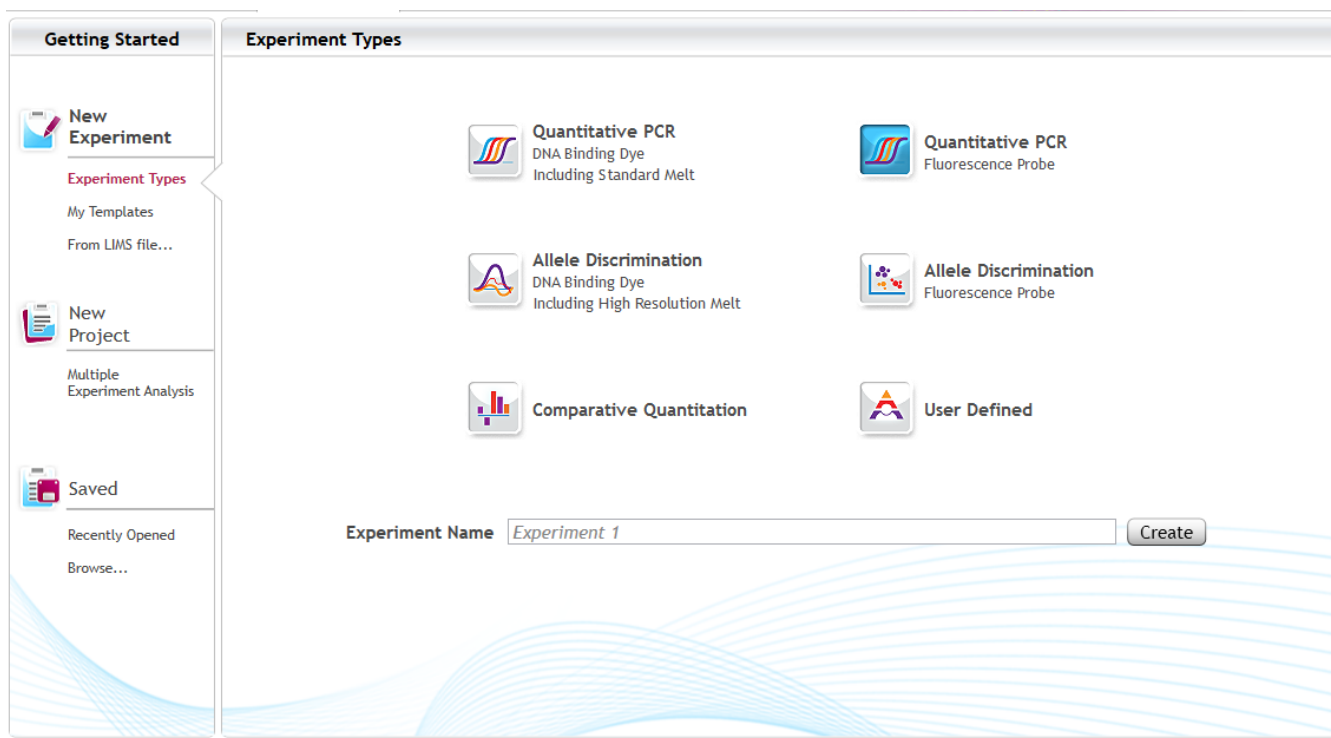


Figura 2 Tela Getting Started do Aria — **Quantitative PCR, Fluorescence Probe** selecionada

- 4 Digite um nome para o teste no campo Experiment Name e clique em **Create**.

O novo teste se abre na tela de configuração da placa. Todos os poços no mapa da placa são selecionados por padrão.

A seleção de todos os 96 poços é adequada se todos os poços da placa incluírem uma reação RT-qPCR. Se algum dos poços da placa estiver vazio, desmarque esses poços nesta etapa.

Etapa 2. Atribua os tipos e nomes dos poços

- 5 No painel Properties no lado direito da tela, expanda a lista suspensa **Well type** e selecione **Unknown**.

Todos os poços estão marcados como Unknown no mapa da placa.

- 6 Atribua o poço A12 como o Controle negativo sem molde (NTC).
 - a Clique no poço A12 no mapa da placa para selecionar esse poço específico.
 - b No painel Properties no lado direito da tela, expanda a lista suspensa **Well type** e selecione **NTC**.
 O poço A12 é marcado como NTC no mapa da placa, enquanto todos os outros poços permanecem designados como tipo de poço Unknown.
- 7 No mapa da placa, selecione novamente todos os poços.

Clicar na caixa de seleção no canto superior esquerdo do mapa da placa, seleciona todos os poços.

A configuração da placa aparece agora como mostrado na **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 Atribuições de tipo de poço na tela de configuração da placa do Aria

- 8 Atribua nomes de poços aos poços de controle e, se desejado, aos poços utilizados para as amostras de teste. Os nomes dos poços a serem atribuídos aos poços de controle são mostrados na **Tabela 7**. Você pode atribuir nomes de poços manualmente ou importando uma planilha Excel ou um arquivo de texto delimitado por vírgulas que lista as identificações dos poços ao lado dos nomes dos poços a serem atribuídos.
 - Para atribuir nomes de poços manualmente, altere a configuração da exibição de **Type** para **Name**. Selecione o(s) poço(s) na placa, depois digite o nome do(s) poço(s) selecionado(s) no campo Well Name.

- Para atribuir nomes de poços de um arquivo Excel ou de texto, clique com o botão direito do mouse no mapa da placa e selecione **Import Well Name**. Na caixa de diálogo que se abre, selecione o arquivo Excel ou de texto. Consulte o sistema de ajuda do Aria para obter os requisitos de formatação de arquivos.

Tabela 7 Atribuição de nomes de poços para poços de controle

Identificação do poço	Nome do poço
A12	NTC
B12	HSC*
H12	Pos

* Se você tiver mais de uma amostra de Controle de amostra de humanos que precisa ser incluída na placa, utilize os poços adicionais na coluna 12 para essas reações e nomeie os poços de acordo (por exemplo, HSC1, HSC2, etc.).

Etapa 3. Atribua os corantes e alvos

- 9 No painel Properties, em **Add Dyes**, marque as caixas de seleção para FAM, HEX e Cy5.

Os pontos codificados por cores para cada um dos corantes marcados aparecem em todos os poços do mapa da placa.

- 10 Na lista suspensa Reference Dye, selecione **ROX**.

Um ponto codificado por cor identificado como "R" aparece em todos os poços do mapa da placa.

- 11 Clique na ponta de seta ► ao lado de **Targets**.

- 12 Nos campos Target Name que aparecem, digite nomes de alvos de acordo com a **Figura 4**.

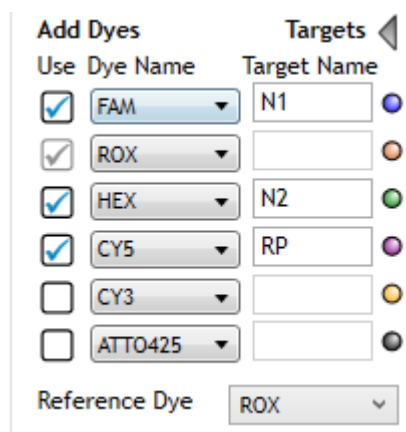


Figura 4 Atribuições de corantes e alvos na tela de configuração da placa do Aria

Etapa 4. Configure o perfil térmico

- 13 No lado esquerdo da tela, em **Set Up**, clique em **Thermal Profile**.

A tela de perfil térmico se abre exibindo o perfil térmico padrão.

14 Adicione um segmento de RT ao início do programa do ciclo.

- a Na tela, passe o cursor sobre o segmento Hot Start. Clique no ícone + (como mostrado na **Figura 5**) que aparece no lado esquerdo do segmento Hot Start.

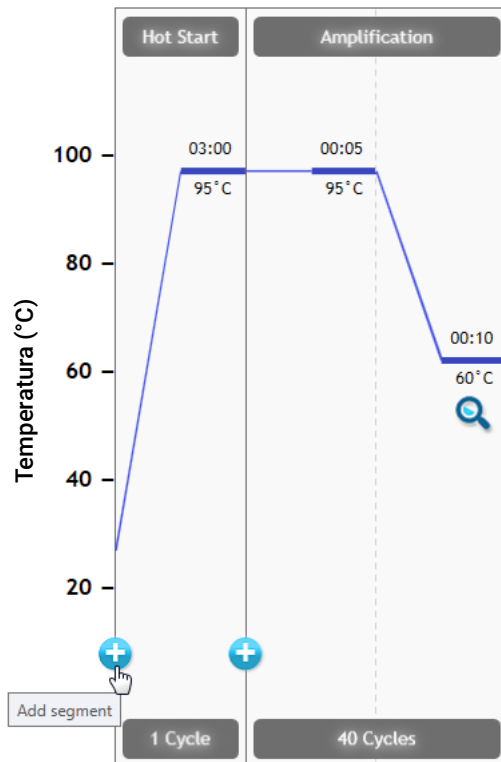


Figura 5 Adição de um novo segmento na tela de perfil térmico do Aria

O programa abre um espaço reservado para o novo segmento listando os tipos de segmento disponíveis.

- b No segmento do espaço reservado, clique em **RT**.

O perfil térmico aparece agora como mostrado na **Figura 6**.

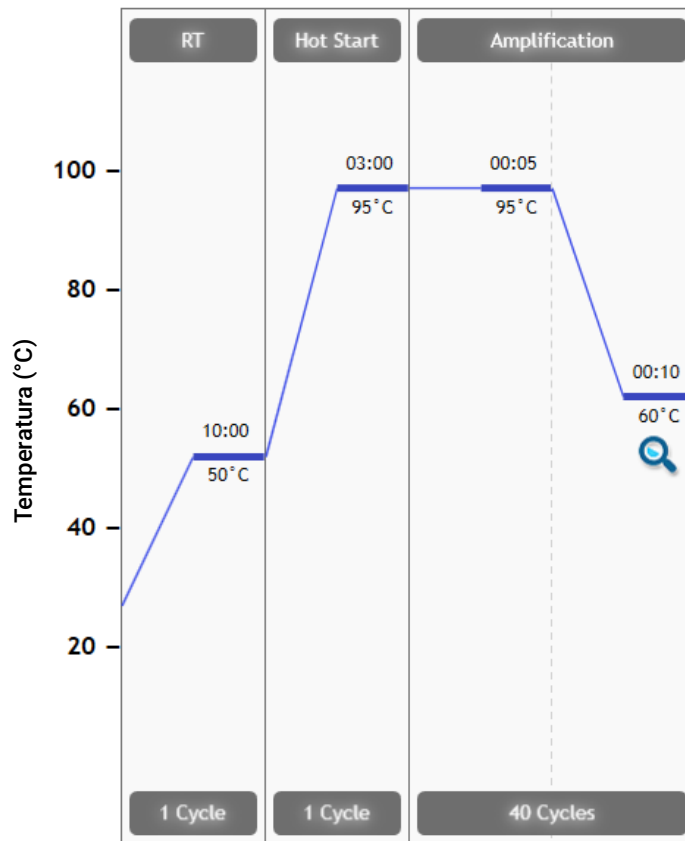


Figura 6 Perfil térmico na tela de perfil térmico do Aria

15 Certifique-se de que o perfil térmico na sua tela corresponde ao programa do ciclo térmico mostrado na **Tabela 8**.

Tabela 8 Programa do ciclo térmico para o sistema de PCR em tempo real AriaMx/AriaDx

Número do segmento	Número de ciclos	Duração	Temperatura
1	1	10 minutos	50°C
2	1	3 minutos	95°C
3	40	5 segundos	95°C
		10 segundos	60°C

Etapa 5. Salve o teste como um modelo

16 Clique em **File > Save As Template**.

A caixa de diálogo Save As se abre. O tipo de arquivo é definido como **AriaMx Template Files** (arquivo de extensão *amxt*) ou **AriaDx Template Files** (arquivo de extensão *adxt*).

17 Selecione uma pasta para o novo modelo.

18 No campo File name, digite **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**.

19 Clique em **Save**.

A caixa de diálogo se fecha e o programa salva o novo arquivo modelo na pasta designada.

Para futuros ensaios, utilize o modelo salvo para criar e configurar o teste de RT-qPCR, conforme descrito em "**Criar o teste AriaMx/AriaDx a partir do modelo salvo**".

Neste ponto, prossiga diretamente para "**Preparo das reações RT-qPCR**" na página 41.

Criar o teste AriaMx/AriaDx a partir do modelo salvo

Se não tiver sido criado um modelo do teste com a configuração da placa e o perfil térmico necessários, consulte "**Criar e configurar o teste AriaMx/AriaDx (necessário se ainda não tiver sido criado um modelo)**" na página 22.

- 1 No PC conectado ao instrumento, abra o aplicativo do software Aria na tela Getting Started.
- 2 Em **New Experiment**, clique em **My Templates**.
- 3 No campo Experiment Name, insira um nome para o novo teste.
- 4 Selecione o modelo **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** e crie o teste.
 - Se o modelo estiver na pasta padrão, clique diretamente no modelo para selecioná-lo e depois clique em **Create** (ou clique duas vezes diretamente no modelo). O programa cria o novo teste e abre o teste na tela de configuração da placa.
 - Se o modelo não estiver na pasta selecionada atualmente, clique no ícone **Procurar por modelo** (mostrado abaixo) para abrir a janela do navegador. Navegue até à pasta que contém o arquivo modelo **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**. Selecione o arquivo e clique em **Open**. O programa cria o novo teste e abre o teste na tela de configuração da placa.



Neste ponto, prossiga diretamente para "**Preparo das reações RT-qPCR**" na página 41.

Criar e configurar o teste ABI 7500 Fast (necessário se ainda não tiver sido criado um modelo)

Se já existe um modelo para o teste, vá para "**Criar o teste ABI 7500 Fast a partir do modelo salvo**" na página 33.

Etapa 1. Crie o teste

- 1 Ligue o instrumento ABI 7500 Fast.
- 2 No PC conectado ao instrumento, abra o aplicativo do software do sistema 7500.
- 3 Na tela Inicial, em **Set Up**, clique em **Advanced Setup**.

A tela Experiment se abre.
- 4 No **Experiment Menu**, no lado esquerdo da tela, em **Setup**, clique em **Experiment Properties** (se ainda não estiver selecionado).

As configurações das propriedades do teste são exibidas no centro da tela.
- 5 Responda as perguntas na tela usando as seleções e entradas mostradas na **Tabela 9**.

Tabela 9 Configurações de propriedades do teste

Pergunta	Seleções/entradas
How do you want to identify this experiment? (Como você deseja identificar este teste?)	<ul style="list-style-type: none"> Experiment Name: Digite um nome único para o teste Barcode: Deixe em branco User Name: Digite seu nome Comments: Digite os comentários desejados ou deixe em branco
Which instrument are you using to run the experiment? (Qual instrumento você está usando para correr o teste?)	7500 Fast (96 poços)
What type of experiment do you want to set up? (Qual tipo de teste você deseja configurar?)	Quantitation – Standard Curve
Which reagents do you want to use to detect the target sequence? (Quais reagentes deseja utilizar para detectar a sequência alvo?)	Reagentes TaqMan®
Which ramp speed do you want to use in the instrument run? (Qual velocidade de rampa deseja utilizar na corrida do instrumento?)	Fast

Etapa 2. Defina os alvos e as amostras

- No **Experiment Menu**, no lado esquerdo da tela, em **Setup**, clique em **Plate Setup**. Certifique-se de que a aba **Define Targets and Samples** está selecionada na parte superior.
As ferramentas para definição de alvos e amostras são exibidas no centro da tela.
- Na tabela Define Targets, crie alvos para N1, N2 e RP como mostrado na **Figura 7**. Clique em **Add New Target** para adicionar uma linha à tabela, conforme necessário.
Para seleção do **Quencher**, selecione **NFQ-MGB** para todos os alvos. Para seleção de **Color**, use a cor padrão ou selecione a cor desejada.

Target Name	Reporter	Quencher	Color
N1	FAM	NFQ-MGB	Blue
N2	VIC	NFQ-MGB	Green
RP	CY5	NFQ-MGB	Pink

Figura 7 Definições de alvos na tela de configuração da placa do software 7500

- Na tabela Define Samples, crie nomes de amostras como mostrado na **Figura 8**. Clique em **Add New Sample** para adicionar uma linha à tabela, conforme necessário.
As três amostras são o Controle de amostra de humanos (**HSC**), o Controle negativo sem molde (**NTC**) e o Controle positivo (**Pos**) com controle positivo de RNA de SARS-CoV-2 sintético. Observe que as amostras de teste não recebem um nome de amostra.

Para seleção de **Color**, use a cor padrão ou selecione a cor desejada.

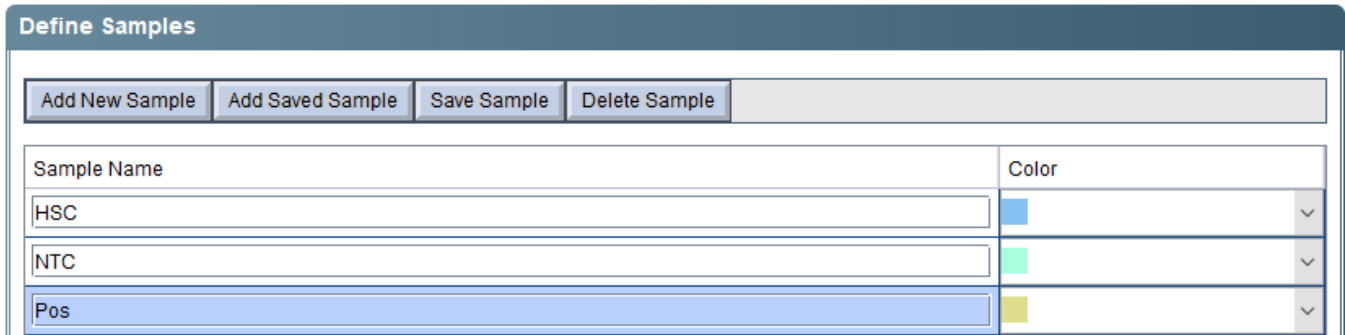


Figura 8 Definições de amostras na tela de configuração da placa do software 7500

Etapa 3. Atribua alvos e tarefas

- 9 Na parte superior da tela, clique na aba **Assign Targets and Samples**. Certifique-se de que a aba **View Plate Layout** está selecionada.

A tela exibe um mapa da placa de 96 poços.

- 10 No mapa da placa, selecione todos os 96 poços.

Os poços selecionados são destacados em azul com uma oval branca no centro.

A seleção de todos os 96 poços é adequada se todos os poços da placa incluírem uma reação RT-qPCR. Se algum dos poços da placa estiver vazio, não selecione esses poços nesta etapa.

- 11 Na tabela em **Assign target(s) to the selected well**, marque as três caixas de seleção na coluna Assign para indicar que os três alvos serão monitorados e reportados em todos os poços. Na coluna Task, certifique-se de que "U" está selecionado para os três alvos. Consulte a **Figura 9**.

O mapa da placa exibe um símbolo para cada alvo em todos os 96 poços.

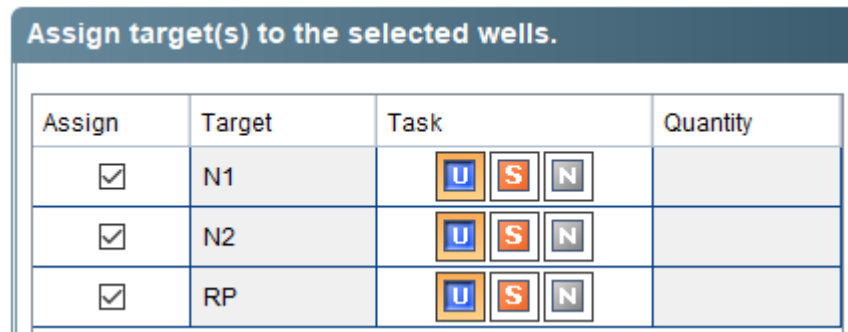


Figura 9 Atribuições de alvos na aba View Plate Layout do software 7500

- 12 Altere a tarefa atribuída para o poço do Controle negativo sem molde.

a No mapa da placa, selecione o poço A12.

b Na tabela em **Assign target(s) to the selected wells**, altere a seleção na coluna Task para "N" para os três alvos. Certifique-se de que as caixas de seleção na coluna Assign permanecem marcadas.

O mapa da placa aparece agora como exibido na **Figura 10**.

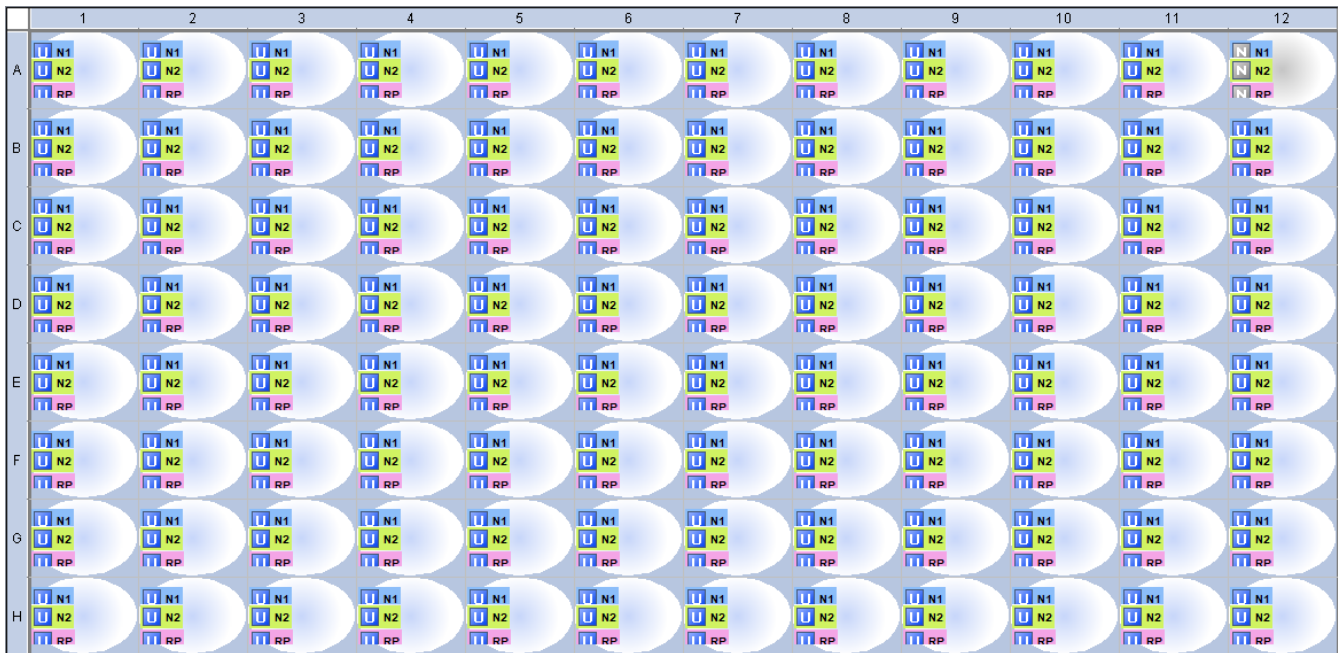


Figura 10 Mapa da placa na tela de configuração da placa do sistema 7500

Etapa 4. Atribua as amostras de controle

13 Atribua o Controle negativo sem molde ao poço A12.

- a Selecione o poço A12 no mapa da placa.
- b Na tabela em **Assign sample(s) to the selected wells**, marque **NTC**.

O nome da amostra NTC é exibido no poço selecionado.

14 Atribua a amostra do Controle de amostra de humanos ao poço B12.

- a Selecione o poço B12 no mapa da placa.

Se você tiver mais de uma amostra de Controle de amostra de humanos que precisa ser incluída na placa, selecione o número necessário de poços adicionais na coluna 12 do mapa da placa.

- b Na tabela em **Assign sample(s) to the selected wells**, marque **HSC**.

O nome da amostra HSC é exibido no(s) poço(s) selecionado(s).

15 Atribua a amostra de Controle positivo de RNA de SARS-CoV-2 sintético ao poço H12.

- a Selecione o poço H12 no mapa da placa.
- b Na tabela em **Assign sample(s) to the selected wells**, marque **Pos**.

O nome da amostra Pos é exibido no poço selecionado.

Etapa 5. Atribua o corante de referência

16 Na tabela em **Select the dye to use as the passive reference**, selecione **ROX**.

Etapa 6. Configure o método da corrida

17 No **Experiment Menu**, no lado esquerdo da tela, em **Setup**, clique em **Run Method**. Clique na aba **Tabular View**, na parte superior.

As ferramentas para definição do volume da reação e do perfil térmico são exibidas no centro da tela.

18 Certifique-se de que o campo **Reaction Volume Per Well** está definido para 20 µl. Se não estiver, digite **20** no campo.

19 Ajuste o perfil térmico para corresponder ao mostrado na **Figura 11**. As configurações também estão resumidas na **Tabela 10**.

Se você precisar adicionar uma nova etapa de espera ao início do perfil térmico para a etapa de transcrição reversa de 50°C, siga as etapas abaixo.

- a Selecione a etapa mais à esquerda na imagem do perfil térmico.
- b Clique em **Add Stage > Holding**.

Uma nova etapa de espera é adicionada ao início do perfil térmico. Ajuste a temperatura e a duração para corresponder às da **Figura 11**.

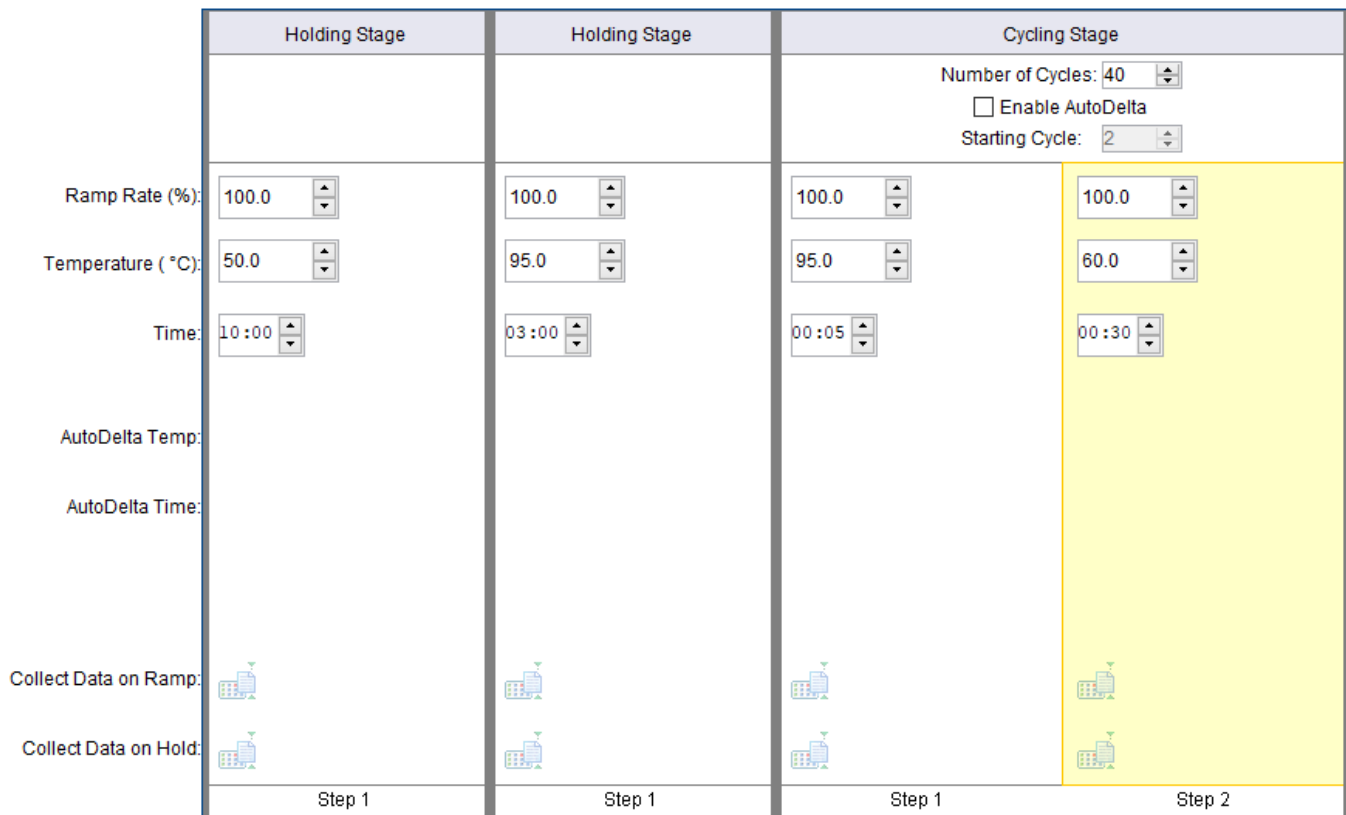


Figura 11 Perfil térmico na tela de executar método do software 7500

Tabela 10 Configurações de perfil térmico para o instrumento de PCR em tempo real 7500 Fast

Número do segmento	Número de ciclos	Duração	Temperatura
1	1	10 minutos	50°C
2	1	3 minutos	95°C
3	40	5 segundos	95°C
		30 segundos	60°C

Etapa 7. Salve o teste

20 Na parte superior da tela, clique na ponta de seta para baixo ao lado do botão **Save** para expandir o menu de opções de salvamento.

21 Selecione **Save As** no menu.

A caixa de diálogo Save As se abre.

22 Selecione uma pasta para o novo arquivo do teste.

23 No campo File name, insira um nome para o teste.

24 Certifique-se de que o tipo de arquivo está definido como **Experiment Document Single files (*.eds)**.

25 Clique em **Save**.

A caixa de diálogo se fecha e o programa salva o arquivo do teste na pasta designada.

Etapa 8. Salve o teste como um modelo para uso futuro

26 Clique na ponta de seta para baixo ao lado do botão **Save** para expandir o menu de opções de salvamento.

27 Selecione **Save As Template** no menu.

A caixa de diálogo Save As Template se abre.

28 Selecione uma pasta para o novo modelo.

29 No campo File name, digite **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR**.

30 Certifique-se de que o tipo de arquivo está definido como **Experiment Document Template files (*.edt)**.

31 Clique em **Save**.

A caixa de diálogo se fecha e o programa salva o novo arquivo modelo na pasta designada.

Para futuros ensaios, utilize o modelo salvo para criar e configurar o teste de RT-qPCR, conforme descrito em "**Criar o teste ABI 7500 Fast a partir do modelo salvo**".

Neste ponto, prossiga diretamente para "**Preparo das reações RT-qPCR**" na página 41.

Criar o teste ABI 7500 Fast a partir do modelo salvo

Se não tiver sido criado um modelo do teste com a configuração da placa e o perfil térmico necessários, consulte **“Criar e configurar o teste ABI 7500 Fast (necessário se ainda não tiver sido criado um modelo)”** na página 27.

Etapa 1. Crie o teste

- 1 Ligue o instrumento ABI 7500 Fast.
- 2 No PC conectado ao instrumento, abra o aplicativo do software do sistema 7500.
- 3 Na tela Inicial, em **Set Up**, clique em **Template**.
A caixa de diálogo Open se abre.
- 4 Na caixa de diálogo, navegue até à pasta onde o modelo está salvo.
- 5 Clique duas vezes diretamente no arquivo **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR.edt**.
O instrumento é inicializado.
O software do sistema 7500 abre na tela do teste com a configuração da placa exibida.

Etapa 2. Salve o teste

- 6 Na parte superior da tela, clique na ponta de seta para baixo ao lado do botão **Save** para expandir o menu de opções de salvamento.
- 7 Selecione **Save As** no menu.
A caixa de diálogo Save As se abre.
- 8 Selecione uma pasta para o novo arquivo do teste.
- 9 No campo File name, insira um nome para o teste.
- 10 Certifique-se de que o tipo de arquivo está definido como **Experiment Document Single files (*.eds)**.
- 11 Clique em **Save**.
A caixa de diálogo se fecha e o programa salva o arquivo do teste na pasta designada.
Neste ponto, prossiga diretamente para **“Preparo das reações RT-qPCR”** na página 41.

Criar e configurar o teste de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch (necessário se ainda não tiverem sido criados arquivos de protocolo e de placa salvos)

Caso já existam arquivos de protocolo e de placa adequados, vá para **“Criar o teste de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch a partir de arquivos de protocolo e de placa salvos”** na página 39.

Etapa 1. Crie o teste

- 1 Ligue o instrumento de PCR em tempo real CFX96 Touch.
- 2 No PC conectado ao instrumento, abra o aplicativo do software do Bio-Rad CFX Maestro.

- 3 No Assistente para Inicialização, defina a lista suspensa **Select instrument** como **CFX96** e clique em **User-defined**.

A tela de configuração da corrida abre na aba Protocol. O perfil térmico padrão é exibido no centro da tela.

Etapa 2. Configure o perfil térmico

- 4 Na lista suspensa Express Load, selecione **2-Step_Amp.prcl**.

O perfil térmico atualiza as configurações padrão para um protocolo de amplificação de 2 etapas adequado para uso com sondas fluorescentes.

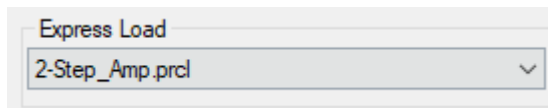


Figura 12 Express Load definida como **2-Step_Amp.prcl** na aba Protocol do CFX Maestro

- 5 Clique em **Edit Selected**.

A janela Protocol Editor se abre.

- 6 Na janela Protocol Editor, adicione uma etapa no início do perfil térmico para transcrição reversa.

- a Selecione a etapa 1 na imagem do perfil térmico.

- b Na lista suspensa Insert Step, selecione **Before**.

- c Clique em **Insert Step**.

Uma nova etapa 1 é adicionada antes da etapa selecionada.

- d Edite as configurações da nova etapa para 50°C durante 10 minutos.

- 7 Ajuste as outras etapas do perfil térmico para corresponder à **Figura 13**. As configurações também estão resumidas na **Tabela 11**. Certifique-se de que a etapa GOTO (etapa 5) está definida para repetir 39 vezes.

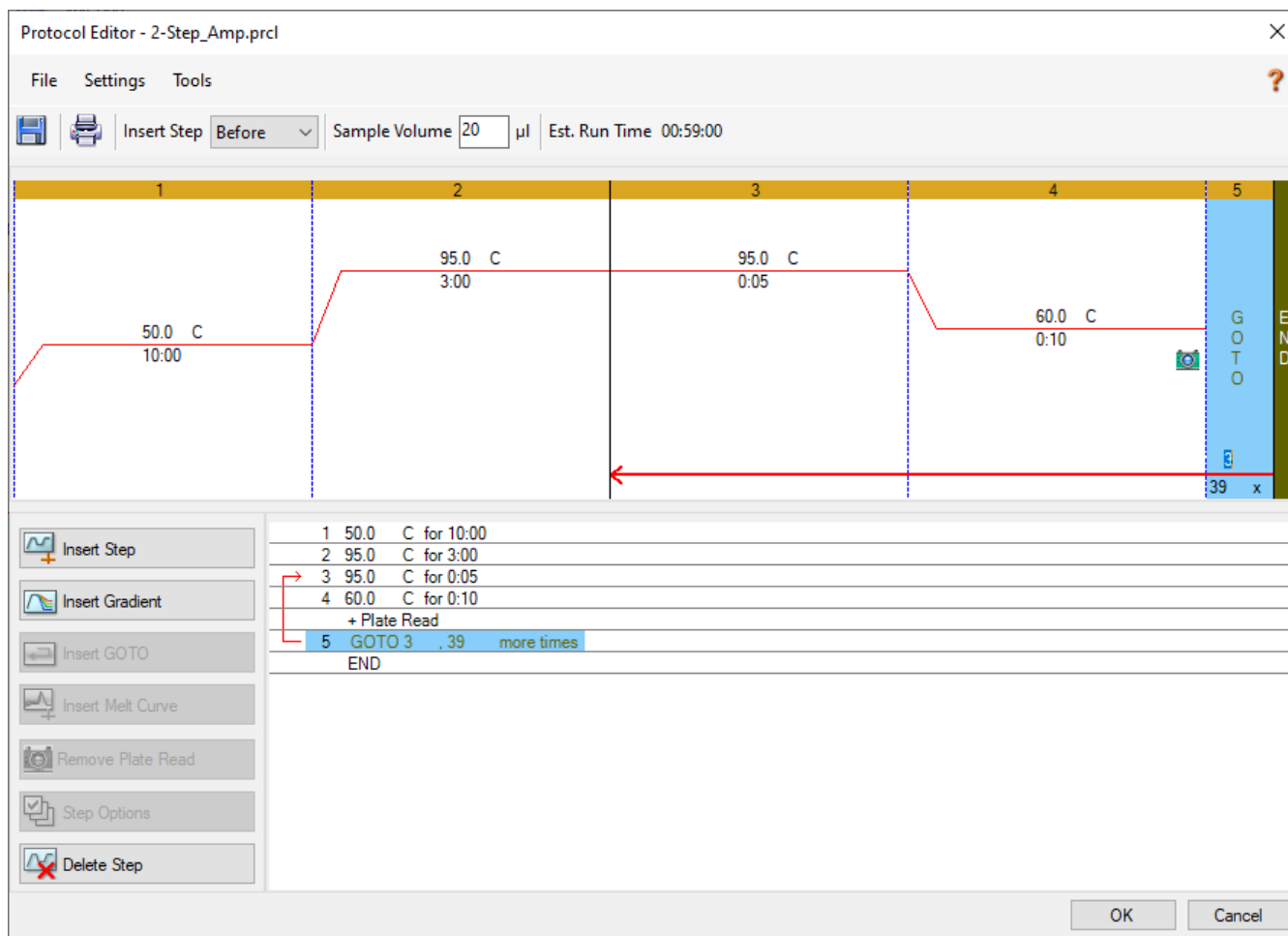


Figura 13 Perfil térmico na janela Protocol Editor do CFX Maestro

Tabela 11 Programa do ciclo térmico para o instrumento de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch

Número do segmento	Número de ciclos	Duração	Temperatura
1	1	10 minutos	50°C
2	1	3 minutos	95°C
3	40	5 segundos	95°C
		10 segundos	60°C

Etapa 3. Salve o arquivo do protocolo.

8 Clique em **Save**.

A caixa de diálogo Save As se abre solicitando que você salve o arquivo do protocolo para o teste. O arquivo do protocolo contém as configurações da aba Protocol da tela de configuração da corrida.

9 Selecione uma pasta para o arquivo do protocolo.

10 No campo File name, digite **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol**.

11 Certifique-se de que o tipo de arquivo está definido como **Protocol File (*.prcl)**.

12 Clique em **Save**.

A caixa de diálogo se fecha e o programa salva o arquivo do protocolo na pasta designada.

13 Clique em **OK** para fechar a janela Protocol Editor.

Para futuros ensaios, utilize o arquivo do protocolo salvo para configurar a aba Protocol conforme descrito em "**Criar o teste de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch a partir de arquivos de protocolo e de placa salvos**".

Etapa 4. Selecione os fluoróforos e atribua os nomes dos alvos

14 Na parte inferior da tela de configuração da corrida, clique em **Next**.

A tela de configuração da corrida avança para a aba Plate. Uma imagem do mapa da placa é exibida no centro da tela.

15 Certifique-se de que a lista suspensa Scan Mode está definida como **All Channels**.

16 Clique em **Edit Selected**.

A janela do editor da placa se abre.

17 Na janela do editor da placa, clique em **Select Fluorophores**.

A caixa de diálogo Select Fluorophores se abre.

18 Na caixa de diálogo, marque as caixas de seleção dos fluoróforos **FAM**, **HEX** e **Cy5**.

Desmarque as caixas de seleção para todos os outros fluoróforos. Consulte a **Figura 14**.

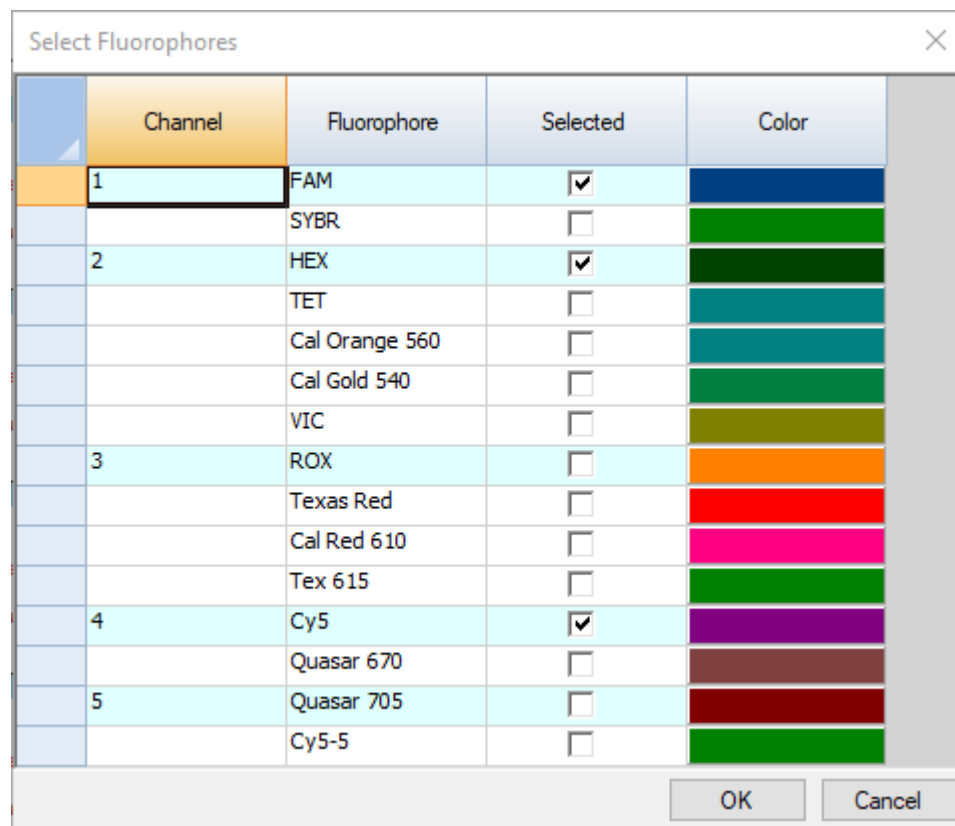


Figura 14 Seleções de fluoróforos na caixa de diálogo Select Fluorophores do CFX Maestro

19 Clique em **OK**.

A caixa de diálogo Select Fluorophores se fecha. Os três fluoróforos selecionados estão listados no lado direito da janela do editor da placa em **Target Names**.

20 Selecione todos os poços no mapa da placa.

Os poços selecionados estão destacados em azul.

A seleção de todos os 96 poços é adequada se todos os poços da placa incluírem uma reação RT-qPCR. Se algum dos poços da placa estiver vazio, não selecione esses poços nesta etapa.

21 Em **Target Names** certifique-se de que os três fluoróforos estão marcados e que todos os poços exibem os nomes dos três fluoróforos.

22 Nos campos ao lado dos nomes dos fluoróforos, digite os nomes dos alvos para os fluoróforos, como mostrado na **Figura 15**. Pressione **Enter** após digitar cada nome para aplicar o nome aos poços da placa.

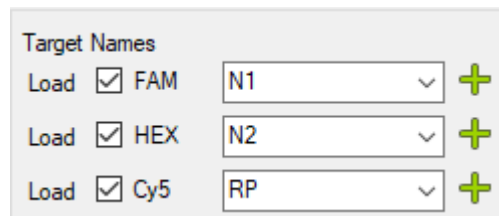


Figura 15 Atribuições de nomes de alvos na janela do editor da placa do CFX Maestro

Etapa 5. Atribua tipos e nomes de amostra

23 Atribua o tipo de amostra Controle negativo sem molde.

a Selecione o poço A12 no mapa da placa.

b Na lista suspensa Sample Type selecione **NTC**.

A identificação **NTC** é exibida na parte superior do poço A12.

24 Certifique-se de que os poços restantes estão atribuídos ao tipo de amostra desconhecido, como indicado pela identificação **Unk** na parte superior dos poços, como mostrado na **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 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP
B	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP
C	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP
D	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP
E	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP
F	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP
G	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP
H	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP	N1 N2 RP

Figura 16 Atribuições de tipos de amostras na janela do editor da placa do CFX Maestro

25 Atribua o nome da amostra para a amostra do Controle de amostra de humanos no poço B12.

a Selecione o poço B12 no mapa da placa.

Se você tiver mais de uma amostra de Controle de amostra de humanos que precisa ser incluída na placa, selecione o número necessário de poços adicionais na coluna 12 do mapa da placa.

b No campo em **Sample Names**, digite **HSC**, como mostrado na **Figura 17**. Pressione **Enter**.

O nome da amostra HSC é exibido no(s) poço(s) selecionado(s).

Figura 17 Inclusão do nome da amostra HSC na janela do editor da placa do CFX Maestro

- 26 Atribua o nome da amostra para a amostra de Controle positivo de RNA de SARS-CoV-2 sintético no poço H12.
- Selecione o poço H12 no mapa da placa.
 - No campo em **Sample Names**, digite **Pos**. Pressione **Enter**.
O nome da amostra Pos é exibido no poço H12.

Etapa 6. Salve o arquivo da placa

- 27 Clique em **Save**.

A caixa de diálogo Save As se abre solicitando que você salve o arquivo da placa para o teste. O arquivo da placa contém as configurações da aba Plate da tela de configuração da corrida.

- 28 Selecione uma pasta para o arquivo da placa.

- 29 No campo File name, digite o nome **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate**.

- 30 Certifique-se de que o tipo de arquivo está definido como **Plate File (*.pltd)**.

- 31 Clique em **Save**.

A caixa de diálogo se fecha e o programa salva o arquivo da placa na pasta designada.

- 32 Clique em **OK** para fechar a janela do editor da placa.

- 33 Na parte inferior da tela de configuração da corrida, clique em **Next**.

A tela de configuração da corrida avança para a aba Start Run.

Para futuros ensaios, utilize o arquivo da placa salvo para configurar a aba Plate conforme descrito em "**Criar o teste de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch a partir de arquivos de protocolo e de placa salvos**".

Neste ponto, prossiga diretamente para "**Preparo das reações RT-qPCR**" na página 41.

Criar o teste de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch a partir de arquivos de protocolo e de placa salvos

Se não tiver sido criado um teste com a configuração da placa e o perfil térmico necessários, consulte "**Criar e configurar o teste de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch (necessário se ainda não tiverem sido criados arquivos de protocolo e de placa salvos)**" na página 33.

Etapa 1. Crie o teste

- Ligue o instrumento de PCR em tempo real CFX96 Touch.
- No PC conectado ao instrumento, abra o aplicativo do software do Bio-Rad CFX Maestro.
- No Assistente para Inicialização, defina a lista suspensa **Select instrument** como **CFX96** e clique em **User-defined**.

A tela de configuração da corrida abre na aba Protocol. O perfil térmico padrão é exibido no centro da tela.

Etapa 2. Carregue o arquivo do protocolo

4 Clique em **Select Existing**.

A caixa de diálogo Select Protocol se abre.

5 Na caixa de diálogo, navegue até a pasta onde o arquivo **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol.prcl** está salvo.

6 Clique duas vezes diretamente no arquivo do protocolo.

As configurações do arquivo do protocolo são carregadas no teste.

Etapa 3. Carregue o arquivo da placa

7 Na parte inferior da tela de configuração da corrida, clique em **Next**.

A tela de configuração da corrida avança para a aba Plate. Uma imagem do mapa da placa é exibida no centro da tela.

8 Clique em **Select Existing**.

A caixa de diálogo Select Plat se abre.

9 Na caixa de diálogo, navegue até a pasta onde o arquivo **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate.pltd** está salvo.

10 Clique duas vezes diretamente no arquivo da placa.

As configurações do arquivo da placa são carregadas no teste.

11 Na parte inferior da tela de configuração da corrida, clique em **Next**.

A tela de configuração da corrida avança para a aba Start Run.

Neste ponto, prossiga diretamente para **“Preparo das reações RT-qPCR”** na página 41.

Preparo das reações RT-qPCR

CUIDADO

Prepare a placa de RT-qPCR imediatamente antes de usar e mantenha-a sempre em gelo ou em um rack térmico até ser introduzida no instrumento de PCR em tempo real.

Etapa 1. Prepare a mistura de reagentes para RT-qPCR e a placa na estação de trabalho pré-PCR

- 1 Descongele todos os reagentes para RT-qPCR congelados em gelo. Consulte a **Tabela 12** para obter uma lista dos reagentes necessários. Mantenha o 10 × SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx e o Reference Dye Dx protegidos da luz.
- 2 Prepare uma diluição 1:500 do Reference Dye Dx fornecido com água livre de nucleases (para uma concentração final de 30 nM nas reações). Mantenha todas as soluções que contenham o corante de referência protegidas da luz.

O Reference Dye Dx diluído, se armazenado em um tubo protegido contra a luz a 4°C, pode ser usado durante o dia para a configuração de ensaios adicionais.

- 3 Prepare a mistura de reagentes combinando os componentes na **Tabela 12** na ordem listada. Prepare uma única mistura de reagentes para todas as amostras (3 controles e até 93 amostras de teste) usando múltiplos de cada componente listado abaixo. Mantenha a mistura de reagentes no gelo e protegida da luz. Prepare a mistura de reagentes imediatamente antes de usar.
 - Se preparar 96 reações, prepare a mistura de reagentes em um tubo de 2 ml.
 - Se preparar 48 reações, prepare a mistura de reagentes em um tubo de 1,5 ml.

Para sua conveniência, a **Tabela 12** inclui os volumes para o preparo de 1 reação, 48 reações e 96 reações.

Tabela 12 Mistura de reagentes para RT-qPCR

Componente	Volume para 1 reação	Volume para 48 reações (incluindo excedente)	Volume para 96 reações (incluindo excedente)
Água livre de nucleases	1,5 µl	81 µl	162 µl
2 × Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	10 µl	540 µl	1080 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 diluído (da etapa 2)	0,3 µl	16,2 µl	32,4 µl
RT/RNase Block Dx	1 µl	54 µl	108 µl

- 4 Misture suavemente a mistura de reagentes em um agitador vortex sem criar bolhas, depois centrifugue o tubo em uma microcentrífuga por 5 segundos.

- 5 Distribua 15 µl da mistura de reagentes nos poços da placa de 96 poços, utilizando o seguinte procedimento.
 - a Coloque uma tira de 8 × tubos limpos em um rack térmico de 96 poços.
 - b Dispense 190 µl da mistura de reagentes (se estiver correndo 96 reações) ou 100 µl da mistura de reagentes (se estiver correndo 48 reações) em cada um dos 8 tubos da tira. Se necessário, expulse quaisquer bolhas grandes que possam estar presentes no fundo dos tubos.
 - c Com uma pipeta multicanal, transfira 15 µl da mistura de reagentes da tira de tubos de 8 poços para as colunas da placa de 96 poços. Mantenha a placa em gelo, ou em um rack térmico de 96 poços, e protegida da luz, durante todo o processo.

NOTA

Se você estiver correndo apenas 48 reações, deixe as colunas de 1 a 6 vazias.

- 6 Com a placa tampada, leve a placa para a área de trabalho pré-PCR designada para a adição de amostras. Mantenha a placa em gelo ou em um rack térmico.

Etapa 2. Adicione as amostras de controle e de teste à placa de RT-qPCR na estação de trabalho pré-PCR (área de adição de amostras)

- 7 Dilua o Controle positivo de RNA de SARS-CoV-2 sintético para uma solução padrão de trabalho de 10 cópias/µl.
 - a Adicione 99 µl de água livre de nucleases em um tubo limpo de 1,5 ml. A este tubo, adicione 1 µl de Controle positivo de RNA de SARS-CoV-2 sintético não diluído. Misture bem em um agitador vortex, depois centrifugue brevemente em uma microcentrífuga.
 - b Adicione 99 µl de água livre de nucleases a outro tubo limpo de 1,5 ml. A este tubo, adicione 1 µl do Controle positivo de RNA de SARS-CoV-2 sintético diluído preparado na **etapa a**. Misture bem em um agitador vortex, depois centrifugue brevemente em uma microcentrífuga.

Este tubo contém a solução padrão de trabalho do Controle positivo de RNA de SARS-CoV-2 sintético com uma concentração de 10 cópias/µl.

A solução padrão de trabalho, se armazenada a 4°C, pode ser usada durante o dia para a configuração de ensaios adicionais. Devolva a solução original de Controle positivo de RNA de SARS-CoV-2 sintético para -80°C.

- 8** Configure as reações de controle como mostrado na **Figura 18**.
- Para o Controle negativo sem molde (NTC), adicione 5 µl de água livre de nucleases ao poço A12.
 - Para o Controle de amostra de humanos (HSC), agite brevemente em um agitador vortex o RNA preparado a partir do Controle de amostra de humanos. Depois, acrescente 5 µl do RNA no poço B12.
- Se você tiver mais de uma amostra de HSC que precisa ser incluída na placa, utilize os poços adicionais na coluna 12, conforme atribuído ao configurar a placa no software do instrumento de RT-qPCR.
- Para o Controle positivo de RNA de SARS-CoV-2 sintético (Pos), adicione 5 µl do Controle positivo de RNA de SARS-CoV-2 sintético diluído no poço H12.
- 9** Configure as reações das amostras de teste (S1 a S93) como mostrado na **Figura 18**. Troque de luvas frequentemente para evitar contaminação.
- Agite brevemente em um agitador vortex as amostras de RNA preparadas a partir das amostras de teste. Depois centrifugue em uma microcentrífuga por 5 segundos.
 - Para cada amostra, adicione 5 µl em um poço da placa de RT-qPCR. Acompanhe com cuidado qual amostra foi adicionada a cada poço. Troque as ponteiros após cada adição.
 - Se a placa de RT-qPCR tiver que ser selada com uma fita autocolante, misture as reações antes de selar, pipetando brevemente as misturas para cima e para baixo sem criar bolhas.

NOTA

Se você estiver correndo apenas 48 reações, deixe os poços da placa identificados para S1 a S48 vazios.

- 10** Sele a placa com uma fita autocolante ou com tiras de tampa de tubo.
- 11** Se a placa for selada com tiras de tampa de tubo, misture brevemente em um agitador vortex. (Não utilize um agitador vortex nas placas seladas com fita autocolante.)
- 12** Centrifugue brevemente a placa em uma centrífuga de placas.
- 13** Se você estiver utilizando o Sistema de PCR em tempo real Agilent AriaMx/AriaDx e selar a placa com fita autocolante, adicione um bloco de compressão sobre a placa.
- 14** Proceda diretamente à realização da RT-qPCR no seu sistema de PCR em tempo real.
- Consulte **“Realizar a RT-qPCR no Sistema de PCR em tempo real Agilent AriaMx/AriaDx”** na página 46
 - Consulte **“Realizar a RT-qPCR no instrumento de PCR em tempo real ABI 7500 Fast”** na página 54
 - Consulte **“Realizar a RT-qPCR no sistema de detecção de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch”** na página 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 Configuração da placa para amostras de teste 1 a 93 e amostras de controle (Controle negativo sem molde [NTC], Controle de amostra de humanos [HSC] e Controle positivo de RNA sintético para diagnóstico [Pos])

5 Instruções para a execução da RT-qPCR

Realizar a RT-qPCR no Sistema de PCR em tempo real Agilent AriaMx/AriaDx **46**

Realizar a RT-qPCR no instrumento de PCR em tempo real ABI 7500 Fast **54**

Realizar a RT-qPCR no sistema de detecção de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch **61**

Este capítulo contém instruções sobre como executar o programa do ciclo da RT-qPCR no instrumento de PCR em tempo real selecionado.

Realizar a RT-qPCR no Sistema de PCR em tempo real Agilent AriaMx/AriaDx

Esta seção descreve o procedimento para executar a RT-qPCR em um sistema de PCR em tempo real Agilent AriaMx ou AriaDx.

Execute o programa da RT-qPCR no sistema AriaMx/AriaDx

- 1 Certifique-se de que o instrumento AriaMx/AriaDx está ligado.
- 2 No PC conectado ao instrumento, abra o teste que você criou anteriormente no aplicativo Aria.
- 3 Navegue até a tela de perfil térmico, tela de status da corrida ou tela de gráficos de dados brutos.
- 4 Clique em **Run**.
A caixa de diálogo Instrument Explorer se abre.
- 5 Localize o instrumento que você estará usando para a corrida e clique em **Send Config**. (Consulte a Configuração e o Guia do Usuário do AriaMx ou do AriaDx para obter instruções sobre como procurar e adicionar instrumentos.)
 - Se esta é a primeira vez que você se conectou a um instrumento desde a última inicialização do programa Aria, a caixa de diálogo Login se abre. Selecione seu nome de usuário na lista suspensa, digite sua senha de login no campo Password e clique em **Login**. Para fazer login com uma conta de usuário diferente, clique com o botão direito do mouse no nome do instrumento e clique em **Log off current user**. Você pode então fazer login usando a conta de usuário desejada.
 - Se o teste ainda não foi salvo, você será solicitado a salvar o teste antes de prosseguir.
- 6 Leve sua placa de reação até o instrumento e introduza no bloco térmico.
- 7 Na tela sensível ao toque do instrumento, abra o teste preparado na tela do perfil térmico e pressione **Run Experiment**.
O instrumento começa a executar o teste.
- 8 Volte ao programa do PC. O programa direciona o usuário para a tela de status da corrida, onde é possível monitorar o progresso da corrida.
O monitoramento da corrida não é necessário. Se você fechar o software Aria antes da conclusão da corrida, anote onde o arquivo do teste pós-execução será salvo.

Atribua as configurações de análise de dados para o teste AriaMx/AriaDx

Etapa 1. Veja os gráficos de amplificação para todos os alvos em todos os poços

- 1 Quando a corrida estiver concluída, abra o arquivo do teste no software Aria.
- 2 Clique em **Analysis Criteria** no lado esquerdo da tela.

A tela Analysis Criteria se abre, com configurações para especificar as configurações para análise.

- 3 Certifique-se de que todos os poços, tipos de poços e alvos estão selecionados para análise, como mostrado na **Figura 19**.

NOTA

Se a placa contém poços vazios, certifique-se de que os mesmos estão atribuídos ao tipo de poço em branco na aba Plate Setup.

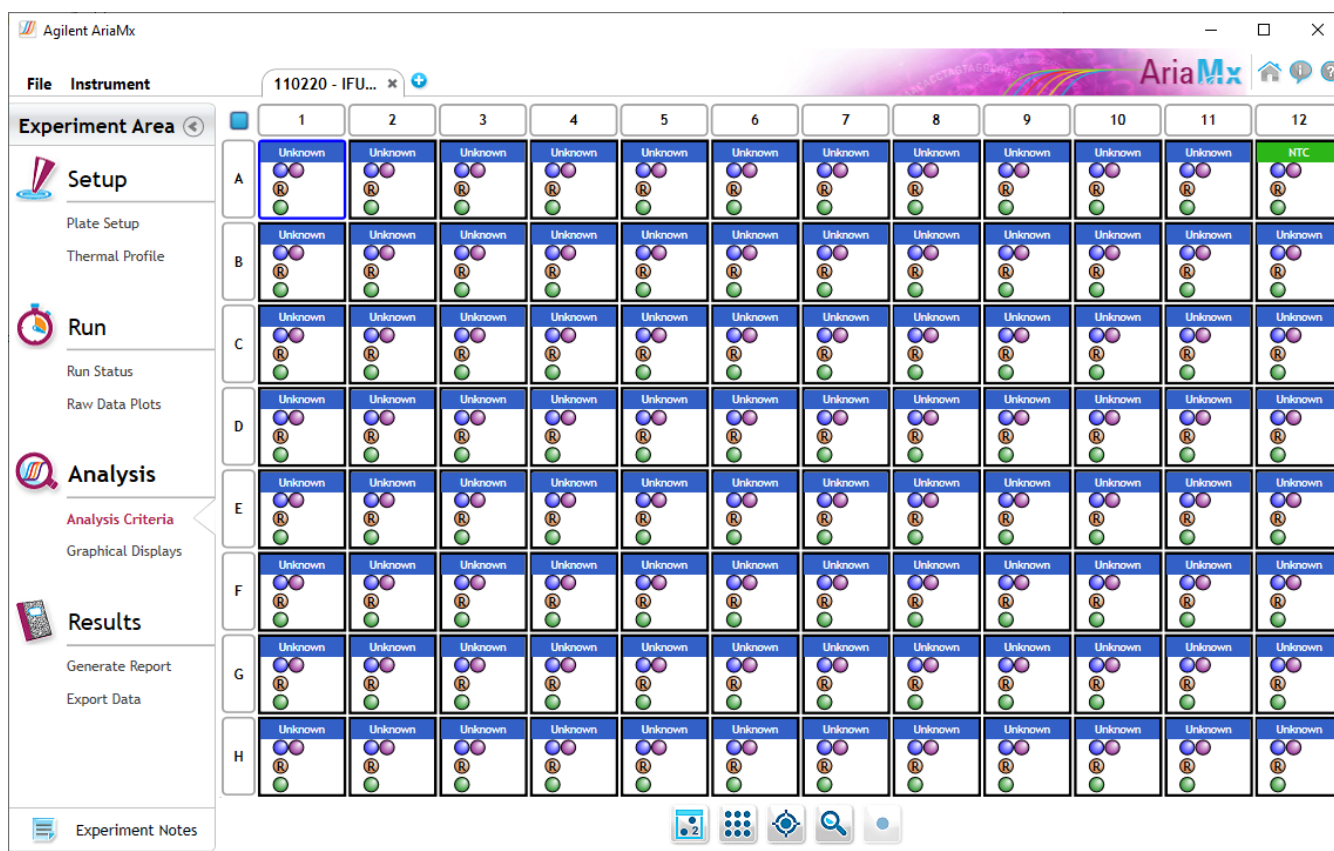


Figura 19 Tela Analysis Criteria do Aria

- 4 Clique em **Graphical Displays** no lado esquerdo da tela.

A tela Graphical Displays se abre, exibindo os dados com ferramentas para configurar os parâmetros da análise.

- 5 Certifique-se de que a tela está exibindo os gráficos de amplificação e que os parâmetros de análise padrão correspondem aos mostrados na **Figura 20**.

Se você não visualizar o painel completo dos parâmetros de análise mostrado na **Figura 20**, clique na ponta de seta para baixo logo abaixo da configuração **Smoothing** para expandir o painel.

Observe que os valores padrão de Threshold Fluorescence no seu teste provavelmente serão diferentes daqueles mostrados na **Figura 20**. O software calcula os valores padrão com base no nível de ruído de fluorescência no intervalo do ciclo de fundo. Conseqüentemente, os valores padrão irão variar entre os testes.

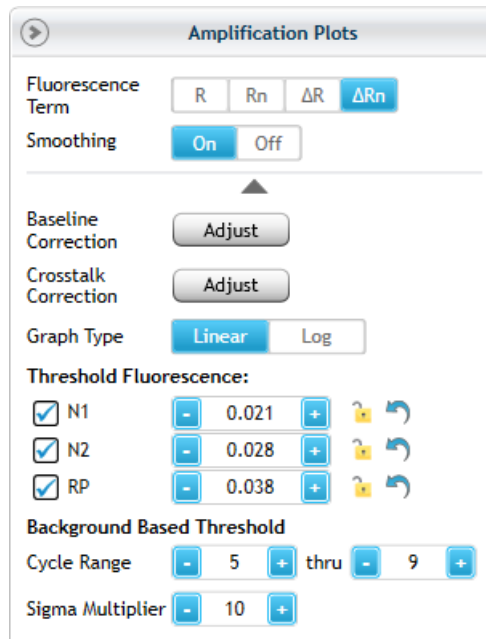


Figura 20 Configurações padrão para gráficos de amplificação no software Aria (os valores de Threshold Fluorescence irão variar entre os testes)

- 6 Em **Background Based Threshold**, certifique-se de que o intervalo de ciclo padrão é de 5 a 9.
- 7 Verifique se há gráficos de amplificação com amplificação precoce (isto é, antes do ciclo 9). Exclua todas as amostras de teste com amplificação precoce da análise e repita o teste com uma concentração mais baixa.

Em amostras de teste com concentrações excepcionalmente elevadas de RNA viral, a amplificação dos alvos virais pode atingir níveis detectáveis em um número de ciclo muito precoce (<9). Como parte dos cálculos de correção da linha de base, o software pode interpretar esses sinais de amplificação precoce como ruído de fundo e não atribuir um valor de C_q aos alvos virais nessas amostras.

Monitore a presença de tais amostras de teste visualizando os gráficos de amplificação sem correção de linha de base (termo de fluorescência R ou R_n). Se alguma das amostras de teste mostrar sinais de amplificação antes do ciclo 9, remova esses poços da análise desmarcando-os na tela Analysis Criteria. Corra novamente a reação RT-qPCR para a amostra diluindo o ácido nucleico a 1:100 usando o tampão de eluição adequado.

Etapa 2. Avalie os valores dos limites

- 8 Na configuração do tipo de gráfico, altere a seleção de **Linear** para **Log**. Certifique-se de que o Fluorescence Term está definido como ΔRn .

A visualização dos gráficos de amplificação em valores de log proporciona uma melhor visualização do ruído do sinal de fundo. Um exemplo é mostrado na **Figura 21**. A linha limite para cada alvo é exibida como uma linha horizontal.

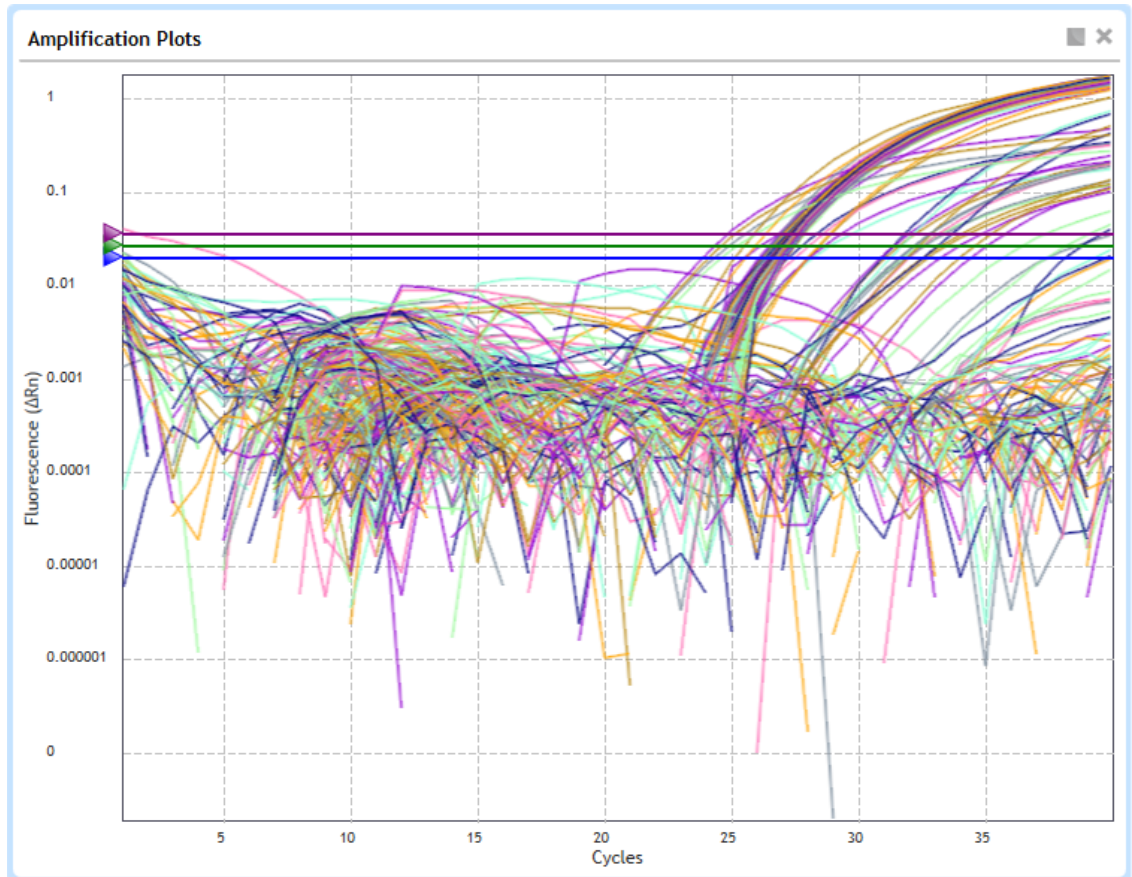




Figura 21 Gráficos de amplificação do Aria em escala logarítmica – limites alvo exibidos como linhas horizontais

- 9 Avalie visualmente os gráficos de amplificação e o limite padrão para o alvo N1.
- Clique no ícone de exibição de alvos localizado abaixo do gráfico. 
 - No menu que se abre, desmarque as caixas para todos os outros alvos, de modo que apenas o alvo N1 seja exibido nos gráficos de amplificação.
 - Determine se o limite é suficientemente alto para estar acima do ruído de fundo e suficientemente baixo para incluir os gráficos na fase de amplificação exponencial (consulte a **Figura 23**). Com base nesta determinação, prossiga como indicado na **Tabela 13**.
- 10 Repita a **etapa 9** para o alvo N2 e novamente para o alvo RP.
- 11 Em **Threshold Fluorescence**, certifique-se de que os três alvos estejam selecionados e que os três valores de Threshold Fluorescence estejam bloqueados, como mostrado na **Figura 22**.

12 Clique no ícone de exibição de alvos localizado abaixo do gráfico.  Certifique-se de que todos os alvos estão selecionados.

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 Alvos selecionados e valores de Threshold Fluorescence bloqueados

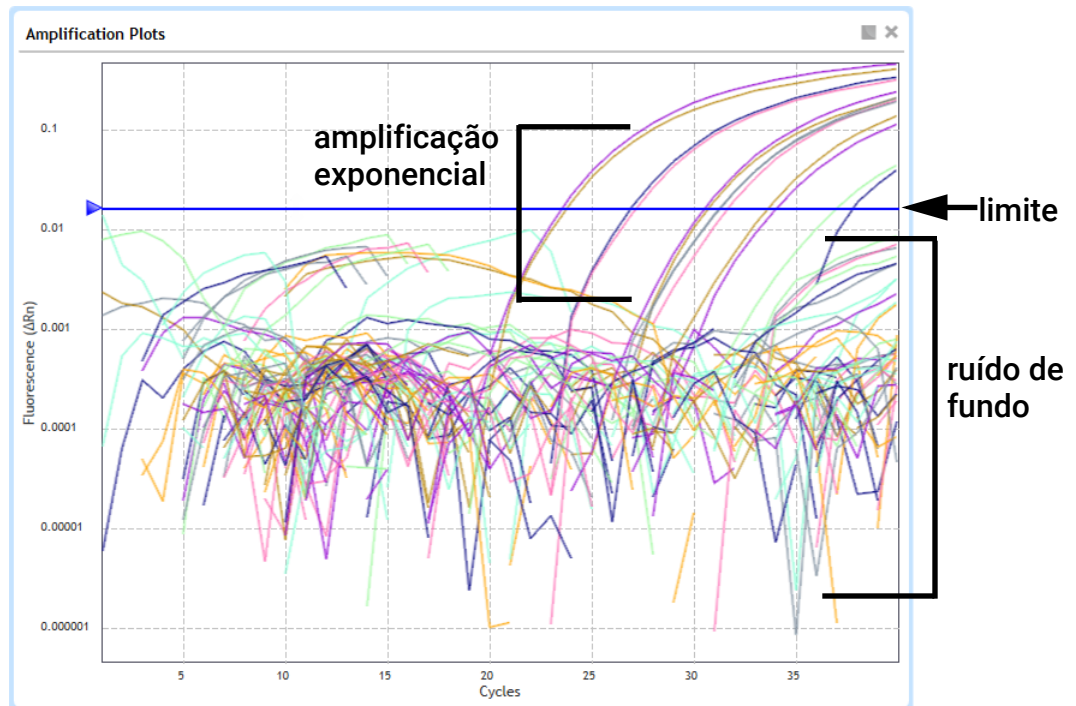


Figura 23 Gráficos de amplificação do Aria para o alvo N1

Tabela 13 Verificação da configuração ideal do limite no software Aria

Posição do limite	Descrição	Ação
Posição ideal	Acima do ruído de fundo e inclui todos os gráficos na fase de amplificação exponencial	<ul style="list-style-type: none"> Bloqueie o valor de Threshold Fluorescence no lado direito da tela, clicando no ícone de bloqueio. <p>Quando o valor está bloqueado, o ícone de bloqueio está na posição fechada. O bloqueio do valor impede que o valor seja alterado se algum dos critérios de análise for alterado.</p>
Muito alto	Alguns gráficos em fase de amplificação exponencial não ultrapassam o limite	<ul style="list-style-type: none"> Procure por poços com um ruído de fundo excepcionalmente alto. Esses poços discrepantes podem fazer com que o software defina o limite muito alto. Volte para a tela Analysis Criteria para excluir esse poço da análise. O software irá recalculer o limite assim que o poço discrepante for excluído. Como alternativa, use o mouse para arrastar manualmente a linha limite no gráfico para uma nova posição. Verifique se o novo limite está em uma posição ideal e bloqueie o valor de Threshold Fluorescence, conforme descrito acima. Quando o novo valor estiver bloqueado, volte à tela Analysis Criteria mais uma vez para incluir novamente o poço discrepante na análise.* <p>* Se o gráfico de amplificação do poço discrepante não mostrar amplificação exponencial em nenhum número de ciclo, certifique-se de que o limite reduzido não faz com que o software atribua um valor de Cq ao poço (devido ao ruído do sinal de fundo atravessando o limite). Se isso acontecer, tente modificar outras configurações de análise para esse poço, por exemplo, ajustando a configuração da correção da linha de base.</p>
Muito baixo	Alguns gráficos não estão acima do ruído de fundo.	<ul style="list-style-type: none"> Aumente o limite para um pouco acima do nível do ruído de fundo.

Etapa 3. Verifique os resultados no poço NTC

13 Na tabela de resultados, localize a reação do Controle negativo sem molde (NTC), localizada no poço A12.

14 Certifique-se de que a coluna Cq para os três alvos indique "No Cq" ou tem um valor de Cq >37,00.

Se a reação do NTC tiver um valor de Cq ≤37,00 para qualquer um dos alvos, pode ter ocorrido contaminação da amostra. Invalide a corrida e repita o ensaio seguindo estritamente as diretrizes.

Exporte os dados a partir do software Aria

Etapa 1. Defina e salve as configurações de exportação

Se as configurações de exportação já tiverem sido salvas, vá diretamente para "**Etapa 2. Exporte os dados**" na página 53.

1 No lado esquerdo da tela, em **Results**, clique em **Export Data**.

A tela de exportação de dados se abre.

- 2 No painel de configuração de exportação, selecione um tipo de arquivo para os dados exportados, por exemplo, **Excel**.
- 3 Em **Items**, certifique-se de que a caixa de seleção Tabular Results está selecionada. Desmarque as caixas de seleção para os outros itens. Consulte a **Figura 24**.

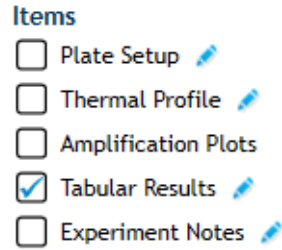
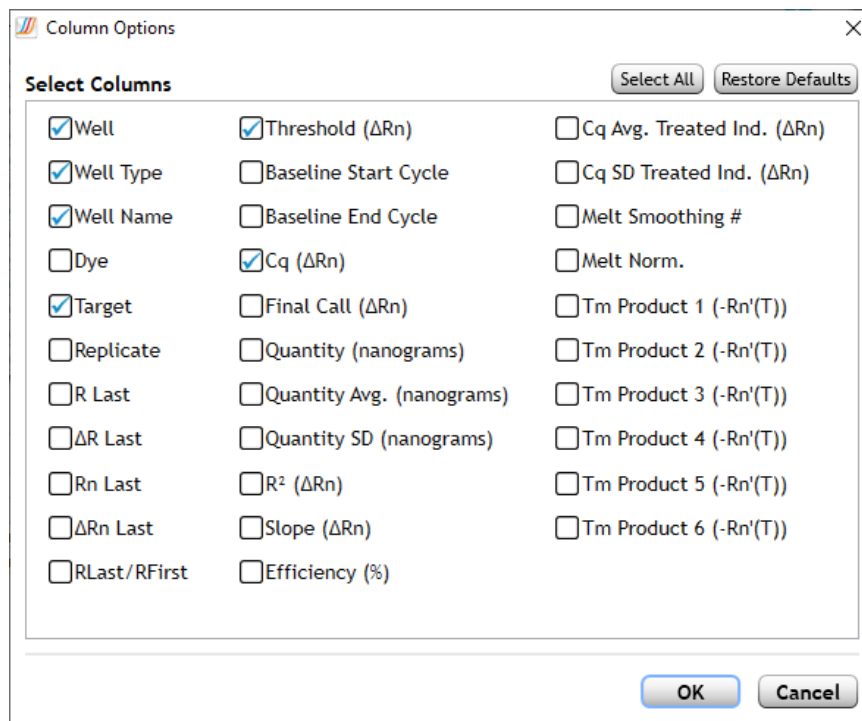


Figura 24 Tela de exportação de dados do software Aria – itens para exportação

- 4 Clique no ícone de lápis ao lado de **Tabular Results** para personalizar quais colunas de dados devem ser incluídas.

A caixa de diálogo Column Options se abre.

- 5 Ajuste as configurações para que somente as colunas selecionadas para inclusão sejam as mostradas na **Figura 25**.



Colunas
selecionadas:

Well
Well Type
Well Name
Target
Threshold
Cq

Figura 25 Caixa de diálogo Column Options do Aria

- 6 Clique em **OK** para salvar suas alterações e fechar a caixa de diálogo.
- 7 Salve as configurações de exportação como uma nova definição.
 - a No painel de configuração de exportação, expanda a lista suspensa Definition.
 - b Clique em **Add New**.

A caixa de diálogo Add New Definition se abre.

- c No campo Definition name, digite **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data**. Consulte a **Figura 26**.
- d Certifique-se de que a caixa de seleção Use Current Settings está selecionada.
- e Clique em **Add**.

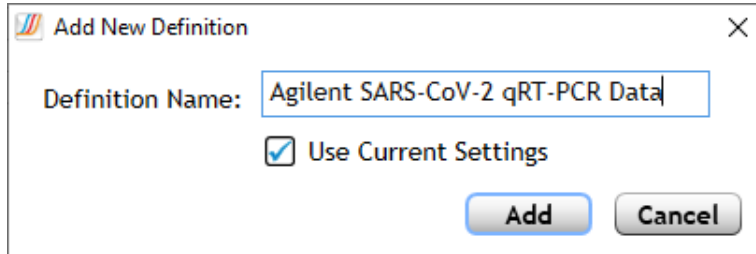


Figura 26 Caixa de diálogo Add New Definition do Aria

Etapa 2. Exporte os dados

- 8 No painel de configuração de exportação, certifique-se de que a lista suspensa Definition está definida para **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data**.
- 9 Clique em **Export Data**.

O relatório é aberto no aplicativo padrão para o tipo de arquivo selecionado.
- 10 Analise os dados Cq para cada uma das amostras de teste e controles para interpretar os resultados. Consulte o [Capítulo 6](#), "Análise e resultados".

Realizar a RT-qPCR no instrumento de PCR em tempo real ABI 7500 Fast

Esta seção descreve o procedimento para executar a RT-qPCR em um instrumento de PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 Fast.

Execute o programa da RT-qPCR no instrumento de PCR em tempo real ABI 7500 Fast

- 1 Certifique-se de que o instrumento ABI 7500 Fast está ligado.
- 2 No PC conectado ao instrumento, abra o teste que você criou anteriormente no software 7500.
- 3 No instrumento, empurre a porta da bandeja para abrir a tampa. Introduza a sua placa de reação no bloco térmico do instrumento.
- 4 Empurre a porta da bandeja para fechar a tampa.
- 5 No PC, clique em **START RUN**.
O instrumento começa a executar o teste.

Atribua as configurações de análise de dados para o teste ABI 7500 Fast

Etapa 1. Veja os gráficos de amplificação para todos os alvos em todos os poços

- 1 Quando a corrida estiver concluída, abra o teste no aplicativo do software Design & Analysis.
- 2 Na parte superior da tela, clique na aba Quality Check, se ainda não estiver selecionada. Na lista suspensa, certifique-se de que **Amplification Plot** está selecionado.

A tela exibe os gráficos de amplificação, uma tabela dos resultados em cada poço e um diagrama do mapa da placa.

NOTA

Se a placa contém poços vazios, omita todos os alvos para esses poços da análise e analise novamente.

- 3 Clique em **Actions > Primary Analysis Setting**.

A caixa de diálogo Primary Analysis Setting se abre. As configurações padrão nesta caixa de diálogo são mostradas na **Figura 27**.

- 4 Certifique-se de que as configurações correspondem às mostradas na **Figura 27**. Se necessário, clique em **Reset to Default**.

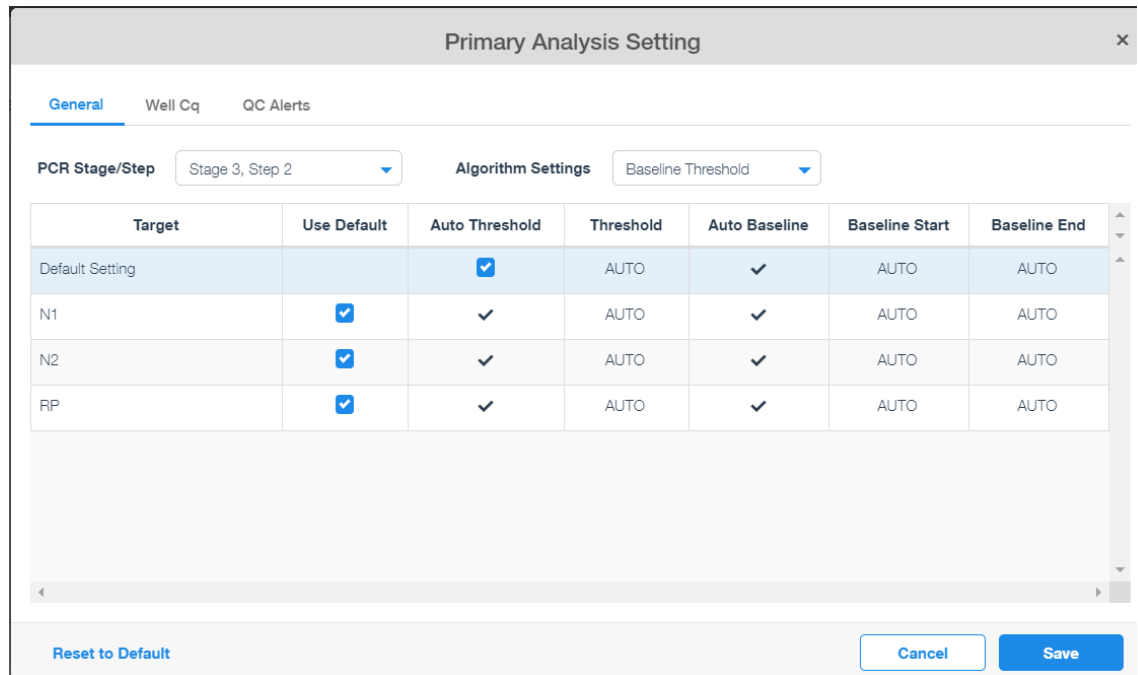


Figura 27 Configurações padrão na caixa de diálogo Primary Analysis Setting do Design & Analysis

5 Clique em **Save**.

A caixa de diálogo Primary Analysis Setting se fecha.

6 Certifique-se de que o botão Analyze tem uma marca de verificação verde no canto. Se não, clique em **Analyze**.

7 Verifique se há gráficos de amplificação com amplificação precoce (isto é, antes do ciclo 9). Omita todas as amostras de teste com amplificação precoce da análise e repita o teste com uma concentração mais baixa.

Em amostras de teste com concentrações excepcionalmente elevadas de RNA viral, a amplificação dos alvos virais pode atingir níveis detectáveis em um número de ciclo muito precoce (<9). Como parte dos cálculos de correção da linha de base, o software pode interpretar esses sinais de amplificação precoce como ruído de fundo e não atribuir um valor de Cq aos alvos virais nessas amostras.

Monitore a presença de tais amostras de teste visualizando o gráfico de amplificação sem correção de linha de base (defina o **Y Value** para **Rn**). Se alguma das amostras de teste mostrar sinais de amplificação antes do ciclo 9, remova esses poços da análise omitindo-os na tela Quality Check. Corra novamente a reação RT-qPCR para a amostra diluindo o ácido nucleico a 1:100 usando o tampão de eluição adequado.

Etapa 2. Avalie os valores dos limites

8 Clique no ícone de configurações logo acima do gráfico de amplificação

A caixa de diálogo de configurações se abre na aba geral.

9 Certifique-se de que a configuração Y Value está definida como ΔRn .

10 Na lista suspensa Y Scale, alterne a seleção de **Linear** para **Log**, como mostrado na **Figura 28**.

A visualização dos gráficos de amplificação em valores de log proporciona uma melhor visualização do ruído do sinal de fundo. Um exemplo é mostrado na **Figura 29**. A linha limite para cada alvo é exibida como uma linha horizontal.

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 Configurações gerais do Design & Analysis para o gráfico de amplificação

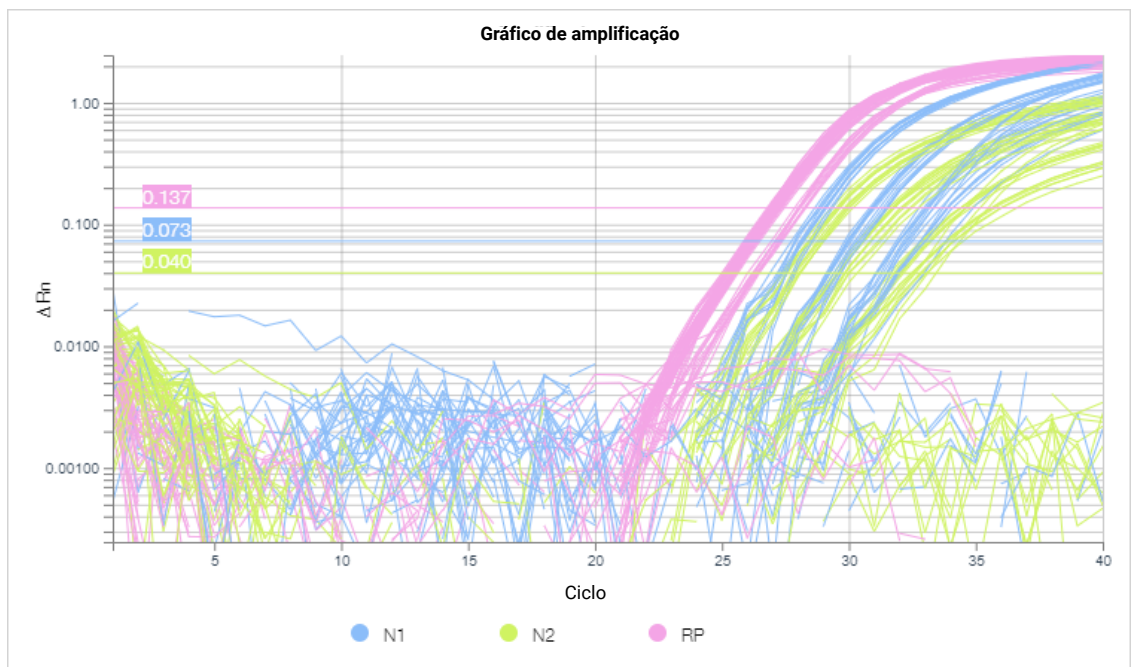


Figura 29 Gráficos de amplificação do Design & Analysis em escala logarítmica – limites alvo exibidos como linhas horizontais

11 Avalie visualmente os gráficos de amplificação e o limite padrão para o alvo N1.

- a No lado esquerdo da tela, expanda a lista suspensa Targets.
- b Selecione apenas o alvo N1 e, em seguida, minimize a lista suspensa.

- c Determine se o limite é suficientemente alto para estar acima do ruído de fundo e suficientemente baixo para incluir os gráficos na fase de amplificação exponencial (consulte a **Figura 30**). Com base nesta determinação, prossiga como indicado na **Tabela 14**.

12 Repita a **etapa 11** para o alvo N2 e novamente para o alvo RP.

13 No lado esquerdo da tela, em **Targets**, clique em **Clear all** para remover a filtragem por alvo.

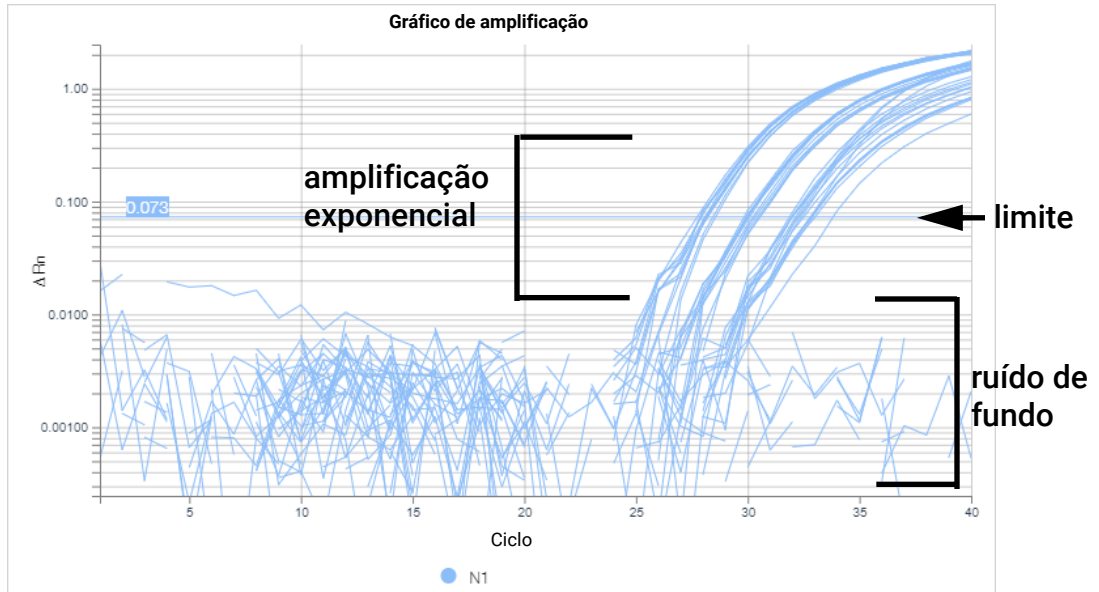


Figura 30 Gráficos de amplificação do Design & Analysis para o alvo N1

Tabela 14 Verificação da configuração ideal do limite no software Design & Analysis

Posição do limite	Descrição	Ação
Posição ideal	Acima do ruído de fundo e inclui todos os gráficos na fase de amplificação exponencial	<ul style="list-style-type: none"> Deixe os limites nos seus valores atuais.
Muito alto	Alguns gráficos em fase de amplificação exponencial não ultrapassam o limite	<ul style="list-style-type: none"> Procure por poços com um ruído de fundo excepcionalmente alto. Esses poços discrepantes podem fazer com que o software defina o limite muito alto. Selecione o poço discrepante no mapa da placa. Na barra de ferramentas diretamente acima do mapa da placa, clique no botão com três pontos. No menu que se abre, clique em Omit Wells. Clique em Analyze. O software irá recalculer o limite assim que o poço discrepante for excluído. Como alternativa, use o mouse para arrastar manualmente a linha limite no gráfico para uma nova posição. Selecione todos os poços no mapa da placa para visualizar todos os gráficos de amplificação. Verifique se o novo limite está em uma posição ideal. Clique novamente no botão com três pontos. No menu que se abre, clique em Unomit Wells para incluir novamente o poço discrepante na análise.* <p>* Se o gráfico de amplificação do poço discrepante não mostrar amplificação exponencial em nenhum número de ciclo, certifique-se de que o limite reduzido não faz com que o software atribua um valor de Cq ao poço (devido ao ruído do sinal de fundo atravessando o limite). Se isso acontecer, tente modificar outras configurações de análise para esse poço, por exemplo, ajustando o número de ciclos de Baseline Start e/ou Baseline End.</p>
Muito baixo	Alguns gráficos não estão acima do ruído de fundo.	<ul style="list-style-type: none"> Aumente o limite para um pouco acima do nível do ruído de fundo.

Etapa 3. Verifique os resultados no poço NTC

14 Na tabela de poços, localize a reação do Controle negativo sem molde (NTC), localizada no poço A12.

15 Certifique-se de que a coluna Cq para os três alvos indique “Undetermined” ou tem um valor de Cq >37,00.

Se a reação do NTC tiver um valor de Cq ≤37,00 para qualquer um dos alvos, pode ter ocorrido contaminação da amostra. Invalide a corrida e repita o ensaio seguindo estritamente as diretrizes.

Exporte os dados da tabela de poços do software Design & Analysis para um arquivo CSV

Etapa 1. Personalize as colunas incluídas na tabela de poços

1 Na barra de ferramentas logo acima da tabela de poços, clique em **View**.

Um menu se abre, como mostrado na **Figura 31**, listando todas as colunas da tabela disponíveis.

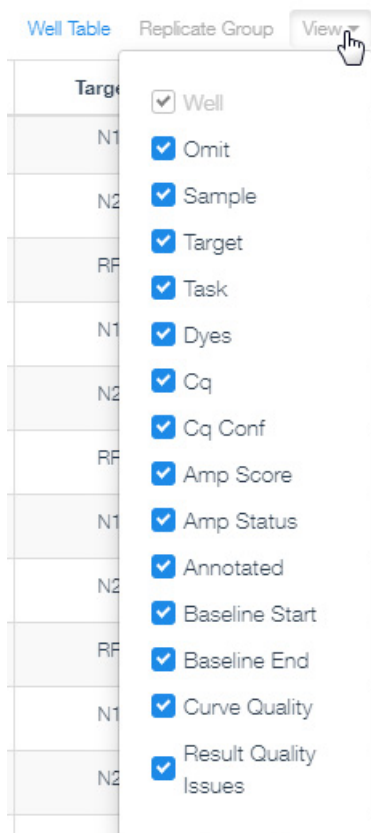
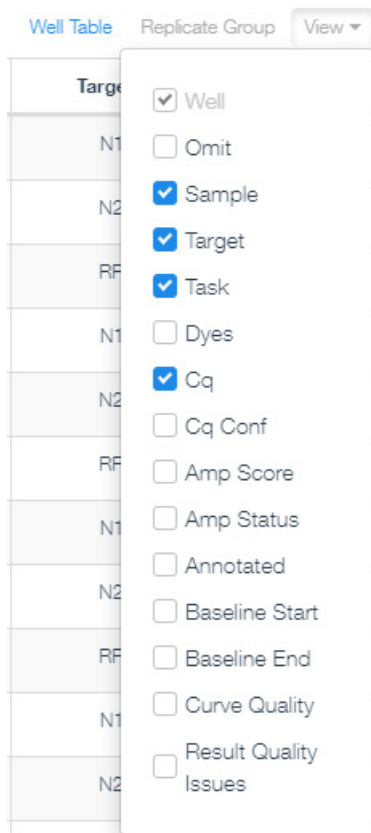


Figura 31 Menu de exibição para a tabela de poços do Design & Analysis – seleção de colunas padrão

- 2 Ajuste as configurações para que somente as colunas selecionadas para inclusão sejam Well, Sample, Target, Task e Cq. Consulte a **Figura 32**.



Colunas
selecionadas:

Sample

Target

Task

Cq

Figura 32 Menu de exibição para a tabela de poços do Design & Analysis – seleção de colunas personalizada

3 Clique em **View** para minimizar o menu.

Etapa 2. Exporte os dados

4 Na barra de ferramentas logo acima da tabela de poços, clique no botão da barra de ferramentas com três pontos. ●●●

5 No menu que se abre, clique em **Export**.

Uma caixa de diálogo se abre para salvar o arquivo CSV.

6 Selecione uma pasta para o arquivo.

7 No campo File name, insira um nome para o arquivo.

8 Clique em **Save**.

A caixa de diálogo se fecha e o programa exporta os dados para o tipo de arquivo CSV e o salva na pasta designada.

9 Abra o arquivo e analise os dados Cq para cada uma das amostras de teste e controles para interpretar os resultados. Consulte o [Capítulo 6](#), "Análise e resultados".

Realizar a RT-qPCR no sistema de detecção de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch

Esta seção descreve o procedimento para executar a RT-qPCR em um sistema de detecção de PCR em tempo real Bio-Rad CFX96 Touch.

Execute o programa da RT-qPCR no sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch

- 1 Certifique-se de que o instrumento CFX96 Touch está ligado.
- 2 No PC conectado ao instrumento, abra o teste que você criou anteriormente no aplicativo do software CFX Maestro.
- 3 Navegue até a aba Start Run da tela de configuração da corrida.
Se o instrumento estiver ligado, mas não for exibido em **Block Name**, clique em **Detect Instrument(s)** no canto superior esquerdo da tela.
- 4 Na tabela, selecione o instrumento a ser utilizado para a execução do teste.
- 5 Clique em **Open Lid**.
A tampa do instrumento se abre.
- 6 Introduza a sua placa de reação no bloco térmico do instrumento.
- 7 No PC, clique em **Close Lid**.
A tampa do instrumento se fecha.
- 8 Clique em **Start Run**.
- 9 Salve o arquivo da corrida na pasta desejada. Digite um nome de arquivo e clique em **Save**.
O instrumento começa a executar o teste.

Atribua as configurações de análise de dados para o sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch

Etapa 1. Veja os gráficos de amplificação para todos os alvos em todos os poços

- 1 Quando a corrida estiver concluída, abra o teste no aplicativo do software CFX Maestro.
O teste é aberto na janela de análise de dados.
- 2 Na parte superior da janela, clique na aba Quantification, se ainda não estiver selecionada.
A janela exibe os gráficos de amplificação, uma tabela dos resultados em cada poço e um diagrama do mapa da placa.

- 3 Aplique o recurso de correção de desvio de fluorescência.
 - Na parte superior da janela de análise de dados, clique em **Settings > Baseline Settings > Apply Fluorescence Drift Correction**.

O software corrige automaticamente qualquer desvio no sinal de fluorescência que possa estar presente no intervalo do ciclo da linha de base.

- 4 Verifique se há gráficos de amplificação com amplificação precoce (isto é, antes do ciclo 9). Exclua todas as amostras de teste com amplificação precoce da análise e repita o teste com uma concentração mais baixa.

Em amostras de teste com concentrações excepcionalmente elevadas de RNA viral, a amplificação dos alvos virais pode atingir níveis detectáveis em um número de ciclo muito precoce (<9). Como parte dos cálculos de correção da linha de base, o software pode interpretar esses sinais de amplificação precoce como ruído de fundo e não atribuir um valor de C_q aos alvos virais nessas amostras.

Monitore a presença de tais amostras de teste visualizando os gráficos de amplificação sem correção de linha de base (defina **Baseline Setting** para **No Baseline Subtraction**). Se alguma das amostras de teste mostrar sinais de amplificação antes do ciclo 9, remova esses poços da análise na janela do editor da placa. Corra novamente a reação RT-qPCR para a amostra diluindo o ácido nucleico a 1:100 usando o tampão de eluição adequado.

Etapa 2. Avalie os valores dos limites

- 5 Verifique a seleção em **Settings > Baseline Setting** para certificar-se de que está definida para **Baseline Subtracted Curve Fit**.
- 6 Clique com o botão direito do mouse no gráfico de amplificação e selecione **Show Threshold Values** (se ainda não estiver selecionado).

A linha limite para cada alvo é exibida como uma linha horizontal.

- 7 Próximo ao canto inferior direito do gráfico de amplificação, selecione a caixa de seleção Log.

A visualização dos gráficos de amplificação em valores de log proporciona uma melhor visualização do ruído do sinal de fundo.

- 8 Defina o valor mínimo do eixo Y para 0,0.

a À direita do gráfico de amplificação, clique no ícone de configurações do gráfico. 

A caixa de diálogo Chart Settings se abre.

b Clique na aba Axes Scale.

c Desmarque a caixa de seleção Auto Scale.

d Na coluna **Min** para o **Y-Axis (log 10)**, digite **0.0**, como mostrado na **Figura 33**.

e Clique em **OK**.

A caixa de diálogo se fecha e a escala do eixo Y começa em 0,0, permitindo que o ruído do sinal nos gráficos seja exibido. Um exemplo é mostrado na **Figura 34**.

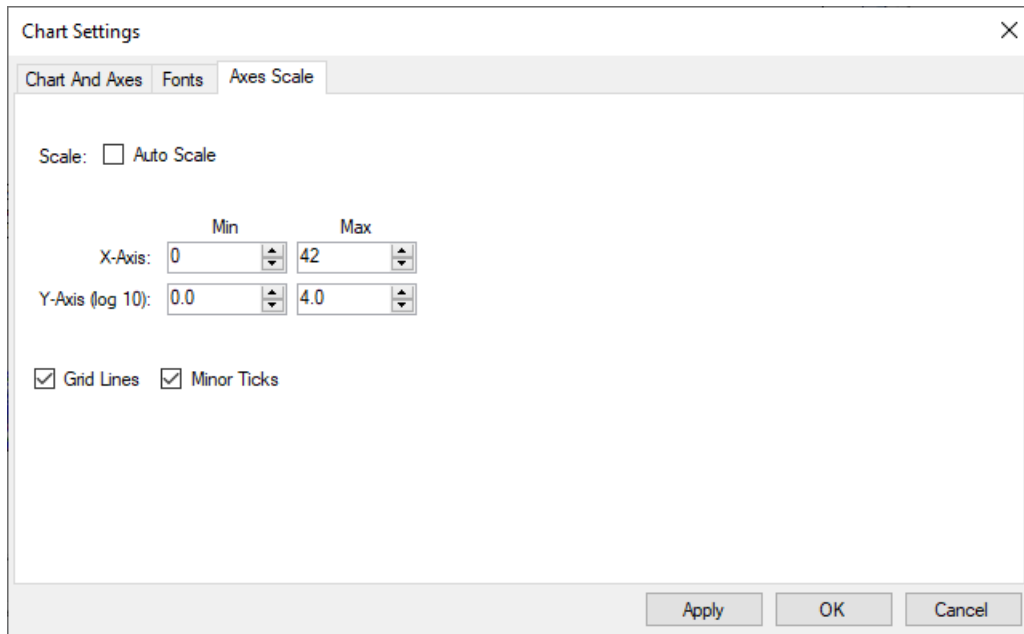


Figura 33 Caixa de diálogo Chart Settings do Maestro – aba Axes Scale

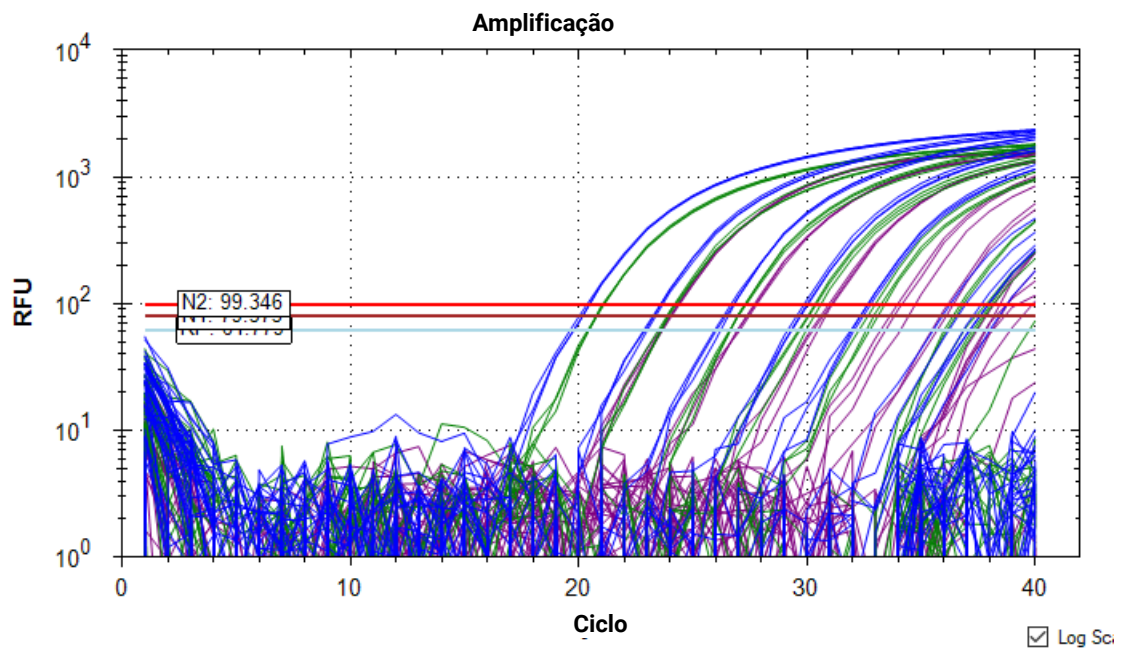


Figura 34 Gráfico de amplificação do Maestro em escala logarítmica – limites alvo exibidos como linhas horizontais

- 9 Avalie visualmente os gráficos de amplificação e o limite padrão para o alvo N1.
 - a Abaixo do gráfico de amplificação, utilize as caixas de seleção para selecionar apenas o alvo FAM (N1) para ser exibido.

- b) Determine se o limite é suficientemente alto para estar acima do ruído de fundo e suficientemente baixo para incluir os gráficos na fase de amplificação exponencial (consulte a **Figura 35**). Com base nesta determinação, prossiga como indicado na **Tabela 15**.

10 Repita a **etapa 11** para o alvo N2 e novamente para o alvo RP.

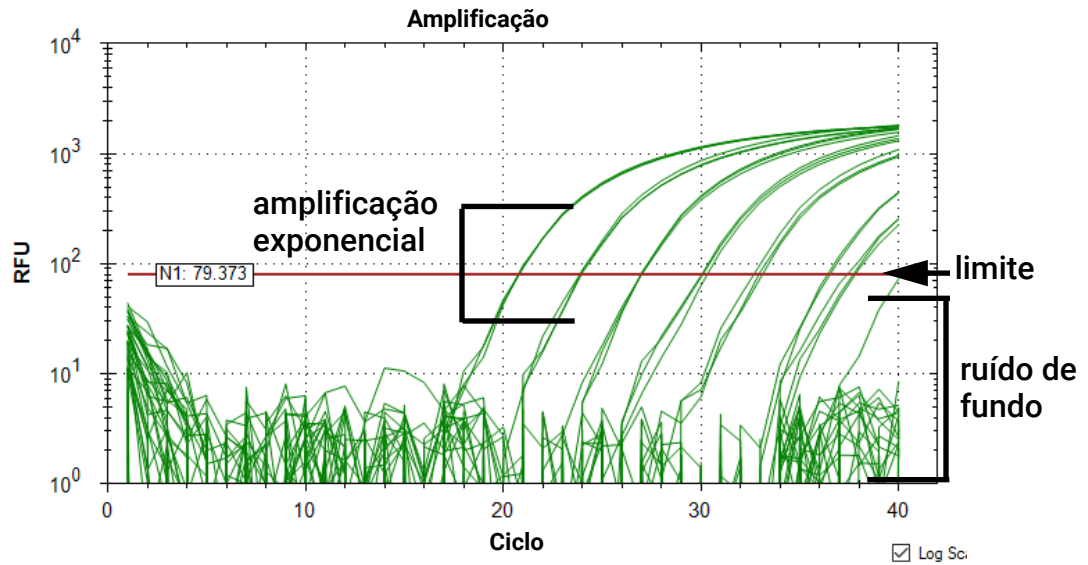


Figura 35 Gráfico de amplificação do Maestro para o alvo N1

Tabela 15 Verificação da configuração ideal do limite no software Design & Analysis

Posição do limite	Descrição	Ação
Posição ideal	Acima do ruído de fundo e inclui todos os gráficos na fase de amplificação exponencial	<ul style="list-style-type: none"> Deixe os limites nos seus valores atuais.
Muito alto	Alguns gráficos em fase de amplificação exponencial não ultrapassam o limite	<ul style="list-style-type: none"> Procure por poços com um ruído de fundo excepcionalmente alto. Esses poços discrepantes podem fazer com que o software defina o limite muito alto. Clique em Plate Setup > View/Edit Plate para abrir o editor da placa. Selecione o poço discrepante no mapa da placa. No painel, do lado direito do editor da placa, marque a caixa de seleção identificada como Exclude Wells in Analysis (localizada na parte inferior do painel). Clique em OK. Quando solicitado se deseja aplicar as alterações, clique em Yes. O software irá recalculer o limite assim que o poço discrepante for excluído. Como alternativa, use o mouse para arrastar manualmente a linha limite no gráfico para uma nova posição. No lado direito do gráfico de amplificação, clique no ícone do limite da linha de base para abrir a caixa de diálogo Baseline Threshold. Em Single Threshold, altere a seleção de Auto Calculated para User Defined. (Isto evita que o software recalcule o limite assim que o poço discrepante for incluído novamente.) Clique em OK para fechar a caixa de diálogo. Clique em Plate Setup > View/Edit Plate para abrir novamente o editor da placa. Selecione o poço discrepante e desmarque a caixa de seleção Exclude Wells in Analysis. Clique em OK e depois em Yes. No mapa da placa sob o gráfico de amplificação, selecione todos os poços para incluir novamente o poço discrepante na análise.* <p>* Se o gráfico de amplificação do poço discrepante não mostrar amplificação exponencial em nenhum número de ciclo, certifique-se de que o limite reduzido não faz com que o software atribua um valor de Cq ao poço (devido ao ruído do sinal de fundo atravessando o limite). Se isso acontecer, tente modificar outras configurações de análise para esse poço, por exemplo, ajustando o número de ciclos de Baseline Begin e/ou Baseline End.</p>
Muito baixo	Alguns gráficos não estão acima do ruído de fundo.	<ul style="list-style-type: none"> Aumente o limite para um pouco acima do nível do ruído de fundo.

Etapa 3. Verifique os resultados no poço NTC

11 Na tabela que exhibe os resultados, localize a reação do Controle negativo sem molde (NTC), localizada no poço A12.

12 Certifique-se de que a coluna Cq para os três alvos indique "N/A" ou tem um valor de Cq >37,00.

Se a reação do NTC tiver um valor de Cq ≤37,00 para qualquer um dos alvos, pode ter ocorrido contaminação da amostra. Invalide a corrida e repita o ensaio seguindo estritamente as diretrizes.

Exporte os dados a partir do software CFX Maestro

- 1 Na parte superior da janela de análise de dados, clique em **Export > Custom Export**.

A caixa de diálogo Custom Export se abre.

- 2 No campo Export Format, selecione um tipo de arquivo para os dados exportados, por exemplo, **Excel 2007 (*.xlsx)**.

Certifique-se de que o seu PC tem o software necessário para abrir o tipo de arquivo selecionado.

- 3 Na caixa de diálogo, marque as caixas de seleção como mostrado na **Figura 36**. Revise a seção Exported Columns para ter certeza de que ela lista **Well**, **Target Name**, **Sample Name** e **Cq**.

Custom Export

Export Format: Excel 2007 (*.xlsx)

Data to Export

Include Run Information Header

Sample Description

Well
 Fluorophore
 Target Name
 Content
 Replicate Number
 Sample Name
 Biological Group Name
 Well Note

Quantification

Cq
 Starting Quantity
 Cq Mean
 Cq Standard Deviation
 Quantity Standard Deviation

Melt Curve

Melt Temperature
 Melt Peak Height
 Melt Peak Begin Temperature
 Melt Peak End Temperature

End Point

End Point Call
 End RFU

Exported Columns

Well
Target Name
Sample Name
Cq

Customize Column Names...

Set as Default Configuration

Export

Close

Figura 36 Configurações de exportação de dados personalizadas para o aplicativo CFX Maestro

4 Clique em **Export**.

A caixa de diálogo Save As se abre.

5 Selecione uma pasta para o arquivo.

6 No campo File name, insira um nome para o arquivo ou utilize o padrão.

7 Clique em **Save**.

A caixa de diálogo se fecha e o programa exporta os dados para o tipo de arquivo selecionado e o salva na pasta designada.

8 Abra o arquivo e analise os dados Cq para cada uma das amostras de teste e controles para interpretar os resultados. Consulte o [Capítulo 6](#), "Análise e resultados".

6 Análise e resultados

Interpretação de resultados 69

O capítulo contém informações sobre a interpretação dos resultados do ensaio com base nos dados da RT-qPCR.

Interpretação de resultados

Resultados e interpretação para amostras de controle

Se algum dos controles não apresentar o desempenho esperado, conforme descrito na **Tabela 16**, então o ensaio pode ter sido configurado ou executado incorretamente ou pode ter ocorrido um defeito do reagente ou do equipamento. Nesse caso, invalide a corrida e repita o ensaio.

Controle negativo sem molde (NTC)

O NTC consiste em usar água livre de nucleases na reação RT-qPCR em vez de RNA. A reação do NTC não deve apresentar curvas de crescimento de fluorescência que cruzem a linha limite em 37,00 ciclos para qualquer um dos três alvos. Se a reação do NTC apresentar uma curva de crescimento com um Cq \leq 37,00, pode ter ocorrido contaminação da amostra. Invalide a corrida e repita o ensaio seguindo estritamente as diretrizes.

SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx

A reação RT-qPCR para o SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx produzirá um resultado positivo com os alvos 2019-nCoV_N1 e 2019-nCoV_N2 com um valor de Cq menor ou igual a 37,00, embora produza um resultado negativo (relatado como nenhum Cq detectado ou Cq $>$ 37,00) com o alvo do gene da RNase P humana.

Controle de amostra de humanos

O Controle de amostra de humanos consiste em células humanas não infecciosas e é usado como um controle do procedimento de extração de RNA para demonstrar a integridade do reagente de extração e extração bem-sucedida do RNA. A reação RT-qPCR para o RNA extraído do Controle de amostra de humanos deve produzir um resultado positivo com o alvo RP com um valor de Cq menor ou igual a 37,00. Os alvos N1 e N2 SARS-CoV-2 devem produzir resultados negativos (relatados como sem Cq detectado ou Cq $>$ 37,00).

Tabela 16 Desempenho esperado dos controles

Tipo de controle	Nome do controle	Usado para monitorar	Resultado para o alvo N1	Resultado para o alvo N2	Resultado para o alvo RP
Positivo	SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Falha substancial do reagente incluindo integridade do primer e da probe	Positivo (Cq \leq 37,00)	Positivo (Cq \leq 37,00)	Negativo (Nenhum Cq detectado ou Cq $>$ 37,00)
Negativo	NTC	Contaminação do reagente e/ou ambiental	Negativo (Nenhum Cq detectado ou Cq $>$ 37,00)	Negativo (Nenhum Cq detectado ou Cq $>$ 37,00)	Negativo (Nenhum Cq detectado ou Cq $>$ 37,00)
Extração	Controle de amostra de humanos	Falha no procedimento de lise e extração, potencial contaminação durante a extração	Negativo (Nenhum Cq detectado ou Cq $>$ 37,00)	Negativo (Nenhum Cq detectado ou Cq $>$ 37,00)	Positivo (Cq \leq 37,00)

Resultados e interpretação para amostras clínicas

A **Tabela 17** lista os resultados esperados para o ensaio. Se um laboratório obtiver resultados inesperados para os controles do ensaio ou se forem obtidos resultados inconclusivos ou inválidos e não puderem ser resolvidos por meio do novo teste recomendado, entre em contato com o CDC para consulta e possível encaminhamento de amostra.

Alvo do gene da RNase P (RP) humana

Todas as amostras clínicas devem exibir curvas de crescimento de fluorescência para o alvo RP que cruzam a linha limite em 37,00 ciclos ($Cq \leq 37,00$), indicando assim a presença do gene da RNase P humana. Não detectar o alvo RP em qualquer amostra clínica pode indicar:

- Extração inadequada de ácido nucleico de materiais clínicos, resultando em perda de RNA e/ou degradação de RNA ou transporte de substâncias inibidoras.
- Ausência de material celular humano suficiente devido à coleta inadequada ou perda da integridade da amostra.
- Configuração e execução inadequadas do ensaio.
- Defeito do reagente ou equipamento.

Se o ensaio RP não produzir um resultado positivo para amostras clínicas humanas, interprete conforme segue:

- Se os alvos N1 e N2 forem positivos ($Cq \leq 37,00$), mesmo na ausência de um RP positivo, o resultado deve ser considerado válido. É possível que algumas amostras não exibam curvas de crescimento de RNase P devido ao baixo número de células na amostra clínica original ou devido aos alvos virais que reduzem a eficiência da amplificação de RP, especialmente em amostras com alta carga viral. Um sinal RP negativo não exclui a presença de RNA do vírus SARS-CoV-2 em uma amostra clínica.
- Se o alvo RP for negativo (nenhum Cq detectado ou $Cq > 37,00$) enquanto um ou ambos os alvos N1 e N2 forem negativos (nenhum Cq detectado ou $Cq > 37,00$), o resultado deve ser considerado inválido para a amostra. Se houver amostra residual disponível, repita o procedimento de extração e repita o teste. Se todos os alvos permanecerem negativos após o novo teste, relate os resultados como inválidos e uma nova amostra deve ser coletada, se possível.

Alvos 2019-nCoV_N1 e 2019-nCoV_N2

- Quando todos os controles apresentam o desempenho esperado, uma amostra é considerada **positiva** para SARS-CoV-2 se a seguinte condição for atendida.
 - As curvas de crescimento para ambos os alvos N1 e N2 cruzam a linha limite em 37,00 ciclos ($Cq \leq 37,00$). O alvo RP pode ou não ser positivo (consulte a descrição acima), mas o resultado para SARS-CoV-2 ainda é válido.
- Quando todos os controles apresentam o desempenho esperado, uma amostra é considerada **negativa** para SARS-CoV-2 se AMBAS as condições a seguir forem atendidas.
 - As curvas de crescimento para os alvos N1 e N2 NÃO cruzam a linha limite em 37,00 ciclos (nenhum Cq detectado ou $Cq > 37,00$).
 - A curva de crescimento para o alvo RP CRUZA a linha limite em 37,00 ciclos ($Cq \leq 37,00$).

- Quando todos os controles apresentam o desempenho esperado, uma amostra é considerada **inconclusiva** para SARS-CoV-2 se QUALQUER UMA das condições a seguir for atendida.
 - A curva de crescimento para um dos alvos 2019-nCoV cruza a linha limite em 37,00 ciclos ($Cq \leq 37,00$), enquanto a curva de crescimento para o outro alvo 2019-nCoV não cruza a linha limite em 37,00 ciclos (nenhum Cq detectado ou $Cq > 37,00$). A curva de crescimento para o alvo RP cruza a linha limite em 37,00 ciclos ($Cq \leq 37,00$).

Para amostras inconclusivas, o RNA extraído da amostra deve ser testado novamente. Se o RNA residual não estiver disponível, extraia novamente o RNA da amostra residual e teste novamente. Se for obtido o mesmo resultado, relate o resultado inconclusivo.

- Se o Controle de amostra de humanos for positivo para N1 ou N2 ($Cq \leq 37,00$), pode ter ocorrido contaminação durante a extração ou processamento da amostra. Invalide todos os resultados para as amostras extraídas juntamente com o Controle de amostra de humanos. Extraia as amostras e o Controle de amostra de humanos novamente e repita o teste.

Tabela 17 Resultados esperados para o ensaio SARS-CoV-2 qRT-PCR

2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	Gene da RNase P humana	Interpretação dos resultados*	Relatório	Ações
Positivo ($Cq \leq 37,00$)	Positivo ($Cq \leq 37,00$)	Positivo OU Negativo	SARS-CoV-2 detectado	Positivo para SARS-CoV-2	Relate os resultados ao CDC e ao remetente
Negativo (Nenhum Cq detectado ou $Cq > 37,00$)	Negativo (Nenhum Cq detectado ou $Cq > 37,00$)	Positivo ($Cq \leq 37,00$)	SARS-CoV-2 não detectado	Não detectado	Relate os resultados ao remetente. Considere testar outros vírus respiratórios. [†]
Positivo ($Cq \leq 37,00$)	Negativo (Nenhum Cq detectado ou $Cq > 37,00$)	Positivo ($Cq \leq 37,00$)	Resultado inconclusivo	Inconclusivo	Repita o teste da amostra extraída e/ou repita a extração e a RT-qPCR.
Negativo (Nenhum Cq detectado ou $Cq > 37,00$)	Positivo ($Cq \leq 37,00$)	Positivo ($Cq \leq 37,00$)	Resultado inconclusivo	Inconclusivo	Repita o teste da amostra extraída e/ou repita a extração e a RT-qPCR.
Se um ou ambos os alvos 2019-nCoV forem negativos (nenhum Cq detectado ou $Cq > 37,00$)		Negativo (Nenhum Cq detectado ou $Cq > 37,00$)	Resultado inválido	Inválido	Repita a extração e a RT-qPCR. Se o resultado da repetição do teste permanecer inválido, considere coletar uma nova amostra do paciente.

* Os laboratórios devem relatar seu resultado diagnóstico conforme adequado, e de acordo com seu sistema de notificação específico.

[†] Os tipos de amostras ideais e o tempo para o pico dos níveis virais durante as infecções causadas por 2019-nCoV não foram determinados. Pode ser necessário coletar várias amostras do mesmo paciente para detectar o vírus. A possibilidade de um resultado falso negativo deve ser considerada, especialmente se as exposições recentes do paciente ou apresentação clínica sugerirem que é possível a infecção pelo 2019-nCoV, e os testes de diagnóstico para outras causas de doença (por exemplo, outras doenças respiratórias) forem negativos. Se ainda houver suspeita de infecção pelo 2019-nCoV, um novo teste deve ser considerado em consulta com as autoridades de saúde pública.

7 Controle de qualidade

Controle de qualidade **73**

Este capítulo contém informações sobre as medidas de controle de qualidade para o ensaio.

Controle de qualidade

- Os requisitos de controle de qualidade devem ser cumpridos em conformidade com os regulamentos municipais, estaduais e federais ou requisitos de credenciamento, e os procedimentos de controle de qualidade standard do laboratório do usuário.
- Os procedimentos de controle de qualidade se destinam a monitorar o desempenho do reagente e do ensaio.
- Teste todos os controles positivos antes de analisar amostras diagnósticas com cada novo lote do kit para assegurar que todos os reagentes e componentes do kit estão funcionando corretamente.
- As boas práticas de laboratório (BPL) recomendam incluir um controle positivo de extração em cada lote de isolamento de ácido nucleico.
- O Controle de amostra de humanos **deve** prosseguir com a extração de ácido nucleico com cada lote de amostras a serem testadas.
- **Sempre** inclua um Controle negativo sem molde (NTC) e o Controle positivo de RNA de SARS-CoV-2 sintético em cada amplificação e corrida de detecção.
- O conjunto de probe/primer para o gene da RNase P humana (incluído no 10 × SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix) controla a qualidade e extração da amostra.

8 Limitações do ensaio

Limitações 75

Este capítulo descreve as limitações do ensaio realizado com o Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

Limitações

- 1** O uso deste ensaio é limitado a técnicos de laboratório treinados para o procedimento. O não cumprimento destas instruções pode resultar em resultados incorretos.
- 2** Resultados confiáveis dependem da coleta, transporte, armazenamento e processamento adequados da amostra.
- 3** Evite contaminação aderindo às boas práticas de laboratório e aos procedimentos especificados nestas instruções de uso.
- 4** Resultados negativos não excluem infecções por SARS-CoV-2 e não devem ser usados como único embasamento para tratamento ou outras decisões de controle.
- 5** Um resultado positivo indica a detecção de ácido nucleico do vírus relevante. O ácido nucleico pode persistir mesmo depois que o vírus não é mais viável.
- 6** O desempenho do ensaio Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit foi estabelecido usando o tipo de amostra de swab nasofaríngeo coletada em meio de transporte UTM ou VCM. Os swabs orofaríngeos, swabs nasais e swabs da concha nasal média são considerados tipos de amostras aceitáveis para uso com o ensaio Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, mas o desempenho com esses tipos de amostras não foi estabelecido. Os testes com swabs orofaríngeos, swabs nasais e swabs da concha nasal média (autocoletados sob a supervisão de, ou coletados por, um profissional de saúde) são limitados a pacientes com sintomas de COVID-19.
- 7** O Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit não inclui uma amostra para uso como o Controle de amostra de humanos. A amostra usada como este controle deve ser validada pelo laboratório.

9

Características de desempenho

Características de desempenho 77

Este capítulo contém as características de desempenho do Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Características de desempenho

Os dados a seguir demonstram as características de desempenho do Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit. Todas as extrações de amostras usaram os volumes de entrada de amostra e os volumes de eluição recomendados na seção "Extração de ácidos nucleicos" na **página 19**.

Sensibilidade analítica (Limite de detecção)

A Agilent Condensed TTuziu um estudo de Limite de detecção (LoD) para estabelecer a menor concentração viral de SARS-CoV-2 (expressa como o número de cópias do genoma viral) que pode ser detectada pelo Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit em pelo menos 95% das vezes com cada um dos procedimentos de extração de ácido nucleico compatíveis em cada um dos três sistemas de PCR em tempo real compatíveis.

Os painéis das amostras de teste do LoD foram preparados de forma artificial diluindo um padrão de SARS-CoV-2 quantificado e disponível comercialmente com um pool de amostras clínicas negativas (matriz negativa) para atingir uma série de concentrações alvo de SARS-CoV-2 desejadas. Todas as amostras clínicas eram swabs nasofaríngeos previamente testados para SARS-CoV-2 pelo fornecedor usando um teste para SARS-CoV-2 com autorização de uso emergencial e posteriormente confirmadas pela Agilent.

O teste preliminar de LoD do ensaio completo usou uma faixa de concentrações virais com três replicatas por concentração. A faixa de concentração no teste preliminar testou concentrações de 0,75 a 3 cópias/ μ l. Os resultados do teste preliminar indicaram que o LoD final provavelmente se enquadraria nessa faixa e variaria dependendo do método de extração e do sistema de PCR em tempo real.

O teste de confirmação de LoD final do ensaio completo foi conduzido em três níveis de entrada alvo: 0,75, 1 e 1,5 cópias/ μ l. Em cada um dos três níveis de entrada alvo, 20 replicatas de extração individuais foram testadas em todas as combinações possíveis de método de extração/sistema de PCR em tempo real. A **Tabela 18** mostra as taxas de detecção positiva a partir desse teste. Uma taxa de detecção de 20/20 indica que todas as 20 replicatas de extração foram detectáveis com aquela combinação particular de método de extração e sistema de PCR em tempo real.

Tabela 18 Confirmação do limite de detecção final – taxas de detecção positivas* com cada método de extração de ácido nucleico em cada sistema de PCR em tempo real (Agilent AriaMx, ABI 7500 e Bio-Rad CFX96)

Nível de entrada do alvo viral SARS-CoV-2 antes da extração (cópias/ μ l)	QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit com QIASymphony (extração automatizada)			MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit com KingFisher Flex (extração automatizada)		
	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)

* As taxas de detecção são expressas como o número de replicatas positivas em relação ao número total de replicatas positivas e negativas. Os números entre parênteses, quando presentes, indicam o número de replicatas inconclusivas. Nesses casos, o número total de replicatas positivas e negativas é inferior a 20.

A **Tabela 19** resume os valores de LoD finais para cada combinação de método de extração/sistema de PCR em tempo real. Esses valores representam o número de cópias virais por μl de extrato de ácido nucleico que pode ser detectado pelo Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit em pelo menos 95% das vezes.

Tabela 19 Resumo do limite de detecção final – LoD para cada método de extração de ácido nucleico em cada sistema de PCR em tempo real (Agilent AriaMx, ABI 7500 e Bio-Rad CFX96)

Método de extração de ácido nucleico	Limite de detecção do ensaio completo (cópias/ μl)		
	AriaMx	7500	CFX96
QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit com QIASymphony (extração automatizada)	1,5	1	1,5
MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit com KingFisher Flex (extração automatizada)	1	1,5	1,5

Especificidade analítica

No Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, as sequências dos primers e sondas de oligonucleotídeos para os alvos virais N1 e N2 e o gene da RNase P humana são idênticas em sequência àsquelas usadas no CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel (Painel de diagnóstico de RT-PCR em tempo real para o novo Coronavírus 2019 [2019-nCoV] do CDC), apenas para uso emergencial. A especificidade deste painel foi anteriormente estabelecida.

Reatividade cruzada

No Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit, as sequências dos primers e sondas de oligonucleotídeos para os alvos virais N1 e N2 e o gene da RNase P humana são idênticas em sequência àsquelas usadas no CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel (Painel de diagnóstico de RT-PCR em tempo real para o novo Coronavírus 2019 [2019-nCoV] do CDC), apenas para uso emergencial. A reatividade cruzada deste painel foi anteriormente estabelecida.

Avaliação clínica

Um estudo de avaliação clínica foi realizado com o Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit usando amostras de swab nasofaríngeo (NP) de humanos. Para cada condição de teste, foram testadas 80 amostras no total: 40 amostras NP negativas e 40 amostras NP positivas. O status positivo ou negativo de cada amostra foi confirmado por um ensaio de RT-qPCR para SARS-CoV-2 com Autorização de uso emergencial (EUA). O objetivo da avaliação clínica era verificar a concordância clínica (positiva/negativa) dos resultados dos testes obtidos com o Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit àqueles obtidos com o ensaio comparador de RT-qPCR para SARS-CoV-2 com EUA.

A extração de ácido nucleico foi realizada em cada amostra usando ambas as plataformas de extração automatizadas compatíveis (QIAGEN QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit com o QIAAsymphony SP e o Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit com o KingFisher Flex Purification System) usando o protocolo do fabricante e as recomendações fornecidas nestas instruções de uso. Cada amostra extraída foi então testada em todos os três sistemas de PCR em tempo real compatíveis (Agilent AriaMx, ABI 7500 e Bio-Rad CFX96), conforme descrito nestas instruções de uso. Assim, cada amostra foi testada em seis (6) condições diferentes neste estudo. Como critério de aceitação, era necessário um mínimo de 95% de concordância positiva e negativa entre o Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit e o ensaio comparador. Os resultados da concordância estão resumidos na **Tabela 20**.

Tabela 20 Concordância percentual positiva (PPA), concordância percentual negativa (NPA) e concordância geral (OA) entre o Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit e o ensaio comparador de RT-qPCR para SARS-CoV-2 com EUA

Plataforma de extração:	QIAAsymphony	QIAAsymphony	QIAAsymphony	KingFisher	KingFisher	KingFisher
Sistema de PCR em tempo real:	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

Referência

Rótulos do produto **81**

Este capítulo contém cópias dos rótulos do produto para o Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Rótulos do produto

The label for the Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents kit includes the following information:

- Agilent** logo and name.
- CE mark, IVD (In Vitro Diagnostic) symbol, and a book icon.
- Website: agilent.com/chem/sars-cov-2-qpcr-dx-kit
- Phone number: +44 161 492 7054
- Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents**
- Reference (REF): K1180-64100
- Lot (LOT): ABC123
- Expiration date: 2022-04-29
- Storage temperature: -15°C and -25°C (indicated with a thermometer icon).
- Quantity: 400 (indicated with a triangle containing the Greek letter sigma).
- Manufacturer information: Agilent Technologies, Inc., 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, USA. Manufactured at: 1834 State Hwy 71 W, Cedar Creek, TX 78612, USA. Website: www.agilent.com
- EC REP: Agilent Technologies Denmark ApS, Produktionsvej 42, 2600 Glostrup, Denmark.
- Barcode.
- UDI (Unique Device Identifier): (01) 0 5700574 03375 0 (10) ABC123 (17) 220429

Figura 37 Rótulo da caixa para K1180-64100

The label for the 2X Brilliant III qRT-PCR Master Mix Dx includes the following information:

- 2X Brilliant III**
- CE mark, IVD (In Vitro Diagnostic) symbol.
- qRT-PCR Master Mix Dx**
- Reference (REF): 5191-6866
- Lot (LOT): ABC123
- Quantity: 2 ml
- Expiration date: 2020-12-31
- Storage temperature: -15°C and -25°C (indicated with a thermometer icon).

Figura 38 Rótulo do frasco para 5191-6866

The label for the RT/RNase Block Dx includes the following information:

- RT/RNase Block Dx**
- CE mark, IVD (In Vitro Diagnostic) symbol.
- Reference (REF): 5191-6870
- Lot (LOT): ABC123
- Quantity: 400 µl
- Expiration date: 2020-12-31
- Storage temperature: -15°C and -25°C (indicated with a thermometer icon).

Figura 39 Rótulo do tubo para 5191-6870

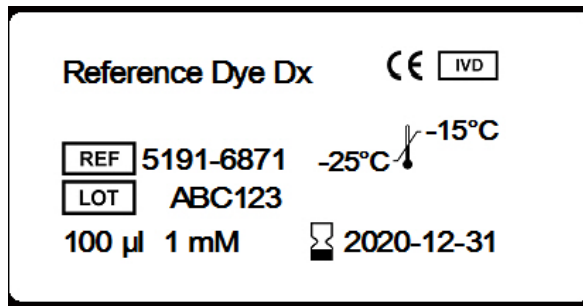


Figura 40 Rótulo do tubo para 5191-6871

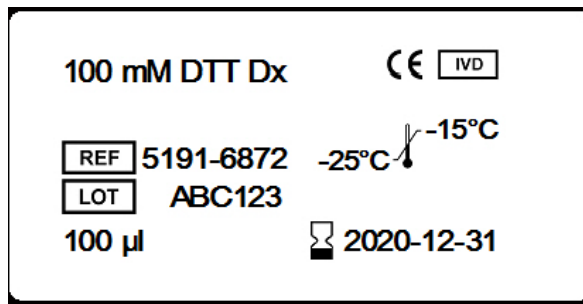


Figura 41 Rótulo do tubo para 5191-6872

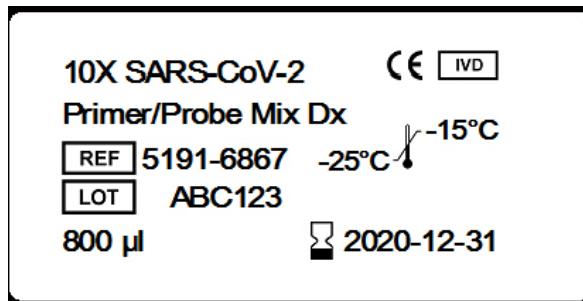


Figura 42 Rótulo do tubo para 5191-6867

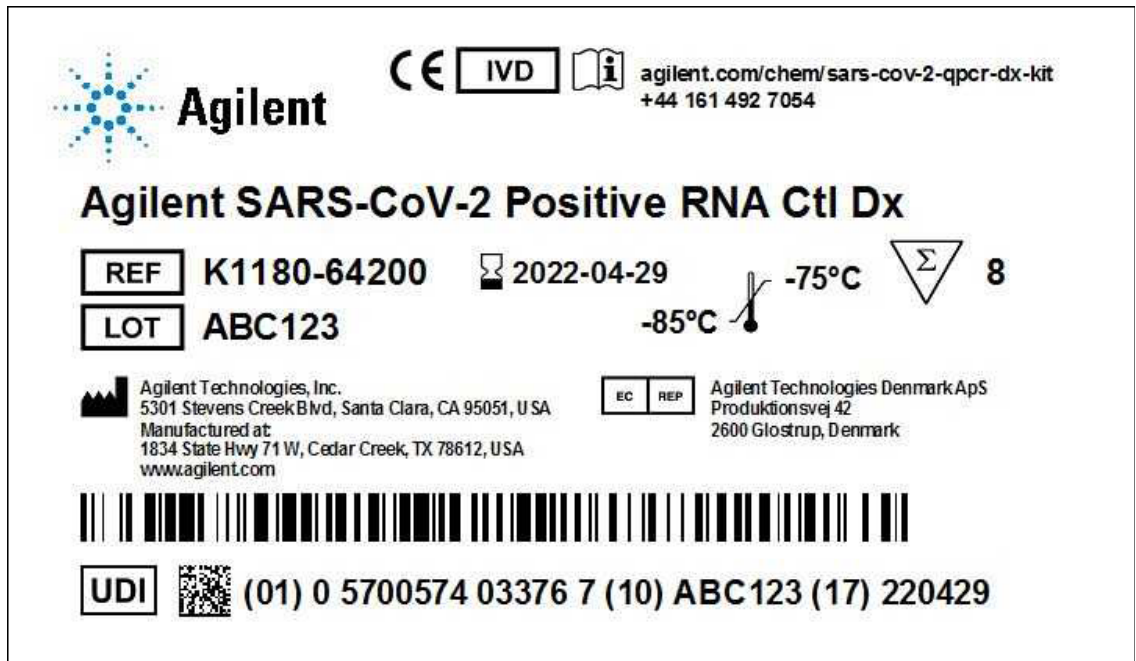


Figura 43 Rótulo da caixa para K1180-64200

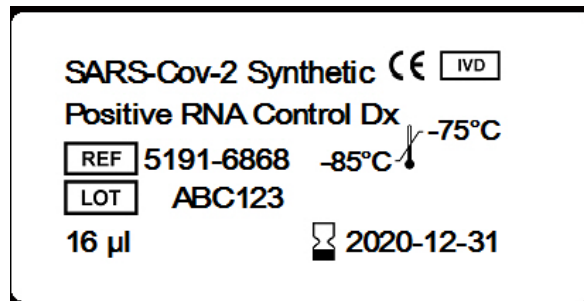


Figura 44 Rótulo do tubo para 5191-6868

Fabricado por



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

Representante autorizado da União Europeia



Agilent Technologies Denmark ApS
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, Denmark

Suporte técnico da Agilent

Visite www.agilent.com/en/contact-us/page para encontrar os números de telefone específicos para cada país
ou envie um e-mail para covid.support@agilent.com

© Agilent Technologies, Inc. 2021–2022

Nenhuma parte deste manual pode ser reproduzida sob qualquer forma ou por qualquer meio (incluindo armazenamento eletrônico e recuperação ou tradução para um idioma estrangeiro) sem autorização prévia e consentimento por escrito da Agilent Technologies, Inc., conforme regido pelas leis de direitos autorais dos Estados Unidos e internacionais.

© Agilent Technologies, Inc. 2021–
2022

Revisão B2, Maio de 2022

