

Fevereiro de 2022

Manual do utilizador CE do Rotor-Gene[®] Q MDx



IVD

CE

REF

9002022, 9002032, 9002042



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R1

Índice

1	Introdução.....	8
1.1	Acerca deste manual do utilizador	8
1.2	Informações gerais	9
1.2.1	Assistência técnica.....	9
1.2.2	Declaração de política.....	9
1.2.3	Gestão da versão.....	10
1.3	Utilização prevista do Rotor-Gene Q MDx.....	10
1.3.1	Requisitos do Rotor-Gene Q MDx	10
1.4	Materiais necessários.....	11
1.5	Materiais necessários, mas não fornecidos.....	11
2	Informações de segurança	12
2.1	Utilização adequada	13
2.2	Segurança elétrica.....	15
2.3	Segurança biológica	16
2.4	Segurança química.....	17
2.5	Eliminação de resíduos	18
2.6	Riscos mecânicos.....	18
2.7	Segurança durante a manutenção	20
2.8	Símbolos no Rotor-Gene Q MDx	21
3	Descrição geral	22
3.1	Princípio do Rotor-Gene Q MDx.....	22
3.1.1	Desempenho térmico.....	22
3.1.2	Sistema ótico	23
3.1.3	Canais disponíveis	24
3.2	Características externas do Rotor-Gene Q MDx	25
3.2.1	Orifícios de ventilação na tampa	25
3.2.2	Pega da tampa	25
3.2.3	Câmara do rotor	25
3.2.4	Luzes de estado do instrumento.....	25

3.3	Características internas do Rotor-Gene Q MDx	26
3.3.1	Cubo do rotor	26
3.3.2	Lente ótica	26
	Lente ótica onde a luz do díodo de excitação é focada nos tubos.	26
4	Procedimentos de instalação	27
4.1	Fornecimento e instalação do sistema	27
4.1.1	Desembalar o Rotor-Gene Q MDx	27
4.1.2	Instalação do hardware	28
4.1.3	Instalação do software	29
4.1.4	Versão do software.....	32
4.1.5	Software adicional em computadores ligados a instrumentos Rotor-Gene Q MDx	32
4.2	Requisitos relativamente ao local.....	39
4.3	Ligação à alimentação de CA.....	40
4.3.1	Requisitos de alimentação	40
4.3.2	Requisitos de ligação à terra	40
4.3.3	Instalação do cabo de alimentação de CA.....	40
4.4	Configuração da segurança do Windows.....	40
4.5	Requisitos da estação de trabalho	42
4.6	Desembalagem e instalação do Rotor-Gene Q MDx.....	43
4.6.1	Atualização do software	44
4.7	Acessórios	44
4.8	Reembalagem e transporte do Rotor-Gene Q MDx	44
4.9	Preparação.....	44
4.9.1	Ligar o Rotor-Gene Q MDx e a estação de trabalho	44
5	Procedimentos operacionais.....	45
5.1	Utilização do software Rotor-Gene Q MDx.....	45
5.1.1	Assistente Quick Start (Instalação rápida).....	45
5.1.2	Assistente Advanced (Avançado).....	49
5.2	Utilização do hardware do Rotor-Gene Q MDx	67
5.2.1	Tipos de rotor	67

5.2.2	Configuração da reação.....	70
5.2.3	Configuração do Rotor-Disc.....	73
6	Interface gráfica do utilizador.....	77
6.1	Espaço de trabalho.....	77
6.2	Barra de ferramentas.....	77
6.3	Visualizar canais não processados.....	77
6.4	Alternar entre amostras.....	78
6.5	Menu de ficheiros.....	80
6.5.1	Novo.....	80
6.5.2	Abrir e guardar.....	81
6.5.3	Relatórios.....	82
6.5.4	Configuração.....	83
6.6	Menu de análise.....	83
6.6.1	Análise.....	83
6.6.2	Quantificação.....	85
6.6.3	Duas curvas-padrão.....	96
6.6.4	Quantificação relativa de delta delta C _T	100
6.6.5	Análise da curva de fusão.....	103
6.6.6	Quantificação comparativa.....	106
6.6.7	Discriminação alélica.....	108
6.6.8	Análise do gráfico de dispersão.....	110
6.6.9	Análise do ponto final.....	111
6.6.10	Análise da concentração.....	118
6.6.11	Análise de fusão de alta resolução.....	121
6.7	Menu de execução.....	122
6.7.1	Iniciar execução.....	122
6.7.2	Colocar a execução em pausa.....	122
6.7.3	Parar a execução.....	123
6.8	Menu de visualização.....	123
6.8.1	Definições de execução.....	123
6.8.2	Gráfico de temperatura.....	126

6.8.3	Progresso do perfil.....	127
6.8.4	Editar amostras	128
6.8.5	Opções de apresentação	133
6.9	Proteção de acesso ao software Rotor-Gene Q	134
6.9.1	Configuração do Windows 7	135
6.9.2	Configuração do Windows 10	141
6.9.3	Executar vários utilizadores no mesmo computador	143
6.9.4	Pistas de auditoria	144
6.9.5	Assinaturas de execução	146
6.9.6	Bloqueio das amostras	147
6.9.7	Modelos bloqueados	149
6.10	Menu de ganho	149
6.11	Menu de janelas	150
6.12	Função de ajuda	150
6.12.1	Enviar e-mail de assistência	151
7	Funções adicionais.....	155
7.1	Modelos de análise	155
7.2	Abrir uma segunda execução	155
7.3	Opções de escala	155
7.4	Exportar gráficos.....	156
7.5	Ícone da chave inglesa	159
7.6	Opções das áreas selecionadas.....	160
8	Manutenção	161
8.1	Limpar a superfície do Rotor-Gene Q MDx	161
8.2	Descontaminar a superfície do Rotor-Gene Q MDx.....	162
8.3	Reparação do Rotor-Gene Q	162
9	Verificação ótica de temperatura	163
9.1	Princípio da OTV.....	163
9.2	Componentes do Rotor-Disc OTV Kit.....	163
9.3	Executar uma OTV.....	164
10	Análise de fusão de alta resolução.....	167

10.1	Instrumentação	168
10.2	Químicos.....	169
10.3	Exemplo de genotipagem de SNP	169
10.4	Exemplo de análise de metilação	171
10.5	Diretrizes para uma análise de HRM bem-sucedida.....	172
10.6	Preparação da amostra.....	174
10.7	Configuração do software	174
10.8	Análise de dados de real-time PCR	180
10.9	Análise de dados de HRM.....	181
11	Resolução de problemas	185
11.1	Arquivos de registo.....	186
11.2	Erros de hardware e software	186
11.2.1	Resolução de problemas de HRM.....	186
11.3	Mensagens de erro e de aviso	187
11.3.1	Erros gerais do instrumento.....	187
11.3.2	Mensagens do software Rotor-Gene Q.....	190
12	Glossário	195
13	Especificações técnicas.....	196
13.1	Condições ambientais – Condições de funcionamento.....	196
13.2	Condições de transporte	196
13.3	Condições de armazenamento.....	196
13.4	Dados mecânicos e características do hardware.....	196
13.5	Especificações (hardware e software)	197
13.5.1	Especificações térmicas	197
13.5.2	Especificações óticas	197
14	Apêndice A – Aspectos legais.....	198
14.1	Declaração FCC	198
14.2	Conformidade com a norma IEC EN 61326	199
14.3	Declaração de conformidade.....	200
14.4	Resíduos de equipamentos elétricos e eletrônicos (REEE)	201
14.5	Cláusula de responsabilidade.....	202

14.6	Contrato de licença do software.....	203
15	Apêndice B – Técnicas matemáticas.....	206
15.1	Quantificação.....	206
15.1.1	Intervalos de confiança para as concentrações calculadas.....	206
15.1.2	Intervalos de confiança para os valores de CT.....	207
16	Informações de encomenda.....	208
16.1	Produtos, acessórios e consumíveis do Rotor-Gene Q MDx.....	208
17	Histórico de revisões do documento.....	211

1 Introdução

Obrigado por ter escolhido o Rotor-Gene Q MDx. Temos a certeza de que este instrumento se tornará parte integrante do laboratório onde trabalha.

Antes de utilizar o Rotor-Gene Q MDx, é essencial ler atentamente este manual do utilizador e prestar especial atenção às informações de segurança. As instruções e informações de segurança no manual do utilizador devem ser seguidas para garantir o funcionamento seguro do instrumento e para manter o instrumento em condições seguras.

Tenha em atenção que o Rotor-Gene Q MDx existe em várias configurações. Para obter mais detalhes, incluindo informações de encomenda, consulte a secção 1.6.

1.1 Acerca deste manual do utilizador

Este manual do utilizador fornece informações sobre o Rotor-Gene Q MDx nas seguintes secções:

- Introdução
- Informações de segurança
- Descrição geral
- Procedimentos de instalação
- Procedimentos operacionais
- Manutenção
- Resolução de problemas
- Especificações técnicas
- Anexos

Os anexos incluem as seguintes informações:

- Apêndice A – Aspectos legais
- Apêndice B – Técnicas matemáticas

1.2 Informações gerais

1.2.1 Assistência técnica

Na QIAGEN®, orgulhamo-nos da qualidade e da disponibilidade da nossa assistência técnica. Os nossos Departamentos de Serviços de Assistência são compostos por cientistas experientes com conhecimentos práticos e teóricos abrangentes em biologia molecular e utilização dos produtos QIAGEN. Em caso de dúvidas ou de quaisquer dificuldades em relação ao Rotor-Gene Q MDx ou aos produtos QIAGEN de um modo geral, não hesite em contactar-nos.

Os clientes da QIAGEN são a principal fonte de informação no que diz respeito às utilizações avançadas ou especializadas dos nossos produtos. Estas informações são úteis a outros cientistas, assim como aos investigadores da QIAGEN. Por conseguinte, incentivamo-lo a contactar-nos, caso tenha alguma sugestão acerca do desempenho dos produtos ou de novas aplicações e técnicas.

Para obter ajuda, contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN.

Para obter informações atualizadas sobre o Rotor-Gene Q MDx, visite o site <https://www.qiagen.com/products/instruments-and-automation/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/>.

Site: support.qiagen.com

Quando contactar os Serviços de Assistência da QIAGEN acerca de um erro, tenha à mão as seguintes informações:

- Número de série, tipo e versão do Rotor-Gene Q MDx
- Código de erro (se aplicável)
- Dia e hora da primeira ocorrência do erro
- Frequência da ocorrência do erro (ou seja, erro intermitente ou persistente)
- Cópia dos ficheiros de registo

1.2.2 Declaração de política

Faz parte da política da QIAGEN melhorar os produtos à medida que vão sendo disponibilizados novos componentes e técnicas. A QIAGEN reserva-se o direito de alterar as especificações em qualquer altura. Num esforço de produzir documentação útil e adequada, agradecemos que nos enviasse os seus comentários acerca deste manual do utilizador. Contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN.

1.2.3 Gestão da versão

Este documento corresponde à revisão R1 do *Manual do utilizador do Rotor-Gene Q MDx* para os instrumentos Rotor-Gene Q MDx que utilizam o software Rotor-Gene Q, versão 2.3.x (em que $x \geq 0$).

1.3 Utilização prevista do Rotor-Gene Q MDx

O instrumento Rotor-Gene Q MDx foi concebido para a realização de termociclagem em tempo real, deteção e/ou quantificação utilizando a reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) em aplicações clínicas.

O Rotor-Gene Q MDx destina-se a ser utilizado apenas em conjunto com os kits QIAGEN indicados para utilização com os instrumentos Rotor-Gene Q para as aplicações descritas nos respetivos manuais dos kits QIAGEN.

Se o instrumento Rotor-Gene Q MDx for utilizado com outros kits que não os da QIAGEN, é da responsabilidade do utilizador validar o desempenho dessa combinação de produtos para qualquer aplicação específica.

O instrumento Rotor-Gene Q MDx destina-se a ser utilizado em diagnóstico in vitro.

O instrumento Rotor-Gene Q MDx destina-se a ser utilizado por profissionais, tais como técnicos e médicos formados em técnicas de biologia molecular e na utilização do Rotor-Gene Q MDx.

1.3.1 Requisitos do Rotor-Gene Q MDx

A tabela seguinte abrange o nível geral de competência e conhecimentos necessários para o transporte, a instalação, utilização, manutenção e assistência técnica do Rotor-Gene Q MDx.

Tarefa	Pessoal	Formação e experiência
Entrega	Sem requisitos especiais	Sem requisitos especiais
Instalação	Técnicos de laboratório ou equivalente	Pessoal com formação e experiência adequadas, familiarizado com a utilização de computadores e automatização em geral
Utilização de rotina (execução de protocolos)	Técnicos de laboratório ou equivalente	Utilizadores profissionais com formação em técnicas de biologia molecular, tais como técnicos ou médicos
Manutenção de rotina	Técnicos de laboratório ou equivalente	Utilizadores profissionais com formação em técnicas de biologia molecular, tais como técnicos ou médicos
Assistência técnica e manutenção anual	Apenas especialistas de Assistência Local da QIAGEN	Que recebam formação regularmente, certificados e autorizados pela QIAGEN

1.4 Materiais necessários

Nota: Utilize apenas acessórios fornecidos pela QIAGEN.

- Rotor-Gene Q MDx 5Plex (n.º de cat. 9002020)
- Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM (n.º de cat. 9002030)
- Rotor-Gene Q MDx 6Plex (n.º de cat. 9002040)
- Laptop (n.º de cat. 9026760)
- 72-Well Rotor (n.º de cat. 9018903)
- Locking Ring 72-Well Rotor (n.º de cat. 9018904)
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (n.º de cat. 9018901)
- Rotor Holder (n.º de cat. 9018908)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250) (n.º de cat. 981103)
- Rotor-Gene Q SW (n.º de cat. 9023241)

1.5 Materiais necessários, mas não fornecidos

- Óculos de proteção
- Luvas
- Bata de laboratório

Para utilizar o Rotor-Gene Q MDx, é necessário um kit de PCR que tem de ser adquirido em separado. Para descobrir a gama de kits disponíveis, consulte [QIAGEN.com](https://www.qiagen.com).

2 Informações de segurança

Antes de utilizar o Rotor-Gene Q MDx, é essencial ler atentamente este manual do utilizador e prestar especial atenção às informações de segurança. As instruções e informações de segurança no manual do utilizador devem ser seguidas para garantir o funcionamento seguro do instrumento e para manter o instrumento em condições seguras.

Os tipos de informações de segurança seguintes aparecem ao longo do *Manual do utilizador do Rotor-Gene Q MDx*.

AVISO 	<p>O termo AVISO é utilizado para informar sobre situações que poderão resultar em lesões pessoais no utilizador ou noutras pessoas.</p> <p>São fornecidas informações detalhadas sobre estas circunstâncias numa caixa semelhante a esta.</p>
---	---

CUIDADO 	<p>O termo CUIDADO é utilizado para informar sobre situações que poderão resultar em danos no instrumento ou noutro equipamento.</p> <p>São fornecidas informações detalhadas sobre estas circunstâncias numa caixa semelhante a esta.</p>
---	---

As orientações constantes deste manual destinam-se a complementar, e não a substituir, os requisitos de segurança normais em vigor no país do utilizador.

Tenha em atenção que poderá ser necessário consultar os regulamentos locais para comunicar incidentes graves, que possam ocorrer em relação ao dispositivo, ao fabricante e/ou ao representante autorizado e à autoridade reguladora do local onde o utilizador e/ou doente se encontram.

2.1 Utilização adequada

AVISO 	Risco de lesões pessoais e danos materiais A utilização indevida do Rotor-Gene Q MDx pode provocar lesões pessoais ou danos no instrumento. O Rotor-Gene Q MDx deve ser utilizado apenas por pessoal qualificado e com a devida formação. Qualquer procedimento de assistência técnica do instrumento Rotor-Gene Q MDx deve ser efetuado apenas por um especialista de Assistência Local da QIAGEN.
---	---

Realize a manutenção, conforme descrito na secção 8. A QIAGEN cobra pelas reparações que forem necessárias devido a manutenção incorreta.

AVISO 	Risco de lesões pessoais e danos materiais O Rotor-Gene Q MDx é demasiado pesado para ser levantado por apenas uma pessoa. Para evitar lesões pessoais ou danos no instrumento, não o levante sozinho. Contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN para deslocar o instrumento.
---	--

AVISO 	Risco de lesões pessoais e danos materiais Não tente movimentar o Rotor-Gene Q MDx durante o seu funcionamento.
---	---

CUIDADO 	Danos no instrumento Evite derramar água ou substâncias químicas sobre o Rotor-Gene Q MDx. Os danos provocados pelo derrame de água ou de substâncias químicas irão anular a sua garantia.
---	--

Nota: Em caso de emergência, desligue o Rotor-Gene Q MDx no interruptor de alimentação na parte traseira do instrumento e retire o cabo de alimentação da tomada.

CUIDADO 	Risco de lesões pessoais e danos materiais Não tente abrir a tampa durante uma experiência ou enquanto o Rotor-Gene Q MDx estiver a rodar. Caso contrário, se conseguir desbloquear a fechadura da tampa e aceder ao interior, corre o risco de entrar em contacto com peças quentes, sob tensão elétrica ou em movimento a altas velocidades, podendo causar lesões ao utilizador ou danos no instrumento.
---	---

CUIDADO 	Risco de lesões pessoais e danos materiais Caso precise de parar rapidamente uma experiência, desligue o instrumento da fonte de alimentação e depois abra a tampa. Permita que a câmara arrefeça antes de aceder ao interior. Caso contrário, corre o risco de lesões pessoais ao tocar em peças que estão quentes.
---	--

CUIDADO 	Risco de lesões pessoais e danos materiais Se o equipamento for utilizado de uma maneira diferente da especificada pelo fabricante, a proteção fornecida pelo equipamento poderá ser afetada.
---	---

CUIDADO 	Risco de lesões pessoais e danos materiais Papel solto debaixo do Rotor-Gene Q MDx interfere com o arrefecimento do instrumento. É recomendado que a área por baixo do instrumento esteja livre e desimpedida.
---	--

CUIDADO 	Danos no instrumento Utilize sempre um anel de bloqueio no rotor. Isto evita que as tampas saltem dos tubos durante a experiência. Se as tampas saltarem dos tubos durante uma experiência, podem danificar a câmara.
---	---

CUIDADO 	Risco de danos materiais Inspeccione visualmente e certifique-se de que o rotor não está danificado ou deformado antes de cada execução.
---	--

Se o utilizador estiver carregado de eletricidade estática ao entrar em contacto com o Rotor-Gene Q MDx durante uma experiência, o Rotor-Gene Q MDx poderá, em casos graves, ser reposito a zero. No entanto, o software irá reiniciar o Rotor-Gene Q MDx e continuar a experiência.

2.2 Segurança elétrica

Desligue o cabo de alimentação da tomada antes de realizar tarefas de assistência técnica.

AVISO 	Perigo elétrico É provável que qualquer interrupção do condutor de proteção (condutor terra/massa) no interior ou exterior do instrumento ou a desconexão do terminal do condutor de proteção torne o instrumento perigoso. É proibida a interrupção intencional. Existem tensões fatais no interior do instrumento Quando o instrumento está ligado à alimentação elétrica, os terminais podem estar com carga e é provável que a abertura de tampas ou a remoção de peças exponha os componentes com carga elétrica.
--	--

Para garantir um funcionamento seguro e satisfatório do Rotor-Gene Q MDx, siga os conselhos abaixo:

- O cabo de alimentação deve estar ligado a uma tomada que tenha um condutor de proteção (terra/massa).
- Não ajuste ou substitua peças que se encontrem no interior do instrumento.
- Não utilize o instrumento com quaisquer tampas ou peças removidas.
- Se derramar um líquido no interior do instrumento, desligue o instrumento, retire o cabo de alimentação da tomada e contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN.

Se o instrumento deixar de ser seguro a nível elétrico, não permita que qualquer funcionário trabalhe com o mesmo e contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN.

É provável que o instrumento não seja seguro a nível elétrico se:

- Tanto o instrumento como o cabo de alimentação parecerem estar danificados.
- O instrumento tiver sido armazenado em condições desfavoráveis durante um período prolongado.
- O instrumento tiver sido sujeito a condições de transporte adversas.

<p>AVISO</p> 	<p>Perigo elétrico</p> <ul style="list-style-type: none">○ instrumento tem uma etiqueta de conformidade elétrica, que indica a tensão e a frequência da fonte de alimentação, assim como a potência do disjuntor.○ equipamento deve ser utilizado apenas nestas condições.
---	--

2.3 Segurança biológica

As amostras e os reagentes que contêm materiais de origem biológica devem ser considerados como potencialmente infecciosos. Utilize procedimentos laboratoriais seguros, conforme descrito em publicações como *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (Biossegurança em laboratórios microbiológicos e biomédicos), HHS (<https://www.cdc.gov/labs/BMBL.html>).

Amostras

As amostras podem conter agentes infecciosos. Deve estar ciente do perigo que tais agentes representam para a saúde e, conseqüentemente, deve utilizar, armazenar e eliminar as amostras de acordo com os regulamentos de segurança necessários.

<p>AVISO</p> 	<p>Amostras que contêm agentes infecciosos</p> <p>Algumas amostras utilizadas com este instrumento podem conter agentes infecciosos. Manuseie estas amostras com o maior cuidado e de acordo com os regulamentos de segurança necessários.</p> <p>Utilize sempre óculos de proteção, dois pares de luvas e uma bata de laboratório.</p> <p>A entidade responsável (por exemplo, o diretor do laboratório) deve tomar as precauções necessárias para garantir que o local de trabalho envolvente é seguro e que os operadores do instrumento possuem a formação adequada e não estão expostos a níveis perigosos de agentes infecciosos, conforme definido nas fichas de dados de segurança (FDS) aplicáveis ou nos documentos da OSHA*, da ACGIH† ou do COSHH‡.</p> <p>A extração de fumos e a eliminação de resíduos devem estar em conformidade com todos os regulamentos e leis nacionais, estaduais e locais em matéria de saúde e segurança.</p>
---	--

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Administração de Segurança e Saúde Ocupacional) (Estados Unidos da América).

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais) (Estados Unidos da América).

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Controlo de Substâncias Perigosas para a Saúde) (Reino Unido).

2.4 Segurança química

<p>AVISO</p> 	<p>Substâncias químicas perigosas</p> <p>Algumas substâncias químicas utilizadas com este instrumento podem ser perigosas ou tornar-se perigosas após a conclusão da execução de protocolo. Utilize sempre óculos de proteção, luvas e uma bata de laboratório. A entidade responsável (por exemplo, o diretor do laboratório) deve tomar as precauções necessárias para garantir que o local de trabalho envolvente é seguro e que os operadores do instrumento não estão expostos a níveis perigosos de substâncias tóxicas (químicas ou biológicas), conforme definido nas fichas de dados de segurança (FDS) aplicáveis ou nos documentos da OSHA*, da ACGIH† ou do COSHH‡.</p> <p>A extração de fumos e a eliminação de resíduos devem estar em conformidade com todos os regulamentos e leis nacionais, estaduais e locais em matéria de saúde e segurança.</p>
---	--

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Administração de Segurança e Saúde Ocupacional) (Estados Unidos da América).

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais) (Estados Unidos da América).

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Controlo de Substâncias Perigosas para a Saúde) (Reino Unido).

Fumos tóxicos

Se trabalhar com solventes voláteis ou substâncias tóxicas, deverá dispor de um sistema de ventilação laboratorial eficaz para remover os vapores que possam ser produzidos.

2.5 Eliminação de resíduos

O material de laboratório usado pode conter substâncias químicas perigosas. Estes resíduos devem ser recolhidos e eliminados adequadamente de acordo com os regulamentos de segurança locais.

Para obter mais informações sobre como eliminar o Rotor-Gene Q MDx, consulte "Resíduos de equipamentos elétricos e eletrónicos (REEE)", na página 201.

2.6 Riscos mecânicos

A tampa do Rotor-Gene Q MDx deve permanecer fechada enquanto o instrumento se encontra em funcionamento.

AVISO 	Peças móveis Para evitar o contacto com peças móveis durante o funcionamento do Rotor-Gene Q MDx, o instrumento deve estar em utilização com a tampa fechada.
---	---

AVISO 	Risco de lesões pessoais e danos materiais Abra e feche cuidadosamente a tampa do Rotor-Gene Q MDx para evitar entalar dedos ou peças de roupa.
---	---

AVISO 	Danos no instrumento Certifique-se de que o rotor e o anel de bloqueio se encontram instalados corretamente. Se o rotor ou o anel de bloqueio apresentarem sinais de danos mecânicos ou corrosão, não utilize o Rotor-Gene Q MDx; contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN.
---	--

AVISO 	Danos no instrumento As partes mecânicas podem bloquear quando o Rotor-Gene Q MDx é iniciado imediatamente após a entrega em climas frios. Deixe o instrumento aclimatizar-se à temperatura ambiente pelo menos durante uma hora, antes de o ligar.
---	--

AVISO 	Danos no instrumento Em caso de avaria causada por uma falha de energia, remova o cabo de alimentação e aguarde 10 minutos antes de tentar abrir manualmente a tampa.
---	---

AVISO 	Risco de sobreaquecimento Para assegurar uma ventilação adequada, mantenha uma distância mínima de 10 cm na parte traseira e nas partes laterais do Rotor-Gene Q MDx. As fendas e as aberturas que asseguram a ventilação do Rotor-Gene Q MDx não devem ser tapadas.
---	---

Perigo de aquecimento

AVISO 	Superfície quente A câmara do Rotor-Gene Q MDx pode atingir temperaturas acima dos 120 °C. Evite tocar no mesmo quando estiver quente.
---	--

AVISO 	Superfície quente Quando uma execução estiver em pausa, o Rotor-Gene Q MDx não irá arrefecer completamente até à temperatura ambiente. Tenha cuidado antes de manusear o rotor ou quaisquer tubos do instrumento.
---	---

2.7 Segurança durante a manutenção

Realize a manutenção, conforme descrito na secção 8. A QIAGEN cobra pelas reparações que forem necessárias devido a manutenção incorreta.

AVISO/ CUIDADO 	Risco de lesões pessoais e danos materiais Realize apenas a manutenção especificamente descrita neste manual do utilizador.
--	---

AVISO 	Risco de incêndio Quando limpar o Rotor-Gene Q MDx com desinfetante à base de álcool, deixe a porta do Rotor-Gene Q MDx aberta para permitir a dispersão de vapores inflamáveis.
---	--

AVISO/ CUIDADO 	Risco de choque elétrico Não desmonte o instrumento Rotor-Gene Q MDx.
--	---

CUIDADO 	Danos no compartimento do instrumento Nunca limpe o compartimento do instrumento com álcool ou soluções à base de álcool. O álcool irá danificar o compartimento. Para limpar o compartimento, utilize apenas água destilada.
---	---

2.8 Símbolos no Rotor-Gene Q MDx

Os seguintes símbolos poderão aparecer no manual do utilizador ou na embalagem e nos rótulos:

Símbolo	Localização	Descrição
	Perto da câmara de amostras, visível quando a tampa está aberta	Perigo de aquecimento — a câmara pode atingir temperaturas acima dos 120 °C
	Parte traseira do instrumento	Consultar as instruções de utilização
	Placa de características na parte traseira do instrumento	Marcação CE para conformidade europeia
	Placa de características na parte traseira do instrumento	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Placa de características na parte traseira do instrumento	Marca da certificação CSA para o Canadá e os EUA
	Placa de características no painel do lado direito	Fabricante legal.
	Placa de características no painel do lado direito	REEE sobre a eliminação de resíduos de equipamentos elétricos e eletrónicos para a Europa e o resto do mundo.
	Placa de características no painel do lado direito	Marca FCC da United States Federal Communications Commission
	Placa de características no painel do lado direito	RCM (anterior C-Tick) para a Austrália (identificação do fornecedor N17965)
	Placa de características no painel do lado direito	Marcação RoHS para a China (restrição de utilização de determinadas substâncias perigosas em equipamentos elétricos e eletrónicos)

3 Descrição geral

O Rotor-Gene Q MDx é um instrumento inovador que permite real-time PCR de alta precisão e que é altamente adequado para aplicações de diagnóstico in vitro em combinação com kits com a marca IVD da QIAGEN.

O software poderoso e intuitivo garante simplicidade para os iniciantes, assim como uma plataforma experimental aberta para os utilizadores avançados.

3.1 Princípio do Rotor-Gene Q MDx

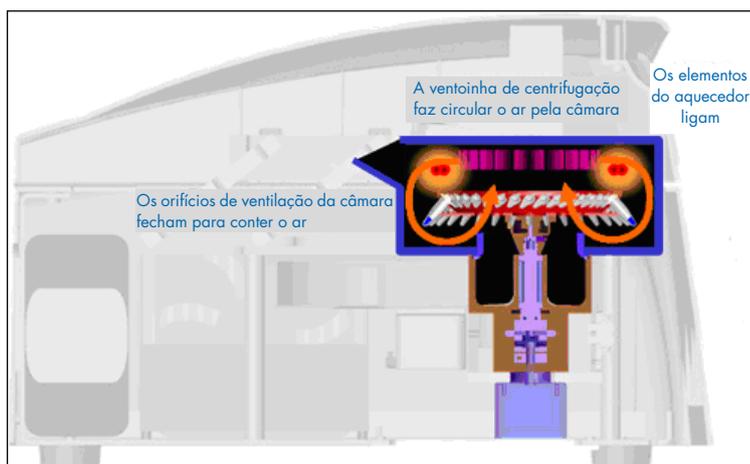
3.1.1 Desempenho térmico

O Rotor-Gene Q MDx utiliza um modelo sofisticado de aquecimento e arrefecimento para atingir condições de reação ideais. O formato rotativo único garante uma uniformidade ótica e térmica ideal entre as amostras, o que é essencial para uma análise precisa e fiável.

As amostras centrifugam continuamente a 400 rpm durante uma execução. A centrifugação previne a condensação e elimina bolhas de ar, mas não forma um pellet de ADN. Para além disso, as amostras não necessitam de ser viradas para baixo antes de uma execução.

As amostras são aquecidas e arrefecidas num forno de baixa massa de ar. O aquecimento é atingido através de um elemento de níquel-cromo na tampa. A câmara é arrefecida através da extração do ar pelo topo da câmara enquanto é aplicado ar à temperatura ambiente pela base.

Aquecimento



Arrefecimento

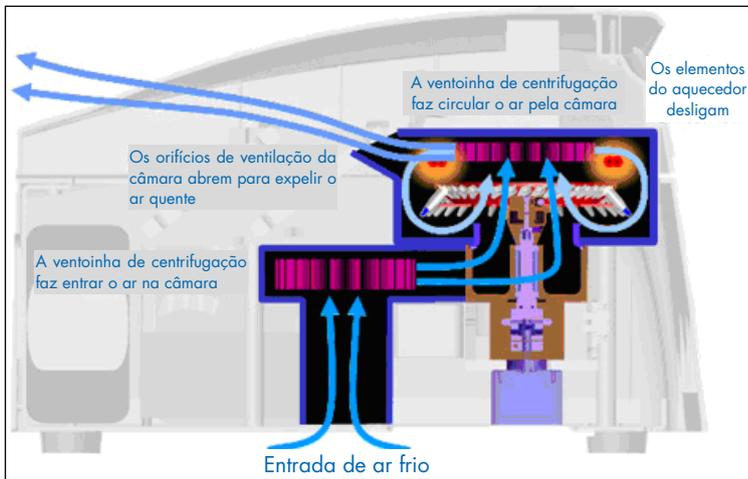


Ilustração do sistema de aquecimento e arrefecimento.

3.1.2 Sistema ótico

Com uma escolha de 6 fontes de excitação e 6 filtros de deteção combinados com uma trajetória ótica curta e fixa, o Rotor-Gene Q MDx pode ser utilizado para reações multiplex, assegurando uma variabilidade da fluorescência mínima entre amostras e eliminando a necessidade de calibração ou compensação.

As amostras são excitadas a partir do fundo da câmara por um díodo emissor de luz. A energia é transmitida através das paredes finas na base do tubo. A fluorescência emitida atravessa os filtros de emissão na parte lateral da câmara e é posteriormente recolhida por um fotomultiplicador. A trajetória ótica fixa assegura uma excitação consistente para cada amostra, o que significa que não há necessidade de utilizar um corante interno passivo de referência, como o ROX™.

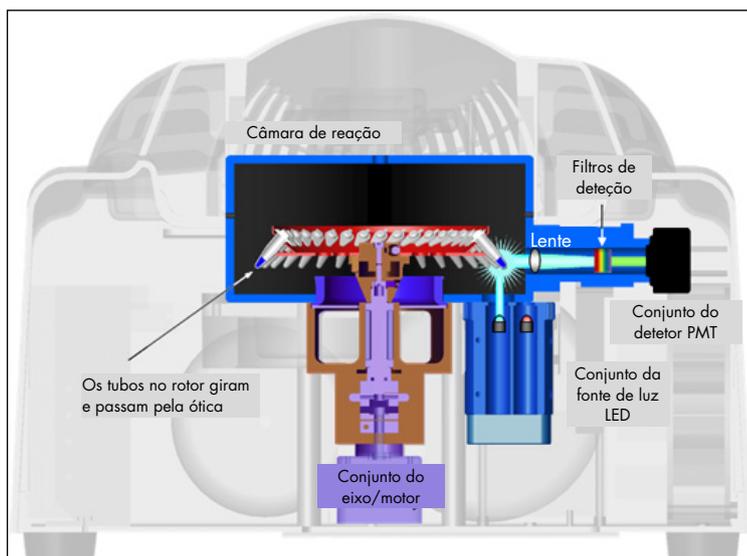


Ilustração do sistema óptico.

3.1.3 Canais disponíveis

Canal	Excitação (nm)	Deteção (nm)	Exemplos de fluoróforos detetados
Blue	365 ± 20	460 ± 20	Marina Blue®, Edans Bothell Blue, Alexa Fluor® 350, AMCA-X, ATTO 390
Green	470 ± 10	510 ± 5	FAM®, SYBR® Green I, Fluorescein, EvaGreen®, Alexa Fluor 488
Yellow	530 ± 5	557 ± 5	JOE™, VIC®, HEX™, TET™, CAL Fluor® Gold 540, Yakima Yellow®
Orange	585 ± 5	610 ± 5	ROX, CAL Fluor Red 610, Cy®3.5, Texas Red®, Alexa Fluor 568
Red	625 ± 10	660 ± 10	Cy5, Quasar® 670, LightCycler® Red640, Alexa Fluor 633
Crimson	680 ± 5	712 passa-alto	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
Fusão de alta resolução (High Resolution Melt, HRM)	460 ± 20	510 ± 5	SYBR Green I, SYTO®9, LC Green®, LC Green Plus+, EvaGreen

Nota: Os kits QIAGEN indicados para utilização com os instrumentos Rotor-Gene Q MDx são otimizados relativamente a certas combinações de corantes. Consulte os manuais dos kits correspondentes para obter mais informações.

3.2 Características externas do Rotor-Gene Q MDx



- | | | | |
|---|----------------------------------|---|--------------------------------|
| 1 | Orifícios de ventilação na tampa | 3 | Câmara do rotor |
| 2 | Pega da tampa | 4 | Luzes de estado do instrumento |

3.2.1 Orifícios de ventilação na tampa

O Rotor-Gene Q possui orifícios na parte traseira da tampa do instrumento. Estes orifícios permitem ao instrumento libertar calor da câmara durante o funcionamento. Um bloqueio ou um espaço insuficiente à volta dos orifícios pode afetar o desempenho do instrumento.

3.2.2 Pega da tampa

A pega da tampa é utilizada para fazer deslizar a tampa do instrumento para trás. Esta pega não se destina a suportar o peso do instrumento e não deve ser utilizada para o levantar.

3.2.3 Câmara do rotor

A câmara do rotor é o local onde os rotores são carregados e submetidos aos passos de aquecimento e ciclagem programados.

3.2.4 Luzes de estado do instrumento

Existem duas luzes de estado no Rotor-Gene Q. A luz de suspensão indica que o instrumento não está a ser utilizado. A luz de funcionamento fica intermitente quando o Rotor-Gene Q está a ser utilizado.

3.3 Características internas do Rotor-Gene Q MDx



Vista interna da câmara do Rotor-Gene Q

1 Cubo do rotor

2 Lente ótica

3.3.1 Cubo do rotor

O cubo do rotor mantém o rotor no devido lugar dentro do instrumento.

3.3.2 Lente ótica

Lente ótica onde a luz do díodo de excitação é focada nos tubos.

4 Procedimentos de instalação

4.1 Fornecimento e instalação do sistema

A instalação deve ser orientada por uma pessoa que esteja familiarizada com o seu equipamento laboratorial e informático.

São fornecidos os seguintes itens:

- Instrumento Rotor-Gene Q MDx
- *Manual do utilizador do Rotor-Gene Q MDx*
- Estação de trabalho
- Software Rotor-Gene Q MDx (será instalado pela Assistência Local da QIAGEN durante a configuração inicial)

4.1.1 Desembalar o Rotor-Gene Q MDx

O Rotor-Gene Q MDx é fornecido com todos os componentes necessários para configurar e utilizar o instrumento. A caixa também contém uma lista de todos os componentes fornecidos.

Nota: Verifique esta lista para se certificar de que estão presentes todos os componentes.

Nota: Certifique-se de que o instrumento e os acessórios fornecidos não apresentam danos de transporte antes da instalação.

A caixa dos acessórios encontra-se no topo da espuma de proteção. A caixa dos acessórios contém:

- Guia de instalação (em inglês; traduções disponíveis no suporte de dados amovível fornecido com os manuais)
- Suporte de dados amovível (software)
- Suporte de dados amovível (manuais)
- Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes
- Rotor Holder (desmontado para transporte seguro)
- 36-Well Rotor (este rotor tem uma cor vermelha)
- 36-Well Rotor Locking Ring

Os itens seguintes encontram-se embalados nas laterais da espuma de proteção:

- USB e cabo de série RS-232
- Conjunto do cabo de alimentação internacional
- PCR Tubes, 0.2 ml (1000)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (1000)

Quando todos estes componentes tiverem sido removidos da caixa, retire a espuma de proteção no topo do Rotor-Gene Q MDx. Retire cuidadosamente o Rotor-Gene Q MDx da caixa e desembulhe a cobertura de plástico. Abra a tampa, deslizando-a em direção à parte traseira, para aceder à câmara de reação.

Os seguintes itens já estão instalados dentro do Rotor-Gene Q MDx:

- 72-Well Rotor (este rotor tem uma cor azul)
- 72-Well Rotor Locking Ring

Um computador portátil poderá estar incluído na embalagem, dependendo dos detalhes da sua encomenda.

4.1.2 Instalação do hardware

Quando o Rotor-Gene Q MDx tiver sido desembalado, proceda à instalação conforme descrito abaixo.

CUIDADO 	Danos no instrumento As partes mecânicas podem bloquear quando o Rotor-Gene Q MDx é iniciado imediatamente após a entrega em climas frios. Deixe o instrumento aclimatizar-se à temperatura ambiente pelo menos durante uma hora, antes de o ligar.
---	---

Proceda da seguinte maneira:

1. Coloque o Rotor-Gene Q MDx numa superfície nivelada.
2. Certifique-se de que existe espaço suficiente atrás do instrumento para que a tampa abra totalmente.
3. Certifique-se de que o interruptor de alimentação na parte traseira do instrumento pode ser alcançado facilmente.
4. Não obstrua a parte traseira do instrumento. Certifique-se de que o cabo de alimentação pode ser facilmente retirado, se necessário, para desligar a alimentação do instrumento.

5. Ligue o cabo USB ou o cabo de série RS-232 fornecido a uma porta USB ou de comunicações na parte traseira do computador.
6. Ligue o cabo USB ou o cabo de série RS-232 à parte traseira do Rotor-Gene Q MDx.
7. Em seguida, ligue o Rotor-Gene Q MDx a uma fonte de alimentação. Ligue uma extremidade do cabo de alimentação de CA à tomada localizada na parte traseira do Rotor-Gene Q MDx e a outra extremidade à tomada de CA.

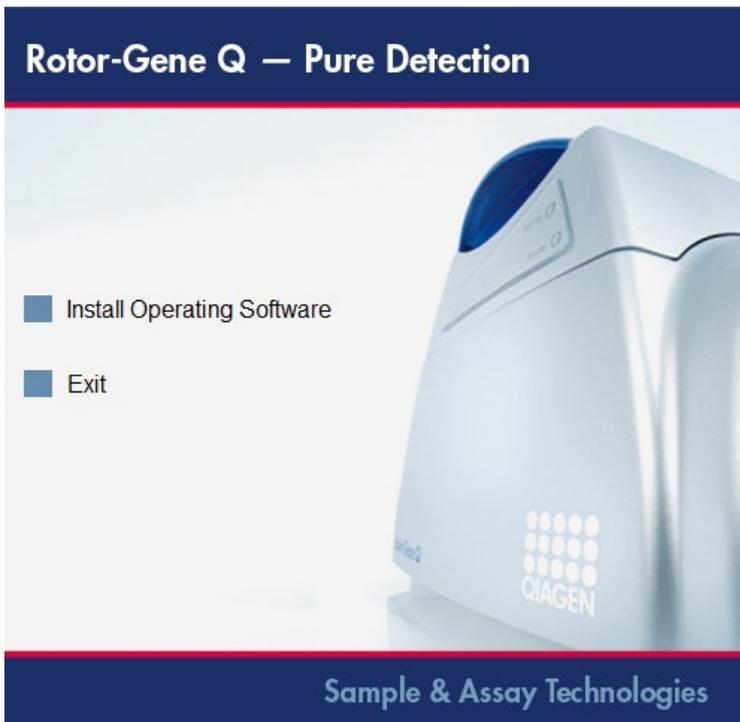


Nota: Ligue o Rotor-Gene Q MDx ao computador apenas com o cabo USB ou o cabo de série fornecidos com o instrumento. Não utilize outros cabos.

4.1.3 Instalação do software

1. Para instalar o software Rotor-Gene Q, transfira-o de QIAGEN.com para o computador num suporte de dados amovível sem vírus ou insira o Suporte de dados amovível (software) fornecido com o instrumento no computador.
2. Se a instalação do software for iniciada automaticamente, selecione Install Operating Software (Instalar software de funcionamento) na janela apresentada ou navegue até à pasta do software RGQ no suporte de dados amovível.

Nota: Consulte o *Guia de instalação do Rotor-Gene Q* fornecido com o instrumento para uma instalação fácil e para obter orientações pelos próximos passos de instalação do software.



3. Quando o software estiver instalado, será criado automaticamente um ícone no ambiente de trabalho.
4. Ligue o Rotor-Gene Q MDx movendo o interruptor localizado no lado esquerdo da parte de trás para a posição "I". Uma luz azul "Standby" (Em suspensão) na parte da frente do Rotor-Gene Q MDx indica que o instrumento está pronto a ser utilizado.

Nota: Ao iniciar pela primeira vez, ligado a um computador, o Rotor-Gene Q MDx será reconhecido pelo sistema operativo e serão apresentadas várias mensagens. Consulte o *Guia de instalação do Rotor-Gene Q* fornecido com o instrumento (Suporte de dados amovível e edição impressa) para obter orientações.



5. Clique duas vezes no ícone do ambiente de trabalho Rotor-Gene Q Series Software (Software da série Rotor-Gene Q) para iniciar o software.



6. É apresentada a janela Welcome (Bem-vindo) quando o software é iniciado pela primeira vez, mas não volta a aparecer em atualizações do software posteriores.



Machine Serial Number (Número de série do instrumento):

Introduza o número de série (7 dígitos), que pode ser encontrado na parte traseira do Rotor-Gene Q MDx.

Port (Porta):

Escolha um cabo USB ou cabo de série. Selecione a porta de comunicações adequada ou clique no botão Auto-Detect (Autodeteção).

Auto-Detect (Autodeteção)

Quando utilizar esta opção, a porta de série ou porta USB correspondente será detetada automaticamente e apresentada na lista pendente Port (Porta).

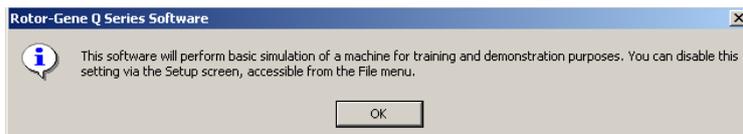
Run in Virtual Mode (for demonstration) (Executar em modo virtual [para demonstração]):

Selecionar esta caixa permite a instalação do software Rotor-Gene Q num computador que não esteja ligado a um Rotor-Gene Q MDx. O software está completamente funcional e pode simular execuções.

Nota: Se esta caixa estiver marcada e um Rotor-Gene Q MDx estiver ligado ao computador, é apresentada a seguinte mensagem antes do início da execução: You are about to run in Virtual mode (Está prestes a executar em modo virtual). Para efetuar uma execução real, a configuração deve ser alterada na janela Setup (Configuração) (consulte a secção 6.5.4).

Begin (Iniciar):

Quando toda a informação tiver sido introduzida, clique em Begin (Iniciar). Espere até que a inicialização esteja concluída, o que pode demorar alguns segundos. Se tiver sido escolhido o modo virtual, é apresentada a seguinte mensagem:



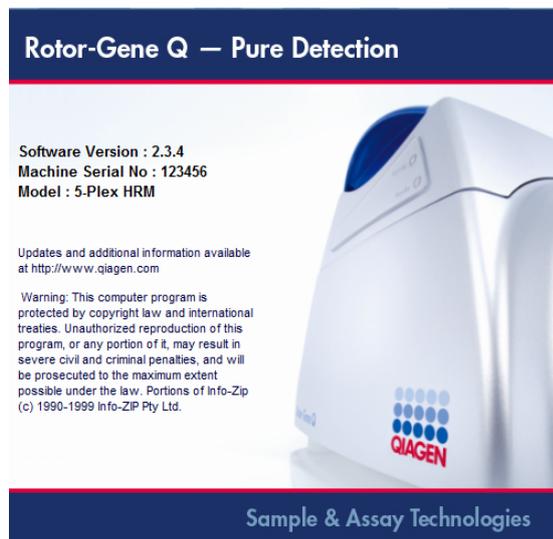
Se a caixa Run in Virtual Mode (Executar em modo virtual) não estiver marcada, o software será iniciado e aberto automaticamente.

Exit Program (Sair do programa):

Ao clicar neste botão sai do programa.

4.1.4 Versão do software

Para descobrir qual é o número da sua versão, clique em Help (Ajuda) e, em seguida, em About This Software... (Sobre este software...).



Esta janela apresenta informações gerais sobre o software, incluindo a versão do software, o número de série e o modelo do instrumento.

O software pode ser copiado livremente para utilização dentro de uma organização que seja proprietária de um Rotor-Gene Q MDx. O software não pode ser copiado e distribuído para terceiros fora da organização.

4.1.5 Software adicional em computadores ligados a instrumentos Rotor-Gene Q MDx

O software Rotor-Gene Q gere processos de tempo crítico durante a execução de PCR e o processo de aquisição de dados. Por este motivo, é importante assegurar que nenhum outro processo utiliza recursos significativos do sistema, tornando o software Rotor-Gene Q mais lento. É particularmente importante prestar atenção aos pontos listados abaixo.

Os administradores do sistema são aconselhados a considerar qualquer impacto que uma modificação do sistema possa ter nos recursos antes de implementá-la.

Software antivírus

A QIAGEN está ciente da ameaça que os vírus de computador representam para qualquer computador que troque dados com outros computadores. Prevê-se que o software Rotor-Gene AssayManager, versão 1.0 ou 2.1 seja instalado primeiramente em ambientes nos quais existem políticas locais para minimizar esta ameaça. Contudo, a QIAGEN recomenda a utilização de um software antivírus em qualquer caso.

A seleção e instalação de uma ferramenta de detecção de vírus adequada são da responsabilidade do cliente. No entanto, a QIAGEN validou a compatibilidade do software Rotor-Gene Q com o computador portátil QIAGEN em conjunto com o seguinte software antivírus:

- Microsoft Defender, versão de cliente 4.18.2005.5

Consulte a página do produto em QIAGEN.com para obter as últimas versões do software antivírus que foram validadas em conjunto com o software Rotor-Gene Q e Rotor-Gene AssayManager, versão 1.0 ou 2.1.

Se um software antivírus estiver selecionado, certifique-se de que pode ser configurado de forma a que o caminho da pasta da base de dados possa ser excluído da análise. Caso contrário, existe o risco de ocorrerem erros de ligação à base de dados. Dado que o Rotor-Gene AssayManager, versão 1.0 ou 2.1 cria novos arquivos da base de dados de forma dinâmica, é necessário excluir o caminho da pasta para os ficheiros e não os ficheiros únicos. Não recomendamos a utilização de software antivírus onde apenas podem ser excluídos ficheiros únicos, por exemplo, McAfee Antivirus Plus V16.0.5. Se o computador for utilizado num ambiente sem acesso à rede, certifique-se também de que o software antivírus é compatível com atualizações offline.

Para obter resultados consistentes após a instalação de software antivírus, os administradores do sistema devem garantir o seguinte:

- Conforme foi explicado anteriormente, o caminho da pasta da base de dados do Rotor-Gene AssayManager 1.0 ou 2.1 (C:\Program Files\Microsoft SQL Server\MSSQL10_50.RGAMINSTANCE\MSSQL\DATA) deve ser excluído da análise dos ficheiros.
- Não são efetuadas atualizações à base de dados de vírus durante a utilização do Rotor-Gene AssayManager 1.0 ou 2.1.
- Certifique-se de que as análises parciais ou totais do disco rígido estão desativadas durante a aquisição de dados de real-time PCR. Caso contrário, existe o risco de impacto negativo no desempenho do instrumento.

Leia o manual do software antivírus escolhido para obter mais informações sobre configuração.

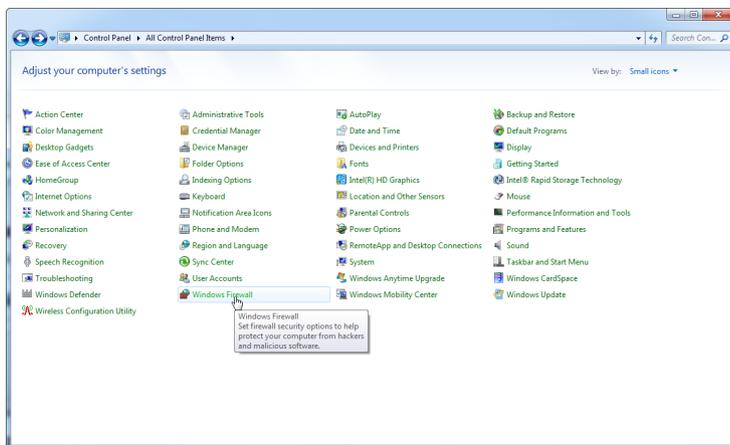
Firewall e redes

O software Rotor-Gen Q pode ser executado em computadores sem acesso à rede ou num ambiente de rede, caso seja utilizado um servidor de base de dados remoto. Para o funcionamento em rede, a firewall no computador portátil fornecido pela QIAGEN é configurada de forma que o tráfego de entrada seja bloqueado para todas as portas, exceto as necessárias para estabelecer uma ligação à rede.

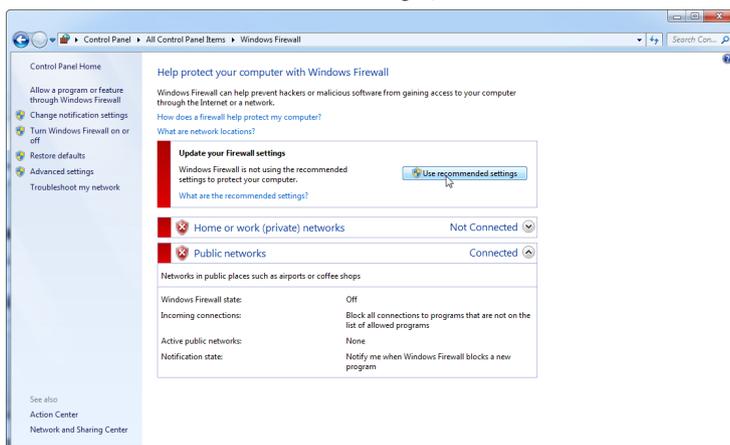
Tenha em atenção que bloquear as ligações de entrada não afeta as respostas a solicitações acionadas pelo utilizador. As ligações de saída são permitidas, uma vez que tal pode ser necessário para obter atualizações.

Se a sua configuração for diferente, a QIAGEN recomenda configurar a firewall do mesmo modo descrito acima. Para este efeito, um administrador do sistema deve iniciar sessão e efetuar os seguintes passos:

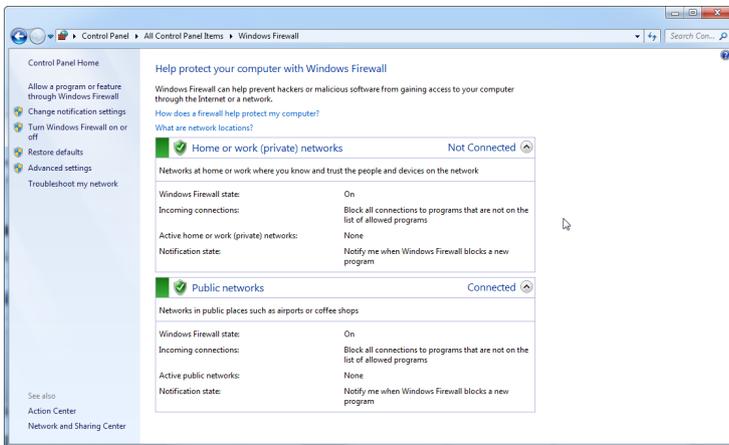
1. Abra o Control Panel (Painel de controlo) e selecione Windows Firewall (Firewall do Windows).



2. Selecione Use recommended settings (Utilizar definições recomendadas).

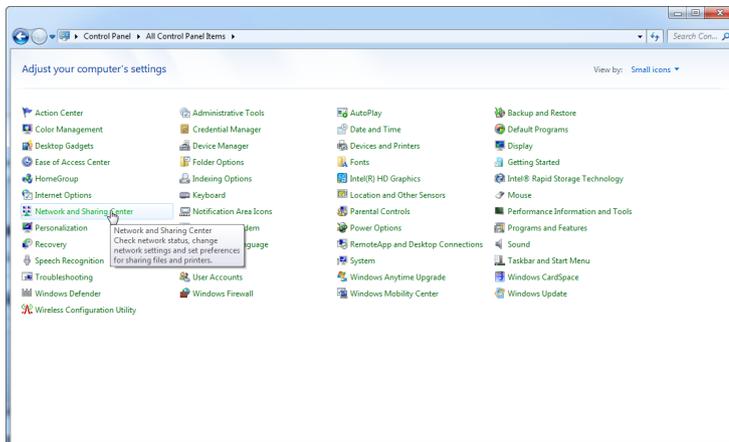


3. Verifique se as seguintes definições estão ativas:

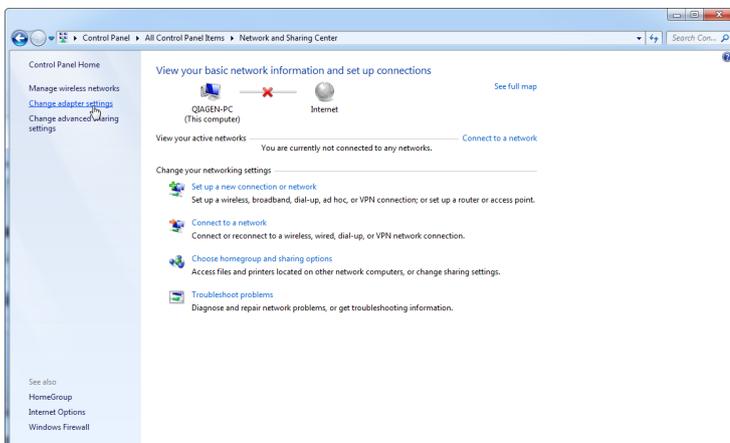


Por motivos de segurança e fiabilidade, deve ser utilizado um acesso à rede por cabo em vez de Wi-Fi. Os computadores portáteis fornecidos pela QIAGEN têm um adaptador Wi-Fi desativado. Se a sua configuração for diferente, um administrador do sistema deve desativar o adaptador Wi-Fi manualmente, através dos seguintes passos:

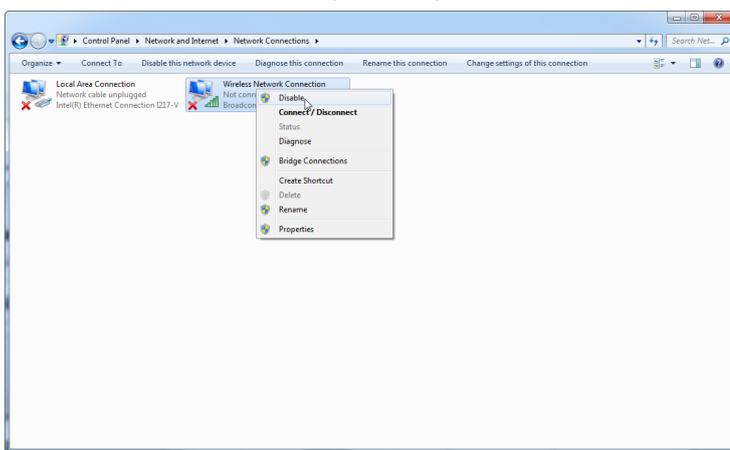
1. Abra o Control Panel (Painel de controlo) e selecione Network and Sharing Center (Centro de rede e partilha).



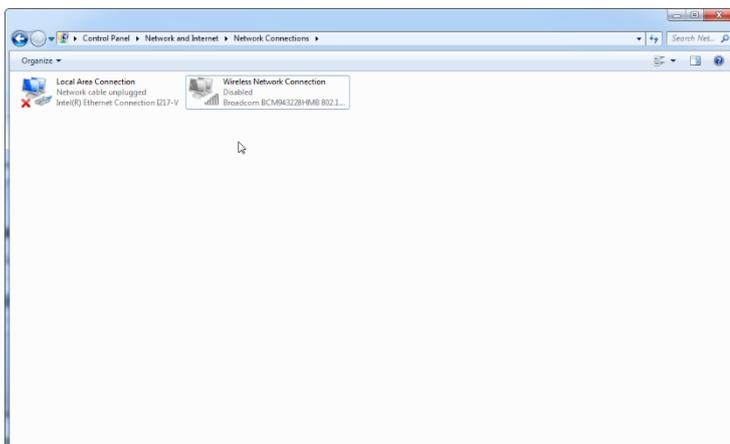
2. Selecione Change adapter settings (Alterar definições do adaptador).



3. Passe o rato por cima de Wireless Network Connection (Ligação de rede sem fios), prima o botão direito do rato e selecione Disable (Desativar) no menu de contexto.



4. Verifique se a Wireless Network Connection (Ligação de rede sem fios) está desativada.



Ferramentas do sistema

Muitas ferramentas do sistema podem utilizar recursos significativos do sistema sem qualquer interação por parte do utilizador. Os exemplos típicos dessas ferramentas são:

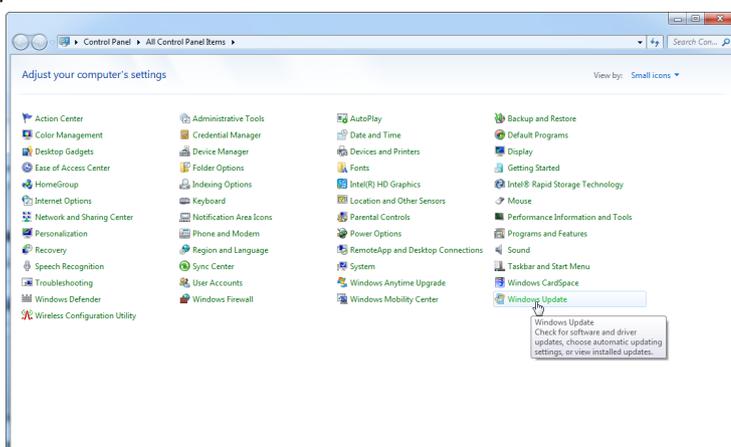
- Indexação de ficheiros, que é efetuada como tarefa em segundo plano por muitas aplicações de escritório contemporâneas
- Desfragmentação de disco, que geralmente utiliza também uma tarefa em segundo plano
- Qualquer software que verifica a existência de atualizações na Internet
- Ferramentas de monitorização e gestão remotas

Tenha em atenção que devido à natureza dinâmica do mundo de TI, esta lista pode não estar completa e podem ser lançadas ferramentas que não sejam conhecidas no momento da redação do presente documento. É importante que os administradores do sistema se certifiquem de que essas ferramentas não estão ativas durante uma execução de PCR.

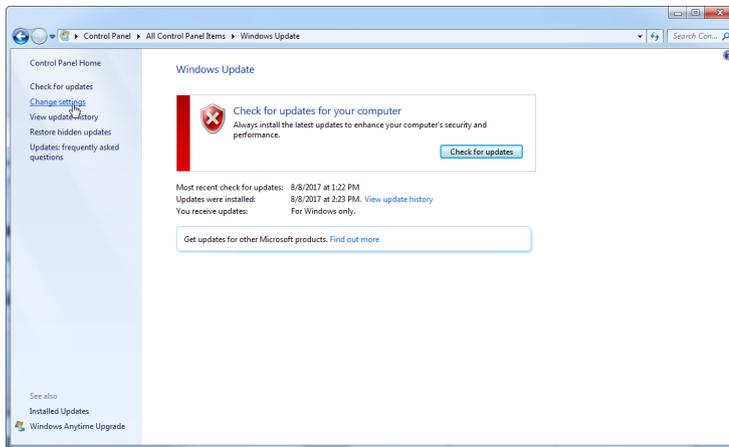
Atualizações do sistema operativo

Os computadores portáteis fornecidos pela QIAGEN são configurados de forma que as atualizações automáticas do sistema operativo estejam desativadas. Se a sua configuração for diferente, um administrador do sistema deve desativar qualquer processo automático de atualização do sistema operativo, através dos seguintes passos:

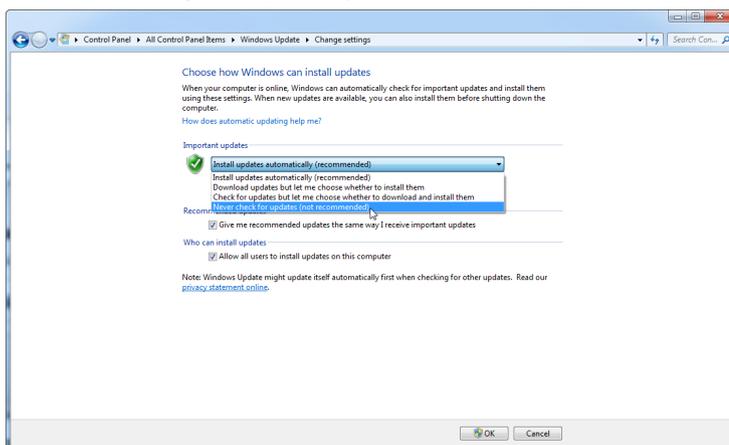
1. Abra o Control Panel (Painel de controlo) e seleccione Windows Update (Atualização do Windows).



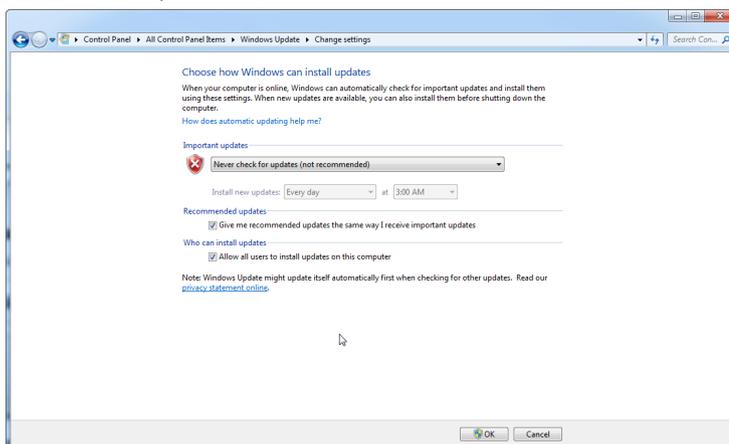
2. Selecione Change settings (Alterar definições).



3. Selecione Never check for updates (Nunca procurar atualizações).



4. Verifique se a opção Never check for updates (Nunca procurar atualizações) em Important updates (Atualizações importantes) está ativa.



Caso sejam necessárias atualizações devido a questões de segurança não detetadas, a QIAGEN fornece mecanismos para instalar um conjunto definido de patches de segurança do Windows validados online (se estiver disponível ligação à Internet num computador portátil QIAGEN) ou como pacote offline, preparado num computador separado com ligação à Internet.

Visite a página do produto em QIAGEN.com para obter mais informações.

4.2 Requisitos relativamente ao local

Os instrumentos Rotor-Gene Q MDx devem ficar localizados longe da luz solar direta, afastados de fontes de calor, fontes de vibração e de interferência elétrica. Consulte o Apêndice A para obter informações acerca das condições de funcionamento (temperatura e humidade). No local de instalação não deve haver correntes de ar, humidade ou pó em excesso e o mesmo não deve estar sujeito a grandes flutuações de temperatura.

Consulte o Apêndice A para obter informações acerca do peso e dimensões dos instrumentos Rotor-Gene Q MDx. Certifique-se de que a bancada de trabalho está seca, limpa e tem espaço adicional para acessórios. Para obter mais informações acerca de especificações necessárias para a bancada de trabalho, contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN.

Nota: É extremamente importante que o instrumento Rotor-Gene Q MDx seja colocado numa superfície estável, sem níveis ou vibrações. Consulte as condições de funcionamento — consulte o Apêndice A.

O instrumento Rotor-Gene Q MDx deve ser colocado a aproximadamente 1,5 m de uma tomada de CA devidamente ligada à terra (massa).

AVISO 	Atmosfera explosiva O instrumento Rotor-Gene Q MDx não foi concebido para ser utilizado numa atmosfera explosiva.
---	---

AVISO 	Risco de sobreaquecimento Para assegurar uma ventilação adequada, mantenha uma distância mínima de 10 cm na parte traseira do instrumento Rotor-Gene Q MDx. As fendas e as aberturas que asseguram a ventilação do instrumento Rotor-Gene Q MDx não devem ser tapadas.
---	---

4.3 Ligação à alimentação de CA

4.3.1 Requisitos de alimentação

O Rotor-Gene Q MDx funciona a:

- 100–240 V CA a 50–60 Hz, 520 VA (pico)

Certifique-se de que a tensão nominal do Rotor-Gene Q MDx é compatível com a tensão de CA disponível no local de instalação. As flutuações de tensão da rede de alimentação elétrica não devem ultrapassar 10% das tensões de alimentação nominais.

4.3.2 Requisitos de ligação à terra

Para proteger o pessoal que utiliza este instrumento, a QIAGEN recomenda que o Rotor-Gene Q MDx esteja corretamente ligado à terra (massa). O instrumento está equipado com um cabo de alimentação de CA com 3 condutores que, quando ligado a uma tomada de CA adequada, liga o instrumento à terra (massa). Para preservar esta função de proteção, não utilize o instrumento a partir de uma tomada de CA que não esteja ligada à terra (massa).

4.3.3 Instalação do cabo de alimentação de CA

Ligue uma extremidade do cabo de alimentação de CA à tomada localizada na parte traseira do instrumento Rotor-Gene Q MDx e a outra extremidade à tomada de CA.

4.4 Configuração da segurança do Windows

Os computadores portáteis fornecidos pela QIAGEN para utilização com o instrumento Rotor-Gene Q MDx podem ter o Microsoft Windows 7 ou o Windows 10 pré-instalado e são configurados com uma conta de utilizador Windows padrão (não administrativa) e uma conta de administrador. Na utilização de rotina do sistema, deve ser utilizada a conta padrão, uma vez que o software Rotor-Gene Q e o Rotor-Gene AssayManager, versão 1.0 ou 2.1 foram concebidos para ser executados sem direitos de administrador. A conta de administrador (a que tem um fundo de ambiente de trabalho vermelho) deve ser utilizada apenas para instalar o software Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene AssayManager, versão 1.0 ou 2.1, e um Software adicional em computadores ligados a instrumentos Rotor-Gene Q MDx (consulte a secção "Software antivírus"). A utilização da conta de administrador é indicada por um fundo de ambiente de trabalho vermelho. Certifique-se de que inicia sempre sessão como utilizador padrão para efeitos de utilização de rotina.

A palavra-passe predefinida para a conta de administrador é Q1a#g3n!A6. Altere a palavra-passe de administrador após o primeiro início de sessão. Certifique-se de que a palavra-passe é segura e de que não a perde. Não existe uma palavra-passe para a conta de operador.

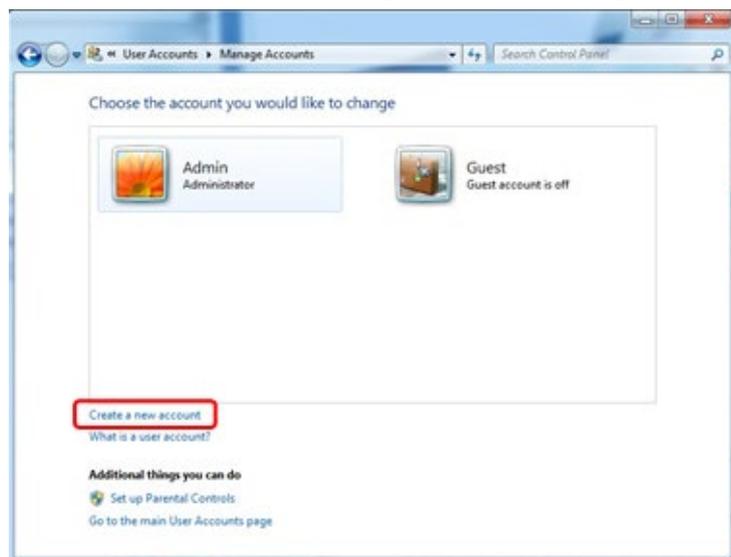
Caso perca a palavra-passe de administrador do portátil, aconselhamos a contactar a Microsoft para obter assistência.

Se a sua configuração for diferente e não estiver incluída uma conta não administrativa, os administradores do sistema devem configurar uma conta de utilizador Windows padrão adicional para evitar o acesso a áreas críticas do sistema, como Ficheiros do programa, o diretório Windows (por exemplo, acesso à funcionalidade de instalação ou desinstalação, incluindo aplicações, componentes do sistema operativo, definições de data/hora, atualizações do Windows, firewall, direitos e funções de utilizador, ativação de antivírus) ou definições relevantes de desempenho, como poupança de energia.

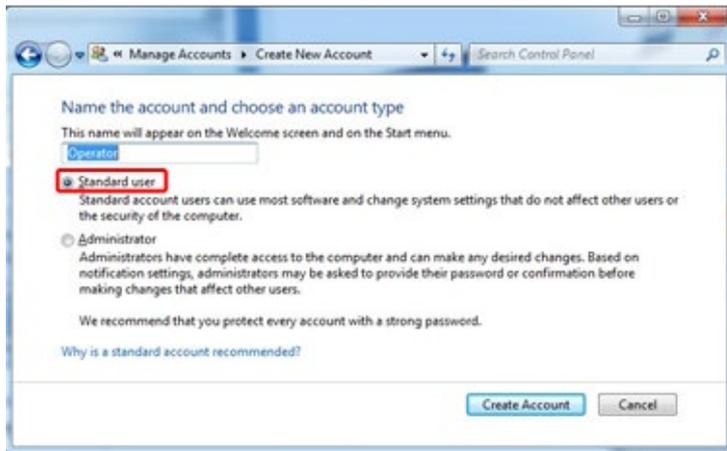
Para criar uma conta de utilizador padrão no Windows 7, siga os seguintes passos descritos na secção "Criar uma nova conta de utilizador":

Abra o painel de controlo do Windows através do menu Start (Iniciar) e seleccione User Accounts (Contas de utilizador) > Manage Accounts (Gerir contas).

1. Seleccione Create a new account (Criar uma nova conta).



2. Dê um nome à conta e seleccione Standard User (Utilizador padrão) como o tipo de conta.



3. Clique em Create Account (Criar conta).

4.5 Requisitos da estação de trabalho

O computador portátil, fornecido opcionalmente com o Rotor-Gene Q MDx, cumpre os requisitos do software Rotor-Gene Q, detalhados na tabela seguinte.

Requisitos do sistema da estação de trabalho

Descrição	Requisitos mínimos
Sistema operativo	Microsoft® Windows® 10 Professional Edition (64 bits); Microsoft Windows 7 Professional Edition (32 ou 64 bits)* (Service Pack 1)
Processador	Intel® Core™ 2 Duo, 1,66 GHz ou superior
Memória principal	Mínimo de 1 GB de RAM
Espaço no disco rígido	Mínimo de 10 GB de HDD
Gráficos	Adaptador e ecrã com pelo menos 1200 x 800 píxeis
Portas	Porta de série RS-232 ou porta USB
Dispositivo apontador	É necessário um touchpad ou rato ou equivalente
Bluetooth	Deve estar desligado
Visualizador de PDF ou semelhante	Deve estar instalado; não faz parte dos pacotes de instalação do software
Opções de energia	Nunca desligar os discos rígidos, colocar em hibernação ou suspender

* É necessário o Microsoft Windows 10 ou Windows 7 Professional Edition para executar o software Rotor-Gene Q com funcionalidades de segurança (consulte a secção 6.9). As funcionalidades de segurança não estão disponíveis se estiver a ser utilizada a Home Edition do Windows 10 ou Windows 7.

† Quando utilizar o software Rotor-Gene AssayManager®, versão 1.0 ou 2.1, os seguintes requisitos mínimos do PC são diferentes: processador Intel Core i3-380M, memória principal com 4 GB de RAM, 250 GB de espaço no disco rígido, porta USB necessária.

4.6 Desembalagem e instalação do Rotor-Gene Q MDx

O Rotor-Gene Q MDx é fornecido com todos os componentes necessários para configurar e utilizar o instrumento. A caixa também contém uma lista de todos os componentes fornecidos.

Nota: Verifique esta lista para se certificar de que estão presentes todos os componentes.

Nota: Certifique-se de que o instrumento e os acessórios fornecidos não apresentam danos de transporte antes da instalação.

A caixa dos acessórios encontra-se no topo da espuma de proteção. A caixa dos acessórios contém:

- Guia de instalação (em inglês; traduções disponíveis no suporte de dados amovível fornecido com os manuais)
- Suporte de dados amovível (software)
- Suporte de dados amovível (manuais)
- Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes
- Rotor Holder (desmontado para transporte seguro)
- 36-Well Rotor (este rotor tem uma cor vermelha)
- 36-Well Rotor Locking Ring

Os itens seguintes encontram-se embalados nas laterais da espuma de proteção:

- USB e cabo de série RS-232
- Conjunto do cabo de alimentação internacional
- PCR Tubes, 0.2 ml (1000)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (1000)

Quando todos estes componentes tiverem sido removidos da caixa, retire a espuma de proteção no topo do Rotor-Gene Q MDx. Retire cuidadosamente o Rotor-Gene Q MDx da caixa e desembulhe a cobertura de plástico. Abra a tampa, deslizando-a em direção à parte traseira, para aceder à câmara de reação.

Os seguintes itens já estão instalados dentro do Rotor-Gene Q MDx:

- 72-Well Rotor (este rotor tem uma cor azul)
- 72-Well Rotor Locking Ring

Um computador portátil poderá estar incluído na embalagem, dependendo dos detalhes da sua encomenda.

4.6.1 Atualização do software

As atualizações de software estão disponíveis no site da QIAGEN em <https://www.qiagen.com/products/instruments-and-automation/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/>, que também pode ser acessado a partir do menu **Help** (Ajuda) no software. Para transferir o software, é necessário efetuar o registo online.

4.7 Acessórios

Os Rotor-Discs e os acessórios podem ser encomendados separadamente para utilização com o Rotor-Gene Q MDx. Para obter mais informações, consulte a secção 16.

4.8 Reembalagem e transporte do Rotor-Gene Q MDx

Ao reembalar o Rotor-Gene Q MDx para transporte, devem ser utilizados os materiais da embalagem original. Caso os materiais da embalagem original não sejam aplicáveis, contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN. Certifique-se de que o instrumento foi devidamente preparado (consulte Manutenção) antes de o embalar e de que não apresenta nenhum perigo biológico ou químico.

4.9 Preparação

4.9.1 Ligar o Rotor-Gene Q MDx e a estação de trabalho

Certifique-se de que o Rotor-Gene Q está ligado ao computador portátil por USB ou RS-232 e de que tanto o computador portátil como o Rotor-Gene Q estão ligados e ativados.

5 Procedimentos operacionais

Antes de continuar, recomendamos que se familiarize com as características do instrumento, consultando a secção 3.

<p>CUIDADO</p> 	<p>Danos no instrumento</p> <p>Utilize apenas células de fluxo e consumíveis QIAGEN com o Rotor-Gene Q MDx. Danos causados pela utilização de outros tipos de células de fluxo ou consumíveis anularão a garantia.</p>
---	---

<p>CUIDADO</p> 	<p>Risco de danos materiais</p> <p>Evite mover a bancada de trabalho e causar vibrações no Rotor-Gene Q MDx durante o funcionamento para evitar perturbar medições óticas sensíveis.</p>
---	---

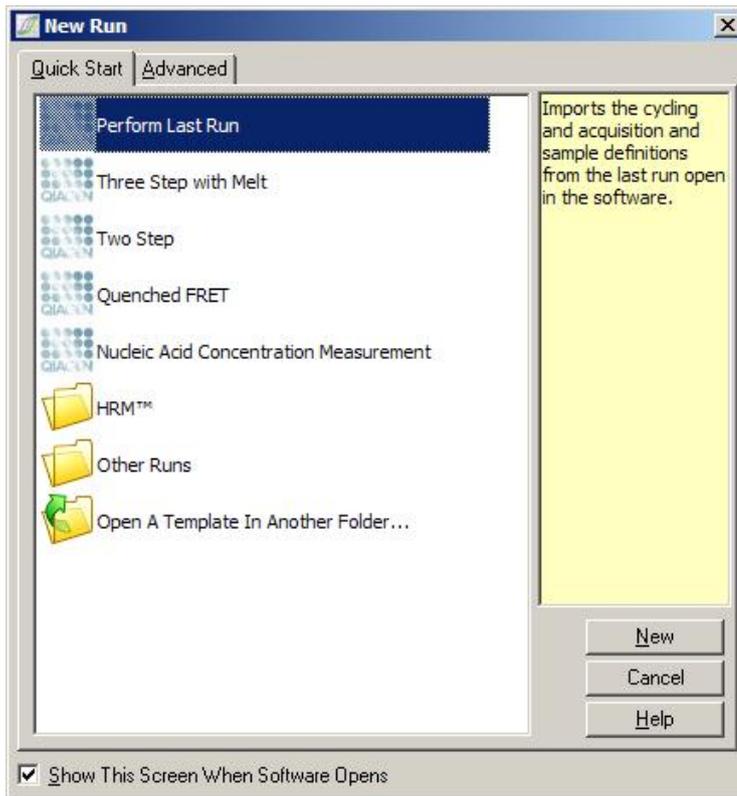
5.1 Utilização do software Rotor-Gene Q MDx

Podem ser configuradas novas execuções utilizando o assistente Quick Start (Instalação rápida) ou o assistente Advanced (Avançado), apresentados quando o software é iniciado. O assistente Quick Start (Instalação rápida) foi concebido para permitir que o utilizador inicie a execução o mais rapidamente possível. O assistente Advanced (Avançado) proporciona mais opções, como a configuração de otimização do ganho e definições de volume. Por questões de comodidade, os assistentes possuem vários modelos com condições de ciclagem e canais de aquisição predefinidos. Para alterar o tipo de assistente, selecione o separador adequado na parte superior da janela New Run (Nova execução).

5.1.1 Assistente Quick Start (Instalação rápida)

O assistente Quick Start (Instalação rápida) permite que o utilizador inicie a execução o mais rapidamente possível. O utilizador pode fazer uma seleção dentro de um conjunto de modelos mais comumente utilizados e introduzir os parâmetros mínimos para começar. O assistente Quick Start (Instalação rápida) assume que o volume de reação é 25 µl. Para outros volumes de reação, utilize o assistente Advanced (Avançado) (consulte a secção 5.1.2).

Como primeiro passo, selecione o modelo pretendido para a execução, clicando duas vezes no modelo da lista na janela New Run (Nova execução).



Perform Last Run (Realizar a última execução):

Perform Last Run (Realizar a última execução) utiliza as definições de amostra, aquisição e ciclagem da última execução aberta no software.

Three Step with Melt (Três passos com fusão):

Este é um perfil de ciclagem de três passos e uma curva de fusão com aquisição de dados no canal verde.

Two Step (Dois passos):

Este é um perfil de ciclagem de dois passos com dados adquiridos nos canais verde, amarelo, laranja e vermelho.

Quenched FRET (FRET supressora):

Este é um perfil de ciclagem de três passos e uma curva de fusão. Ao contrário de Three Step with Melt (Três passos com fusão), a aquisição ocorre no final do passo de hibridização.

Nucleic Acid Concentration Measurement (Medição da concentração de ácidos nucleicos):

Este é um modelo predefinido para medir a concentração de ácidos nucleicos utilizando corantes intercalados.

HRM:

Esta pasta contém perfis de fusão de alta resolução.

Other Runs (Outras execuções):

Esta pasta contém perfis adicionais.

Os perfis de ciclagem e de aquisição para todos os modelos podem ser alterados utilizando o assistente.

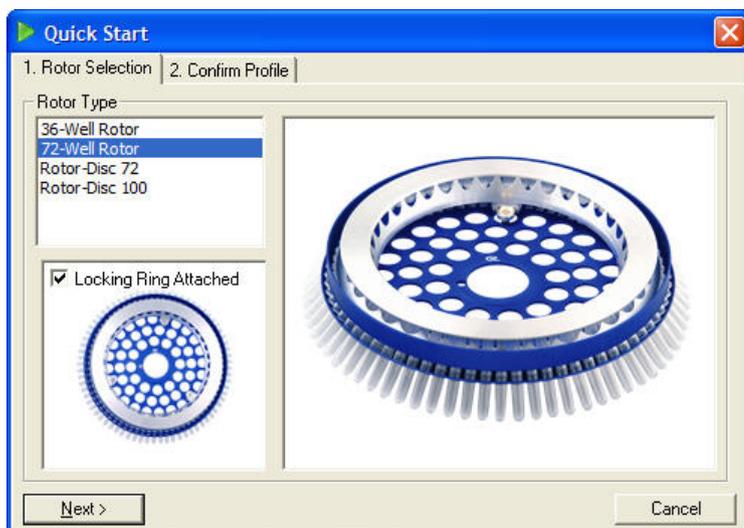
Nota: Os modelos definidos pelo utilizador podem ser adicionados à lista de modelos no assistente Quick Start (Instalação rápida) ao copiar ou guardar ficheiros *.ret em C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\Quick Start Templates. Depois de copiar um ficheiro para este caminho, o modelo irá aparecer como um ícone na lista. Se pretender personalizar ícones para os seus modelos, crie uma imagem *.ico com o mesmo nome do ficheiro do modelo.

As subpastas podem ser criadas para modelos relacionados a um grupo. Isto permite a organização dos modelos, o que pode ser conveniente se, por exemplo, vários utilizadores estiverem a utilizar o mesmo instrumento.

Seleção do rotor

Na janela seguinte, selecione o tipo de rotor na lista.

Marque a caixa de verificação Locking Ring Attached (Anel de bloqueio fixado) e clique em Next (Seguinte).



Confirmar perfil

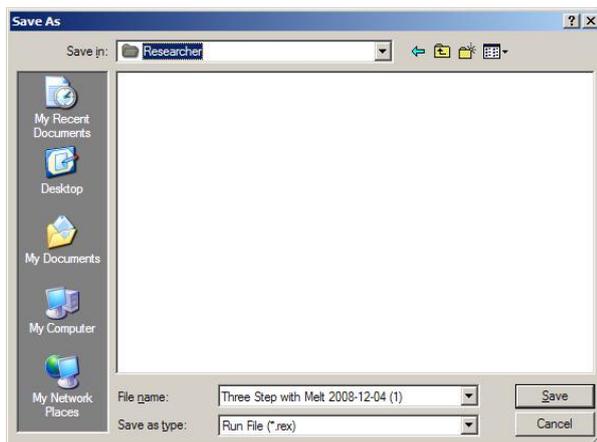
As condições de ciclagem e os canais de aquisição do modelo escolhido são importados. Estes podem ser alterados utilizando a janela Edit Profile (Editar perfil) (consulte a secção "Editar perfil").

Para iniciar uma execução, clique no botão Start Run (Iniciar execução). Também é possível guardar o modelo antes de iniciar a execução, clicando em Save Template (Guardar modelo).



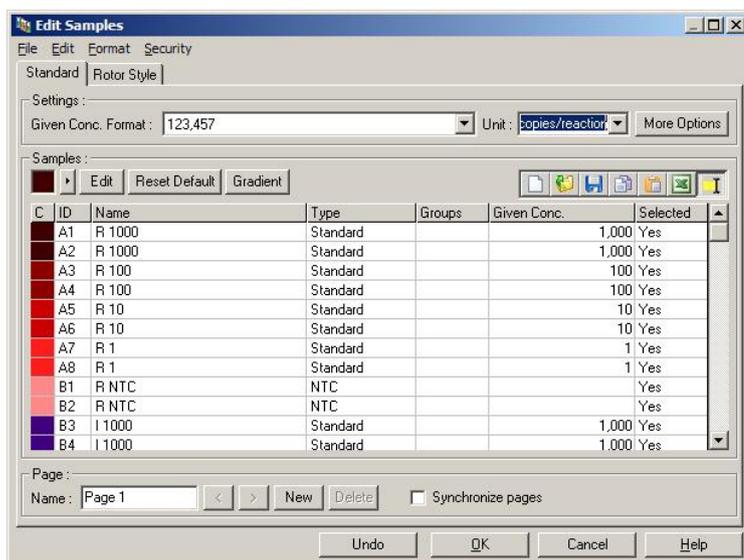
Guardar execução

Depois de clicar no botão Start Run (Iniciar execução), é apresentada a janela Save As (Guardar como). A execução pode ser guardada na localização pretendida pelo utilizador. É dado um nome de ficheiro à execução que consiste no modelo utilizado e na data da execução. Também está incluído um número de série (1, 2 etc.) no nome do ficheiro para permitir a designação automática de várias execuções que utilizam o mesmo modelo no mesmo dia.



Configuração da amostra

Após o início da execução, a janela Edit Samples (Editar amostras) permite que as amostras sejam definidas e descritas.

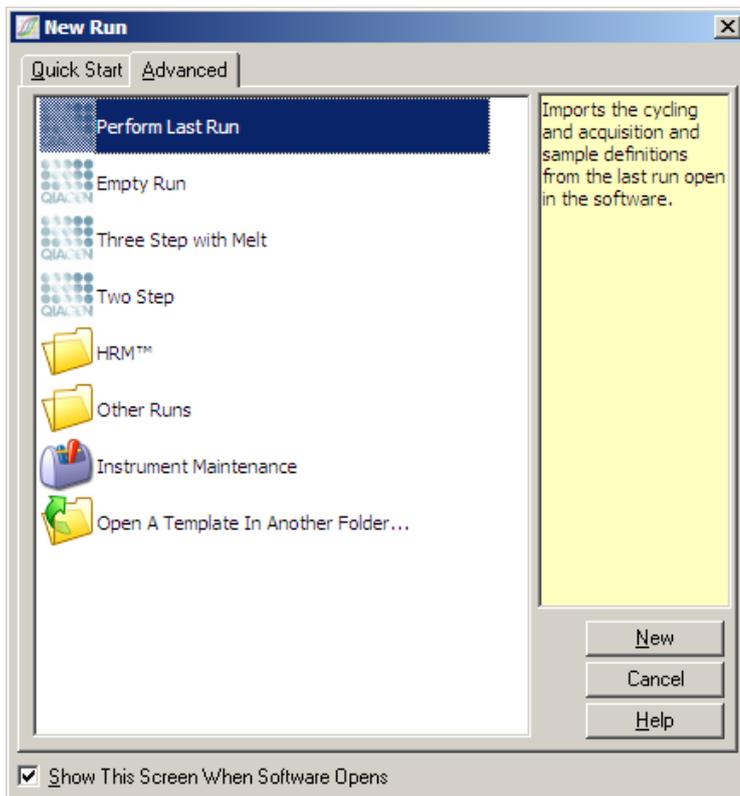


A janela Edit Samples (Editar amostras) é apresentada após o início da execução para que o utilizador possa utilizar este tempo para introduzir nomes de amostras. Se os nomes das amostras forem introduzidos muito rápido durante a execução (por exemplo, utilizando um leitor de código de barras), tal pode dar origem a letras transpostas nos nomes das amostras. Por isso, é recomendado que evite utilizar um leitor de código de barras e, se aplicável, introduza os nomes das amostras após a execução ter terminado. Para obter mais informações sobre a configuração das definições da amostra na janela Edit Samples (Editar amostras), consulte a secção 6.8.4.

5.1.2 Assistente Advanced (Avançado)

O assistente Advanced (Avançado) proporciona opções que não estão disponíveis no assistente Quick Start (Instalação rápida), como a configuração da otimização do ganho.

Para utilizar o assistente Advanced (Avançado), selecione um modelo clicando duas vezes no nome do modelo na lista do separador Advanced (Avançado) na janela New Run (Nova execução).



As opções de modelos fornecidas nesta janela são semelhantes às fornecidas quando se utiliza o assistente Quick Start (Instalação rápida) (secção 5.1.1).

Perform Last Run (Realizar a última execução):	Perform Last Run (Realizar a última execução) importa as definições de amostra, aquisição e ciclagem da última execução aberta no software.
Empty Run (Execução vazia):	Trata-se de uma execução vazia que permite ao utilizador definir todos os parâmetros do perfil.
Three Step with Melt (Três passos com fusão):	Este é um perfil de ciclagem de dois passos com aquisição de dados apenas no canal verde, para acelerar a execução.
HRM:	Esta pasta contém 2 perfis de fusão de alta resolução.
Other Runs (Outras execuções):	Esta pasta contém perfis adicionais.
Instrument Maintenance (Manutenção do instrumento):	Contém o modelo utilizado durante a verificação ótica de temperatura (Optical Temperature Verification, OTV). Para obter mais informações, consulte a secção 9. Este modelo está bloqueado para garantir que o perfil funciona sempre corretamente.

Nota: Os modelos definidos pelo utilizador podem ser adicionados à lista de modelos ao copiar ou guardar ficheiros *.ret em C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\. Depois de copiar um ficheiro para este caminho, o modelo irá aparecer como um ícone na lista.

Janela do assistente de nova execução 1

Na janela seguinte, selecione o tipo de rotor na lista.

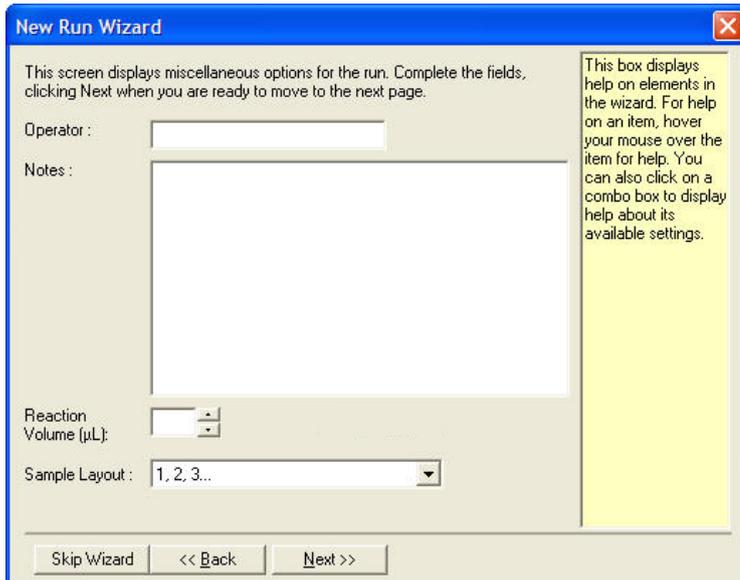
Marque a caixa de verificação Locking Ring Attached (Anel de bloqueio fixado) e clique em Next (Seguinte) para continuar.



Janela do assistente de nova execução 2

Na janela seguinte, é possível introduzir o nome do utilizador e as notas sobre a execução. Também deve ser introduzido o volume da reação.

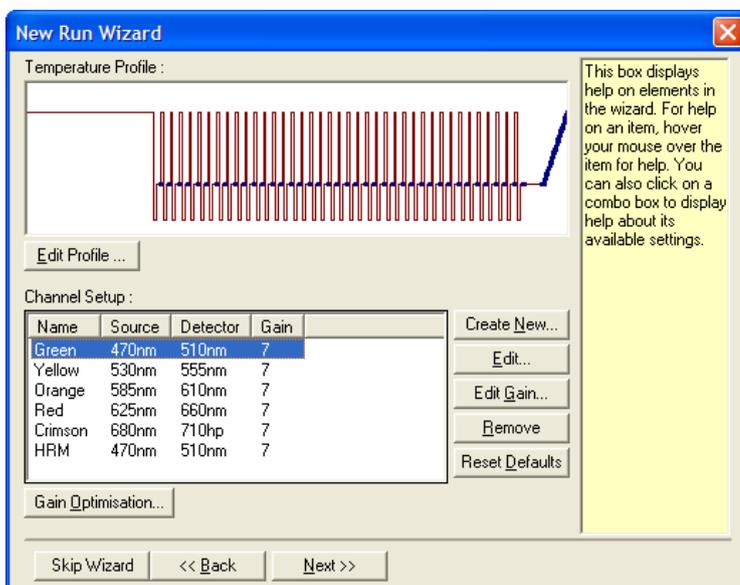
Se o 72-Well Rotor tiver sido selecionado na janela 1, estarão disponíveis três opções de Sample Layout (Disposição de amostras) no menu pendente. "1, 2, 3..." é a opção predefinida. A maioria dos utilizadores seleciona esta opção. A opção "1A, 1B, 1C..." deve ser selecionada quando as amostras forem carregadas em tubos de tiras de 0,1 ml adjacentes, utilizando uma pipeta multicanal com 8 canais. A disposição "A1, A2, A3..." pode ser selecionada, caso seja adequado.



Janela do assistente de nova execução 3

Nesta janela, é possível modificar Temperature Profile (Perfil de temperatura) e Channel Setup (Configuração de canais). Se clicar no botão Edit Profile... (Editar perfil), é apresentada a janela Edit Profile (Editar perfil), que permite a alteração das condições de ciclagem e a seleção dos canais de aquisição (secção Editar perfil).

Depois de configurar o perfil, clique no botão Gain Optimisation... (Otimização do ganho...) para apresentar a janela Gain Optimisation (Otimização do ganho) correspondente (consulte a página 61).



Editar perfil

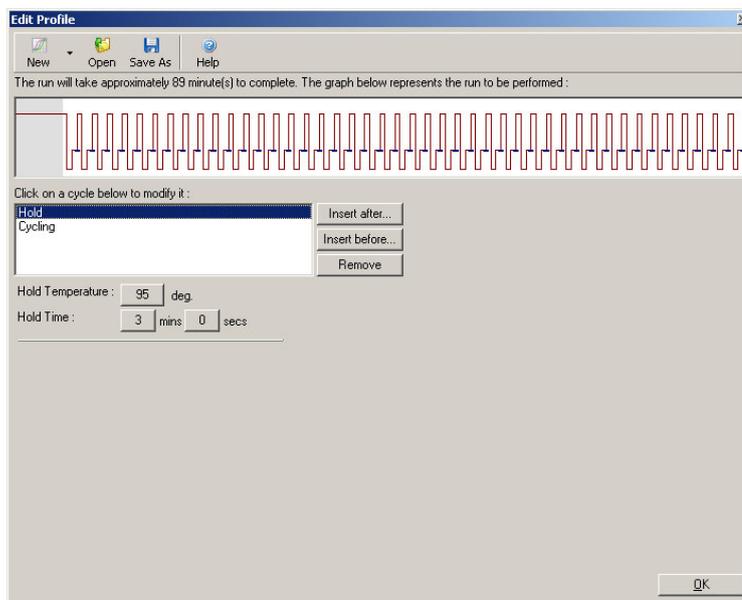
A janela Edit Profile (Editar perfil) permite que as condições de ciclagem e os canais de aquisição sejam especificados. O perfil inicial mostrado é baseado no modelo selecionado aquando da configuração da execução (consulte a página 45). O perfil é apresentado graficamente. A lista dos segmentos do perfil é apresentada abaixo da apresentação gráfica. Esta lista pode incluir Em espera (página 53), Ciclagem (página 54), Fusão (página 54) ou HRM se o instrumento possuir um canal HRM (página 57).

Todos os passos do perfil podem ser editados clicando na área correspondente da apresentação gráfica ou no nome na lista e alterando, em seguida, as definições que são apresentadas.

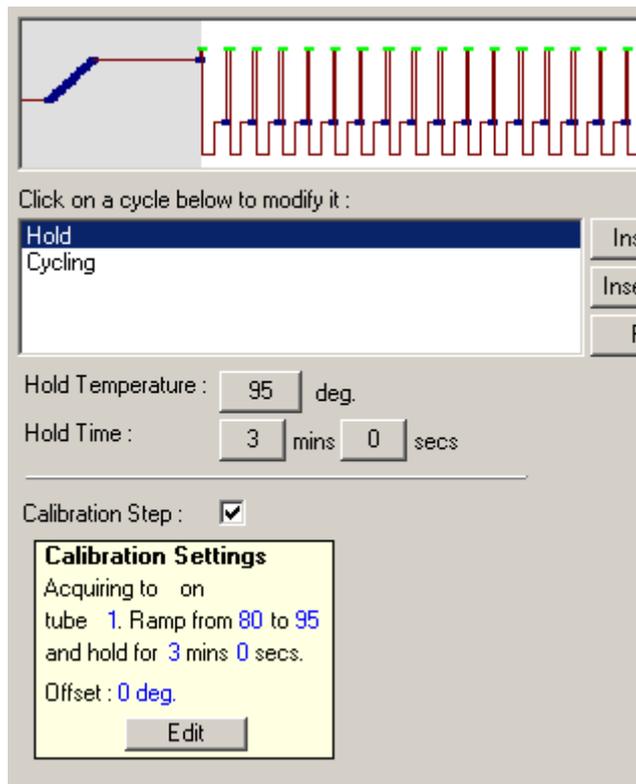
- Insert after... (Inserir após...): Permite a adição de um novo ciclo após o ciclo selecionado.
Insert before... (Inserir antes...): Permite a adição de um novo ciclo antes do ciclo selecionado.
Remove (Remover): Remove o ciclo selecionado do perfil.

Em espera

A opção Hold (Em espera) indica ao Rotor-Gene Q MDx para permanecer à temperatura determinada durante um período de tempo. Para alterar a temperatura, clique no botão Hold Temperature (Temperatura em espera) e introduza manualmente ou utilize a barra deslizante para selecionar a temperatura pretendida. Para alterar a duração da opção Hold (Em espera), clique nos botões Hold Time (Tempo de espera), mins (min) e secs (s).



Se estiver a realizar uma ciclagem de desnaturação ótica, é possível utilizar uma espera como um passo de calibração. Neste caso, é efetuada uma fusão de calibração antes da espera. Por predefinição, tal está configurado para a primeira espera na execução, mas pode ser alterado se necessário.



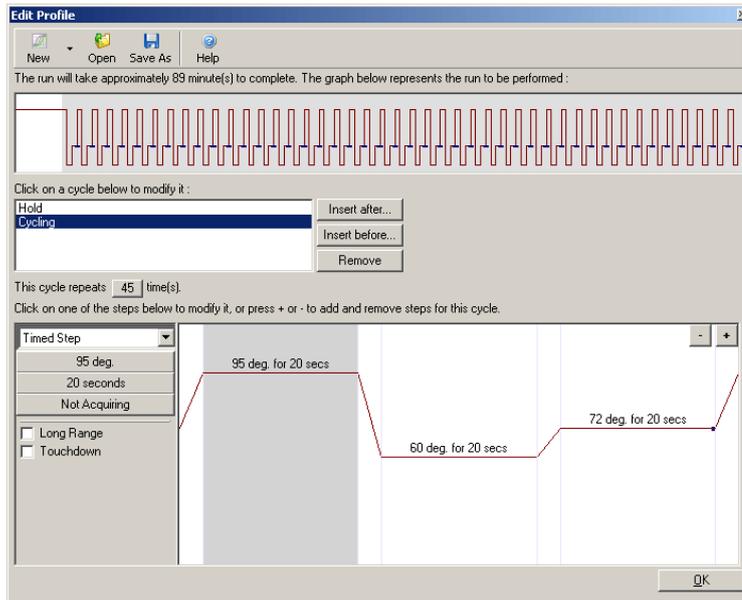
Para obter mais informações acerca da ciclagem de desnaturação ótica, consulte a página 57.

Ciclagem

A ciclagem repete as etapas de tempo e temperatura definidas pelo utilizador o número de vezes que for especificado. O número de repetições é definido utilizando o botão This cycle repeats X time(s) (Este ciclo repete-se X vez[es]).

Um ciclo único é apresentado graficamente (conforme mostrado na captura de ecrã adiante). Todos os passos do ciclo podem ser alterados. A temperatura pode ser alterada movendo a linha da temperatura no gráfico para cima ou para baixo. A duração da etapa pode ser alterada movendo o limite da temperatura no gráfico para a esquerda ou para a direita. Em alternativa, clique na etapa e utilize os botões de temperatura e de tempo à esquerda do gráfico.

Podem ser adicionadas ou removidas etapas do ciclo utilizando os botões "-" e "+" no canto superior direito do gráfico.



Long Range (Aumento do tempo de espera):

Marcar esta caixa de verificação aumenta o tempo de espera da etapa selecionado 1 s a cada ciclo.

Touchdown (Diminuição da temperatura):

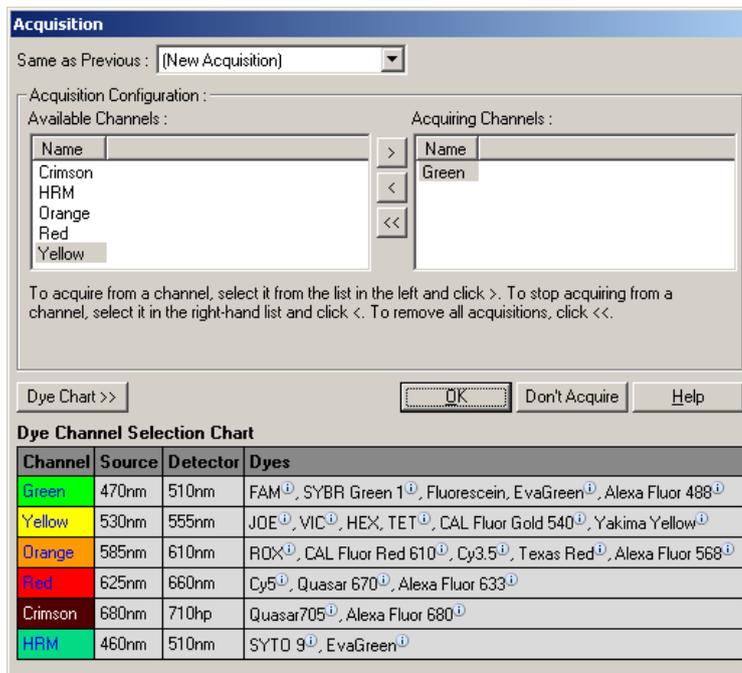
Marcar esta caixa diminui a temperatura um número de graus especificado para um número de ciclos iniciais especificados. Em seguida, tal é apresentado no ecrã.

Aquisição

Os dados podem ser adquiridos em qualquer canal em qualquer passo da ciclagem. Para definir um canal para adquirir dados, clique no botão Not Acquiring (Não adquirir dados) (se já tiver sido definido um canal para adquirir dados neste passo, os canais de aquisição são apresentados aqui).



Depois de clicar no botão Not Acquiring (Não adquirir dados), é apresentada a janela Acquisition (Aquisição).



Para definir um canal de aquisição, selecione o canal e mova-o da lista "Available Channels" (Canais disponíveis) para a lista "Acquiring Channels" (Canais de aquisição) utilizando o botão **>**. Para remover um canal selecionado da lista "Acquiring Channels" (Canais de aquisição), utilize o botão **<**. O botão **<<** remove todos os canais da lista "Acquiring Channels" (Canais de aquisição). Clicar no botão Don't Acquire (Não adquirir) também remove todas as aquisições do passo.

Se estiver incluída mais do que uma sequência de ciclagem no perfil, os dados adquiridos podem ser anexados aos dados adquiridos na ciclagem anterior. Utilize o menu pendente Same as Previous (Igual ao anterior) para selecionar o passo de ciclagem ao qual devem ser anexados os dados.

O Dye Channel Selection Chart (Gráfico de seleção do canal de corante) ajuda o utilizador a decidir qual é o canal mais adequado para o corante que pretende utilizar. Os corantes apresentados na tabela são aqueles que são comumente utilizados e não indicam os limites do instrumento.

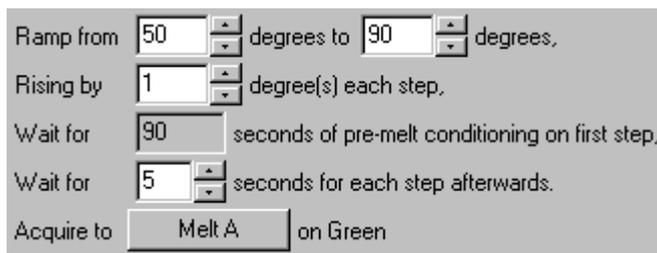
As opções de aquisição descritas acima também são aplicáveis aos passos de fusão, com exceção de que não é possível anexar dados de aquisição utilizando o menu Same as Previous (Igual ao anterior).

Fusão e hibridação

Uma fusão corresponde a uma rampa entre 2 temperaturas, desde uma temperatura mais baixa até uma mais elevada. O intervalo de temperaturas permitido é 35–99 °C.

Para configurar uma fusão, especifique a temperatura inicial, a temperatura final, os incrementos de temperatura, a duração do tempo de espera na primeira temperatura de aquisição antes de a rampa ser iniciada, o tempo pelo qual deve ser mantido cada incremento e os canais de aquisição.

Será gerada uma rampa entre as 2 temperaturas. Se a temperatura inicial for superior à temperatura final, o nome do passo irá mudar para Hybridisation (Hibridação). A opção Acquiring To (Adquirir para), definida para Melt A (Fusão A) na captura de ecrã abaixo, pode ser alterada clicando no botão. A janela Acquisition (Aquisição) será apresentada e os canais podem ser seleccionados.



Ramp from 50 degrees to 90 degrees,
Rising by 1 degree(s) each step,
Wait for 90 seconds of pre-melt conditioning on first step,
Wait for 5 seconds for each step afterwards.
Acquire to Melt A on Green

Na execução de uma fusão padrão, a temperatura aumenta em incrementos de 1 °C, com uma espera de 5 segundos antes de cada aquisição. O Rotor-Gene Q MDx pode ser configurado para efetuar fusões em incrementos de 0,02 °C. O tempo de espera mínimo entre as etapas de temperatura varia dependendo do número de graus entre cada etapa.

Fusão de alta resolução

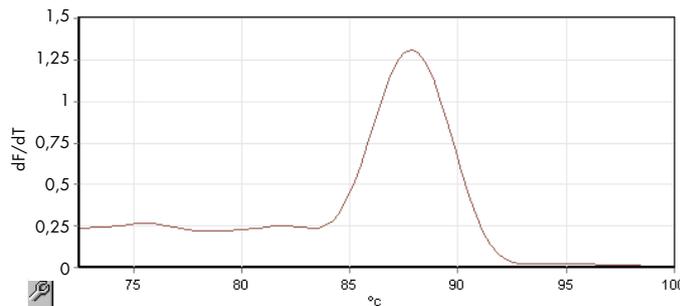
A análise de fusão de alta resolução (High Resolution Melt, HRM) caracteriza amostras de ADN de cadeia dupla com base no seu comportamento de dissociação (fusão). É semelhante à tradicional análise da curva de fusão, mas fornece muito mais informações para uma vasta gama de aplicações. As amostras podem ser discriminadas de acordo com a sequência, comprimento, conteúdo de GC ou complementaridade da cadeia até alterações de pares de base únicos.

A análise de HRM apenas pode ser efetuada em instrumentos que possuem hardware ou software de HRM instalado. Os dados são adquiridos utilizando fontes e detetores de HRM especializados. A análise de HRM também inclui a opção de efetuar otimização do ganho mesmo antes de a fusão começar. Após efetuar HRM, os dados podem ser analisados com software de análise de HRM (secção 10).

Ciclagem de desnaturação ótica

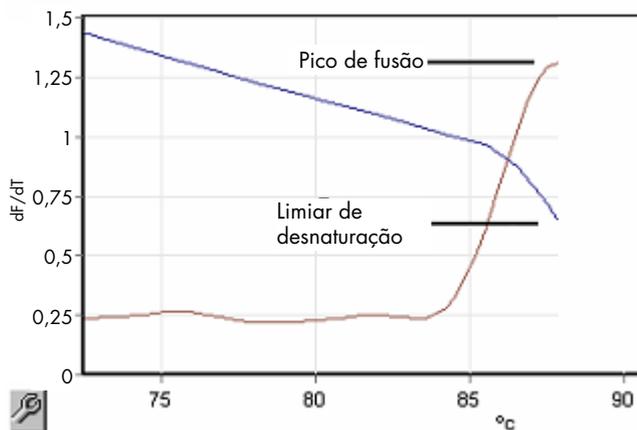
A ciclagem de desnaturação ótica é uma técnica interessante, disponível no Rotor-Gene Q MDx, que efetua análises de fusão em tempo real para determinar o pico de fusão de uma amostra de referência. Isto sinaliza a desnaturação de um produto de PCR com maior precisão do que determinar uma temperatura de desnaturação específica para um tempo de espera. Para efetuar esta técnica, basta que coloque um tubo de referência do produto de PCR na posição do tubo 1 do rotor. O tubo de referência também deve conter um químico de deteção que permita a deteção da dissociação da cadeia.

Ao aquecer até à temperatura de desnaturação inicial, é efetuada uma fusão no canal verde dos 80 aos 95 °C, por predefinição. Os parâmetros desta fusão inicial podem ser ajustados pelo utilizador. A partir destes dados, uma curva de fusão é gerada e automaticamente analisada.



O pico de fusão é referenciado de volta para os dados não processados para obter um limiar de desnaturação. Em seguida, em todos os passos da ciclagem de desnaturação ótica, o instrumento é aquecido o mais rapidamente possível e os dados são adquiridos continuamente. Quando o tubo de referência tiver atingido o nível de fluorescência do limiar de desnaturação, o instrumento é imediatamente arrefecido e avança para o passo programado seguinte no ciclo. Não é calculado um pico durante a ciclagem. Em vez disso, o nível de fluorescência é referenciado para o pico de fusão e isto designa o limiar de desnaturação.

No gráfico seguinte, as leituras de fluorescência não processadas e o primeiro derivado foram sobrepostos. Isto mostra a correspondência entre o limiar de desnaturação e o pico de fusão obtido durante a calibração.



Para efetuar a ciclagem de desnaturação ótica, irá precisar de:

- Um produto de PCR pré-amplificado para colocar na posição 1 do rotor. Esta amostra deve conter o mesmo produto de PCR que as amostras de interesse e um químico de detecção para monitorizar a dissociação do produto de PCR.
- Um perfil de desnaturação ótica. É possível criar um novo perfil ou editar um perfil existente (consulte as informações adiante).

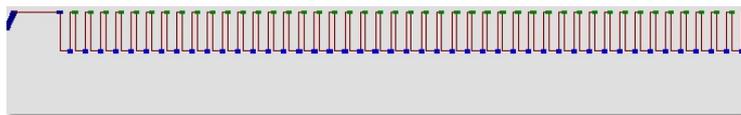
Um ciclo de desnaturação ótica parece quase idêntico a outros ciclos. As principais diferenças consistem no passo de fusão automaticamente inserido no início do perfil e o perfil acentuado do passo de desnaturação durante a ciclagem. O ciclo de desnaturação ótica não requer tempos de espera estabelecidos dado que a dissociação do produto é monitorizada a cada ciclo.

Para efetuar esta técnica, são necessárias as seguintes informações sobre a execução:

- A temperatura de desnaturação inicial. Esta é a mesma temperatura do passo de desnaturação num perfil de ciclagem padrão.
- A posição do tubo da amostra de PCR que irá produzir uma curva de fusão no canal verde.
- Deve ser definido um perfil de ciclagem de desnaturação ótica.

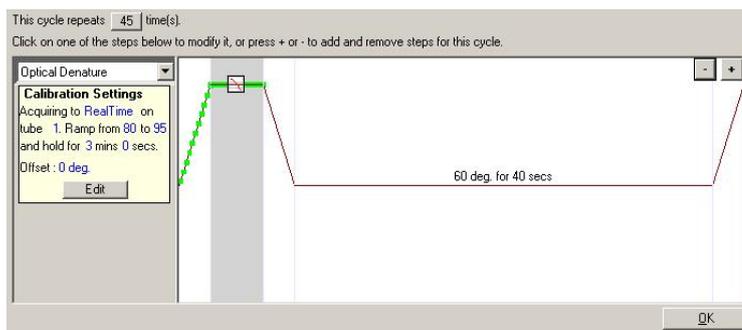
Crie um novo ciclo de desnaturação ótica da seguinte forma.

1. Abra a janela Edit Profile (Editar perfil). Em seguida, clique em New (Novo). Na janela apresentada, clique no botão Insert after (Inserir após) e selecione New Cycling (Nova ciclagem) no menu. Selecione uma das etapas de temperatura clicando no gráfico. No menu pendente, altere Timed Step (Passo programado) para Optical Denature (Desnaturação ótica). Será apresentado um perfil predefinido que contém um passo de desnaturação e um passo do ciclo de desnaturação ótica.

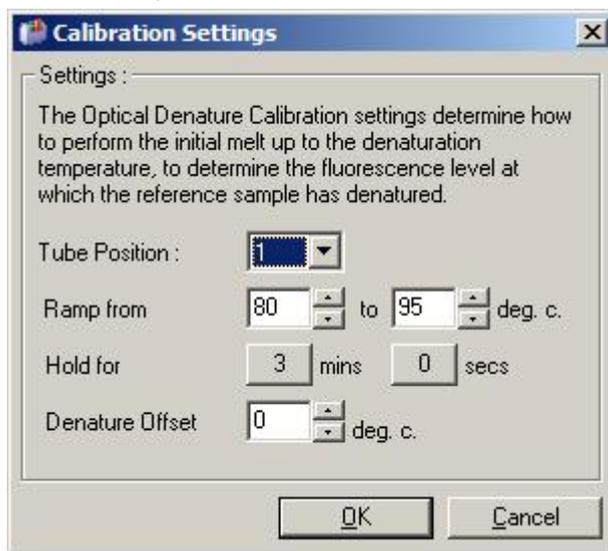


A região de rampa no início da execução representa o processo de calibração. Os pontos verdes representam as aquisições executadas em cada ciclo durante o aquecimento. Os pontos azuis representam a aquisição no final da etapa de hibridização a 60 °C. Tenha em atenção que embora o perfil mostre cada etapa com a mesma temperatura de desnaturação, este pode não ser o caso. Se a amostra necessitar de um pouco mais de tempo para a fusão na parte final da execução, o processo de desnaturação ótica aguarda pela fusão, em função dos dados de fluorescência e não em função do tempo. Por este motivo, o gráfico da temperatura pode variar em cada ciclo.

2. Clique na primeira metade do gráfico com o símbolo de desnaturação ótica . As informações de Calibration Settings (Definições de calibração) são apresentadas no lado esquerdo do ecrã.

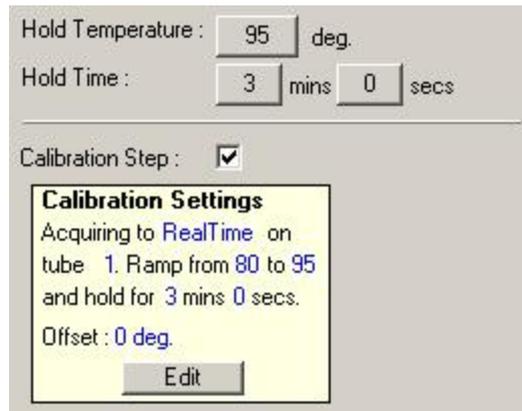


3. As informações de "Calibration Settings" (Definições de calibração) estão normalmente corretas. Para as modificar, se necessário, clique em Edit (Editar). A janela Calibration Settings (Definições de calibração) é apresentada.



4. Certifique-se de que:
- O tubo indicado em Tube Position (Posição do tubo) contém um produto de PCR que irá mostrar um pico de fusão no canal verde.
 - A temperatura da rampa final não irá queimar a amostra, mas será suficientemente elevada para que a fusão ocorra.
 - O tempo de espera é suficiente para desnaturar a amostra.
 - O desvio da desnaturação é definido de forma adequada. A predefinição de 0 °C é adequada para a maioria das fusões. As fusões com transições muito acentuadas podem necessitar de um desvio de desnaturação de -0,5 °C a -2 °C, conforme determinado pelo utilizador, para garantir que a transição da fusão é detetada.

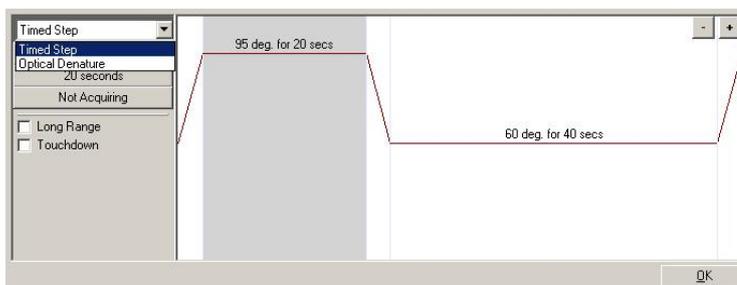
Também é possível definir um passo de desnaturação introduzindo um novo passo de espera. Clique em Insert before (Inserir antes) e selecione New Hold at Temperature (Nova temperatura em espera) no menu. Serão apresentadas as definições de calibração.



As definições de calibração são sincronizadas com as definições de desnaturação, logo uma alteração no tempo de espera no passo de desnaturação irá automaticamente atualizar o tempo de espera da calibração. Isto ocorre porque o processo de calibração e a desnaturação são equivalentes na ciclagem de desnaturação ótica.

Alterar um passo existente para utilizar a ciclagem de desnaturação ótica

Para alterar um passo de desnaturação existente numa sequência de ciclagem, selecione o ciclo na lista na janela Edit Profile (Editar perfil). Em seguida, selecione o passo de desnaturação, clicando no mesmo no ecrã.



Clique no menu pendente e selecione Optical Denature (Desnaturação ótica). A temperatura e o tempo de espera são removidos e o ícone Optical Denature (Desnaturação ótica)  é apresentado.

Otimização do ganho

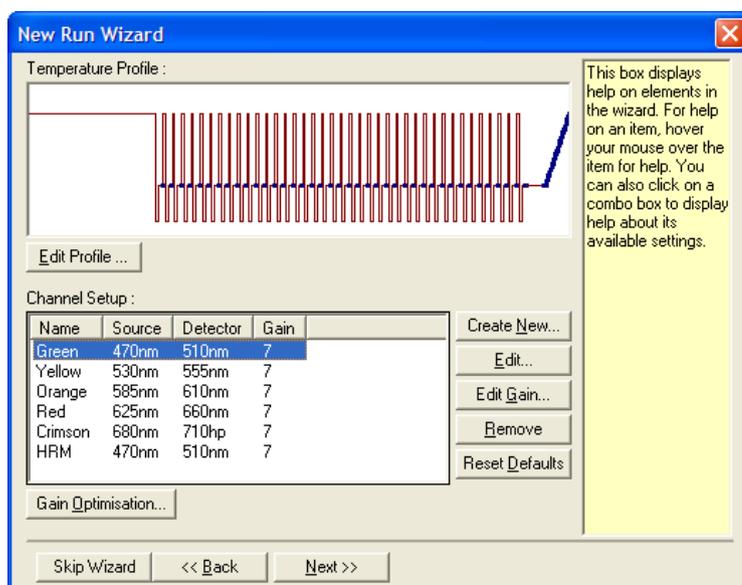
Ao configurar uma nova execução, é útil utilizar a função Gain Optimisation (Otimização do ganho). Tal permite-lhe otimizar o ganho para uma definição que irá fornecer o intervalo pretendido de fluorescência inicial a uma temperatura definida (normalmente a temperatura a que a aquisição de dados ocorre) em cada um dos canais a ser adquirido. O objetivo da otimização

do ganho é assegurar que todos os dados são recolhidos dentro do intervalo dinâmico do detetor. Se o ganho for demasiado baixo, o sinal será perdido no ruído de fundo. Se o ganho for demasiado alto, o sinal será perdido fora da escala (saturação).

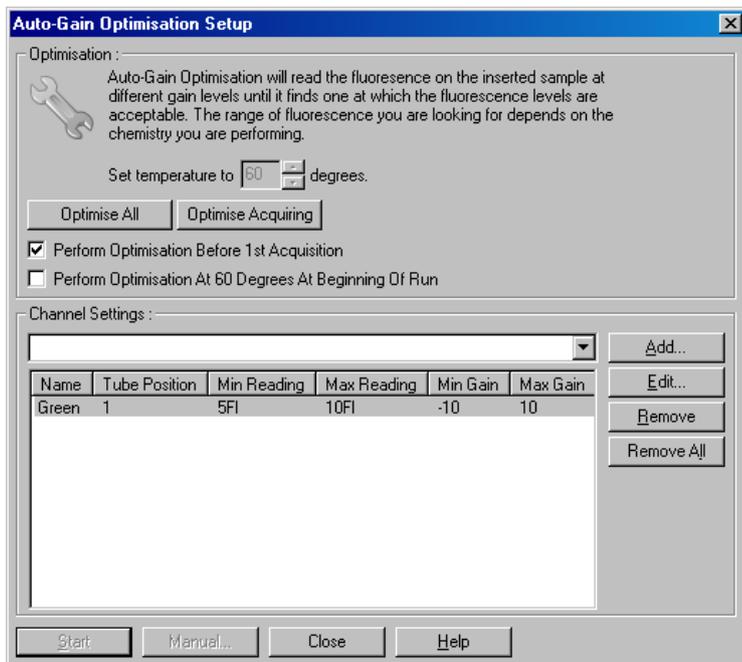
O intervalo de ganho para cada canal é entre -10 e 10, no qual -10 é o menos sensível e 10 é o mais sensível.

Ao executar reações pela primeira vez, recomendamos que prepare uma amostra de teste que contenha todos os componentes da reação. Coloque a amostra de teste no Rotor-Gene Q MDx e utilize a otimização do ganho para determinar a melhor definição de ganho. Se o ganho escolhido pela otimização do ganho resultar num sinal fraco, o Target Sample Range (Intervalo de amostras-alvo) deve ser aumentado. Se tal resultar num sinal saturado, o Target Sample Range (Intervalo de amostras-alvo) deve ser diminuído.

Para efetuar a otimização do ganho, clique no botão Gain Optimisation... (Otimização do ganho...) na janela do assistente de nova execução 3 (consulte Janela do assistente de nova execução 3).



É apresentada a janela Auto-Gain Optimisation Setup (Configuração da otimização do ganho automático). Esta janela permite a otimização ajustando automaticamente as definições de ganho até que as leituras para todos os canais selecionados estejam dentro ou abaixo de um certo limiar.



Set temperature to (Definir temperatura para):

Antes da leitura, o Rotor-Gene Q MDx será aquecido ou arrefecido para corresponder à temperatura especificada. Por predefinição, isto é definido como a temperatura de aquisição.

Optimise All/Optimise Acquiring (Otimizar todos/Otimizar aquisição):

Optimise All (Otimizar todos) irá tentar otimizar todos os canais conhecidos pelo software. Optimise Acquiring (Otimizar aquisição) irá apenas otimizar os canais que são utilizados no perfil térmico definido na execução (ciclagem e fusão).

Perform Optimisation Before First Acquisition (Efetuar otimização antes da primeira aquisição):

Selecione esta caixa para efetuar a Gain Optimisation (Otimização do ganho) no primeiro ciclo no qual ocorre a aquisição de dados. Isto é recomendado para a otimização do ganho automático.

Perform Optimisation At [x] Degrees At Beginning of Run (Efetuar otimização a [x] graus no início de cada execução):

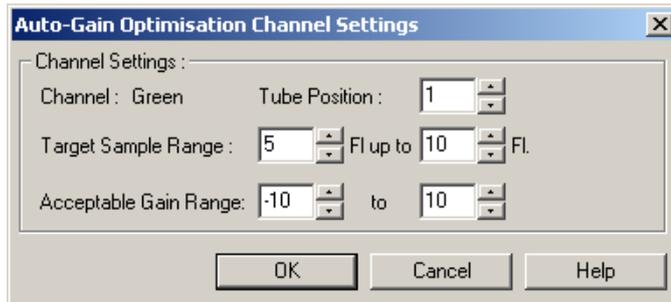
Marque esta caixa para efetuar a otimização do ganho antes de iniciar a execução. O Rotor-Gene Q MDx aquece até à temperatura especificada, a otimização do ganho é efetuada e, em seguida, começa a ciclagem no primeiro passo, normalmente um passo de desnaturação. Esta opção poderá ser escolhida caso uma otimização do ganho durante a execução resulte em demasiado tempo despendido no passo inicial. Normalmente é preferível Perform Optimisation Before 1st Acquisition (Efetuar otimização antes da primeira aquisição) porque a otimização do ganho é efetuada o mais próximo possível das condições de execução.

Channel Settings (Definições dos canais):

Este menu pendente permite que sejam adicionados canais. Escolha o canal de interesse e clique em Add (Adicionar).

Edit (Editar):

Abre uma janela na qual pode ser definido o Target Sample Range (Intervalo de amostras-alvo). O Target Sample Range (Intervalo de amostras-alvo) consiste no intervalo de fluorescência inicial que pode ser definido para a amostra no tubo especificado. A otimização do ganho automático lê todos os canais utilizando definições de ganho no intervalo especificado pelo Acceptable Gain Range (Intervalo de ganho aceitável). Escolhe a primeira definição de ganho que resulta numa leitura de fluorescência dentro do Target Sample Range (Intervalo de amostras-alvo). No exemplo mostrado, a otimização do ganho automático procura uma definição de ganho entre -10 e 10 que forneça uma leitura entre 5 e 10 FI no tubo 1. De forma geral, para corantes intercalados, um Target Sample Range (Intervalo de amostras-alvo) de 1-3 FI é adequado, enquanto um intervalo de 5-10 é mais adequado para químicos de sonda.

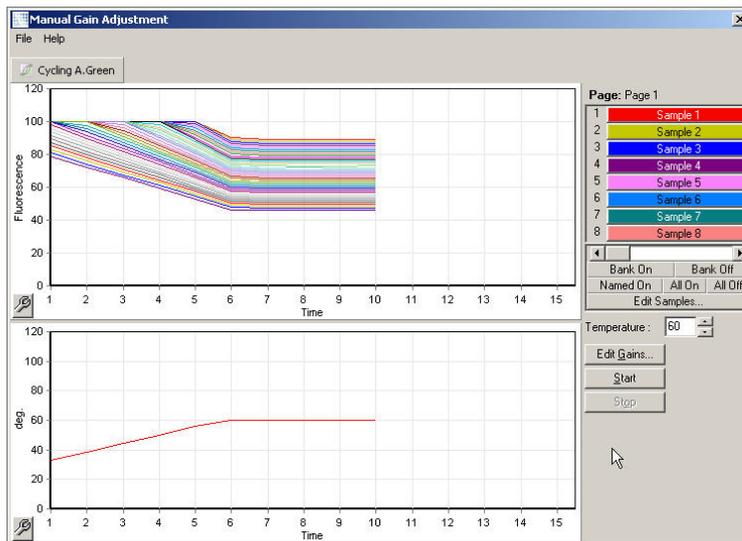


Remove/Remove All (Remover/Remover todos):	Remove (Remover) remove o canal realçado. Remove All (Remover todos) remove todos os canais.
Start (Iniciar):	Start (Iniciar) inicia a otimização do ganho. É escolhido um ganho que resulta em níveis de sinal de fluorescência dentro do intervalo especificado. Se a fluorescência ficar fora do intervalo especificado, o ganho é definido para fornecer a correspondência mais próxima possível.
Manual:	Abre a janela Manual Gain Adjustment (Ajuste manual do ganho).
Changing Gain During a Run (Alterar o ganho durante uma execução):	Se o ganho no início de uma execução for demasiado alto ou demasiado baixo, pode ser alterado nos primeiros dez ciclos. É apresentada uma linha vertical onde o ganho foi alterado. Os ciclos anteriores à alteração são excluídos da análise.

Nota: A otimização do ganho pode escolher uma definição que não se insere no intervalo especificado. Tal pode acontecer devido a alterações na fluorescência após o primeiro passo de espera. Contudo, o resultado da otimização do ganho fornece uma boa indicação do nível de fluorescência em que a execução será iniciada.

Ajuste manual do ganho

Para efetuar um "Manual Gain Adjustment" (Ajuste manual do ganho), clique em Manual... na janela Auto-Gain Optimisation Setup (Configuração da otimização do ganho automático). É apresentada a janela Manual Gain Adjustment (Ajuste manual do ganho). Esta janela apresenta as leituras de fluorescência a qualquer temperatura em tempo real. É utilizada quando o fundo de uma amostra é desconhecido e, portanto, o ganho deve ser determinado para assegurar que o sinal da amostra é suficiente para ser detetado.



Por predefinição, todas as amostras são apresentadas no ecrã. As amostras podem ser removidas ou adicionadas ao ecrã utilizando o botão de alternância à direita. O botão de alternância consiste em células coloridas, sendo que cada uma corresponde a uma amostra no ecrã. As amostras com uma célula com cores vivas são apresentadas, enquanto as amostras com uma célula com cores esbatidas não são apresentadas. As amostras podem ser ligadas e desligadas clicando na célula ou arrastando o ponteiro do rato sobre várias células ao mesmo tempo.

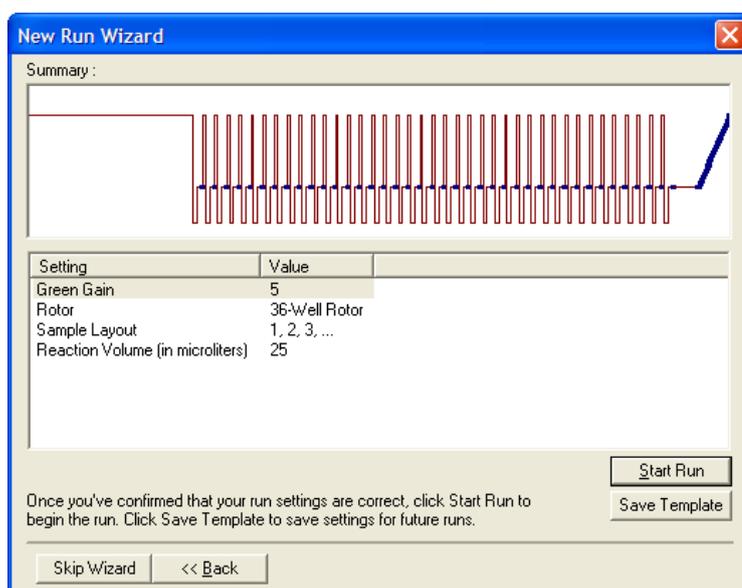
Recomendamos que efetue o Manual Gain Adjustment (Ajuste manual do ganho) da seguinte forma.

1. Ajuste a temperatura na janela Manual Gain Adjustment (Ajuste manual do ganho) para a temperatura de aquisição necessária para a execução.
 Nota: A temperatura não será ajustada enquanto o Rotor-Gene Q MDx estiver em funcionamento. Reinicie o Rotor-Gene Q MDx para aplicar as alterações feitas à temperatura.
2. Clique em Start (Iniciar). A execução é iniciada. A temperatura do Rotor-Gene Q MDx é ajustada para a temperatura especificada na janela. Os gráficos na janela começam a apresentar dados.
3. Espere que a temperatura estabilize.
4. Tenha em atenção a leitura de fluorescência (FI) de ponto final.
5. Se a leitura de FI não estiver no nível exigido, clique em Edit Gains... (Editar ganhos...) e edite conforme necessário. Este processo pode não ser imediato, dado que o Rotor-Gene Q MDx demora aproximadamente 4 s para adquirir cada ponto em cada canal e durante este tempo a interface do utilizador está desativada.
6. Repita o processo até que a FI esteja no nível pretendido.

- Clique em Stop (Parar). Se a execução ainda estiver a adquirir dados quando clica no botão Stop (Parar), o Rotor-Gene Q MDx termina primeiro a aquisição e, em seguida, para. Este processo pode demorar até 5 s para cada canal de aquisição.

Janela do assistente de nova execução 4

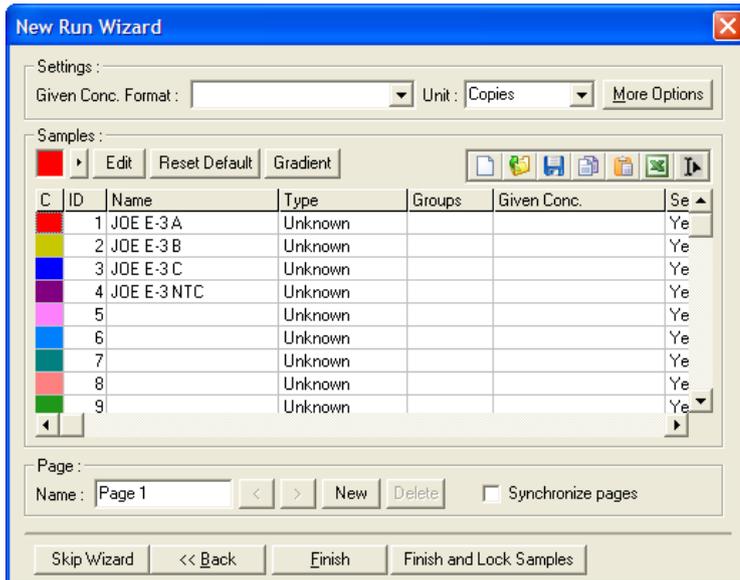
Esta janela resume a execução. Verifique os parâmetros e, se estiverem corretos, clique em Start Run (Iniciar execução). Será solicitado um nome de ficheiro. Também pode guardar as definições da execução como um modelo para execuções futuras utilizando o botão Save Template (Guardar modelo).



Janela do assistente de nova execução 5

Introduza tipos de amostra e descrições nesta janela enquanto a execução está a decorrer. A funcionalidade desta janela é semelhante à da janela Edit Samples (Editar amostras) (página 128). As informações da amostra também podem ser introduzidas após a conclusão de cada execução.

O botão Finish and Lock Samples (Concluir e bloquear amostras) fecha o ecrã e evita que os nomes das amostras sejam modificados. Para obter mais informações sobre esta e outras funcionalidades de segurança, consulte "Proteção de acesso ao software Rotor-Gene Q" (página 134).



5.2 Utilização do hardware do Rotor-Gene Q MDx

5.2.1 Tipos de rotor

Primeiro, selecione que tipo de tubo e de rotor pretende utilizar. Existem 4 rotores disponíveis para acomodar diferentes tipos de tubos.

Nota: O 36-Well Rotor e o 72-Well Rotor são fornecidos com o instrumento. Os Rotor-Disc® Rotors são acessórios.

Importante: Utilize tubos semelhantes numa execução. Não misture diferentes tipos de tubos ou tubos de diferentes fabricantes, dado que isto irá afetar a uniformidade ótica. Recomendamos a utilização de tubos da QIAGEN especificamente concebidos para utilização com o Rotor-Gene Q MDx (consulte Informações de encomenda). Os tubos de fabricantes alternativos podem autofluorescer, o que poderá afetar a fiabilidade dos resultados. Além disso, os tubos de fabricantes alternativos podem variar em comprimento e espessura, resultando no desalinhamento da trajetória ótica do Rotor-Gene Q MDx e reação no tubo. A QIAGEN reserva-se o direito de recusar assistência técnica a problemas induzidos por materiais plásticos não certificados pela QIAGEN no instrumento Rotor-Gene Q MDx.

Importante: A utilização de materiais plásticos não certificados pela QIAGEN no Rotor-Gene Q MDx poderá anular a garantia do instrumento.

CUIDADO**Danos no instrumento**

Inspeccione visualmente e certifique-se de que o rotor não está danificado ou deformado antes de cada execução.

36-Well Rotor

O 36-Well Rotor tem uma cor vermelha. O 36-Well Rotor e o 36-Well Rotor Locking Ring permitem a utilização de tubos de 0,2 ml. Os tubos não precisam de ter tampas transparentes dado que o Rotor-Gene Q MDx lê a fluorescência a partir do fundo do tubo e não a partir do topo. Também podem ser utilizados tubos com tampa arredondada.

**72-Well Rotor**

O 72-Well Rotor tem uma cor azul. O 72-Well Rotor e o 72-Well Rotor Locking Ring são utilizados com Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, que podem ser utilizados para volumes com um mínimo de 20 µl. As tampas dispõem de um vedante fiável e seguro.



Rotor-Disc 72 Rotor

O Rotor-Disc 72 Rotor tem uma cor cinzenta. O Rotor-Disc 72 Rotor e o Rotor-Disc 72 Locking Ring permitem a utilização do Rotor-Disc 72. O Rotor-Disc 72 consiste num disco com 72 poços para utilização de elevado rendimento. Para selar o Rotor-Disc 72 é aplicada uma película de polímero transparente no topo e selada a quente. A película aplica-se rapidamente e previne a contaminação, proporcionando um vedante forte, duradouro e à prova de adulteração. Para obter mais informações acerca do Rotor-Disc 72, consulte a secção 5.2.3.



Rotor-Disc 100 Rotor

O Rotor-Disc 100 Rotor tem uma cor dourada. O Rotor-Disc 100 Rotor e o Rotor-Disc 100 Locking Ring permitem a utilização do Rotor-Disc 100. O Rotor-Disc 100 consiste num disco com 100 poços para utilização de elevado rendimento. O Rotor-Disc 100 corresponde ao equivalente rotativo de uma placa de 96 poços com 4 poços de referência adicionais. Facilita a integração do Rotor-Gene Q MDx com fluxos de trabalho laboratoriais de 96 poços. Os poços adicionais podem ser oportunamente utilizados para mais amostras, reações de controlo adicionais ou reações de orientação, sem ocupar nenhuma das posições dos 96 poços padrão. Para uma compatibilidade perfeita do fluxo de trabalho de 96 poços, os poços do Rotor-Disc 100 utilizam as convenções de etiquetagem da placa de 96 poços, ou seja, de A1–A12 até H1–H12. Os 4 poços de referência adicionais estão etiquetados como R1–R4. Para obter mais informações acerca do Rotor-Disc 100, consulte a secção 5.2.3.



Especificações do rotor

Tipo de rotor	Capacidade do poço (µl)	N.º da amostra	Tipo de tubo	Volume de reação recomendado (µl)
36-Well Rotor	200	36	PCR Tubes, 0.2 ml	20–50
72-Well Rotor	100	72	Strip Tubes and Caps, 0.1 ml	20–50
Rotor-Disc 72 Rotor	100	72	Rotor-Disc, 72	20–25
Rotor-Disc 100 Rotor	30	100	Rotor Disc, 100	15–20

Nota: O 36-Well Rotor e o 72-Well Rotor para o Rotor-Gene Q MDx não devem ser utilizados em instrumentos Rotor-Gene 3000, devido a incompatibilidades de alinhamento ótico. Continue a utilizar os rotores antigos de 36 posições e 72 posições com instrumentos Rotor-Gene 3000.

5.2.2 Configuração da reação

Importante: Devem ser utilizados controlos adequados em cada execução para garantir resultados fiáveis.

As reações podem ser preparadas utilizando o Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes (para PCR Tubes, 0.2 ml), o Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (para Strip Tubes and Caps, 0.1 ml preparados com uma pipeta de um canal), o Loading Block 72 x 0.1 ml Multi-channel (para Strip Tubes and Caps, 0.1 ml preparados com uma pipeta multicanal), o Rotor-Disc 72 Loading Block (para o Rotor-Disc 72) ou o Rotor-Disc 100 Loading Block (para o Rotor-Disc 100). Todos os blocos são feitos de alumínio e podem ser pré-arrefecidos.

O Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (na imagem) contém 18 tubos de tiras assim como até oito tubos de 0,5 ml, que podem ser utilizados para preparar uma mistura principal e até dezasseis tubos de 0,2 ml, que podem ser utilizados para definir curvas-padrão. O procedimento abaixo descreve a configuração da reação utilizando o 72-Well Rotor. O mesmo procedimento pode ser utilizado para a configuração da reação utilizando o 36-Well Rotor e os acessórios adequados.

1. Coloque os tubos de tiras no bloco de carregamento e prepare uma alíquota dos componentes da reação.

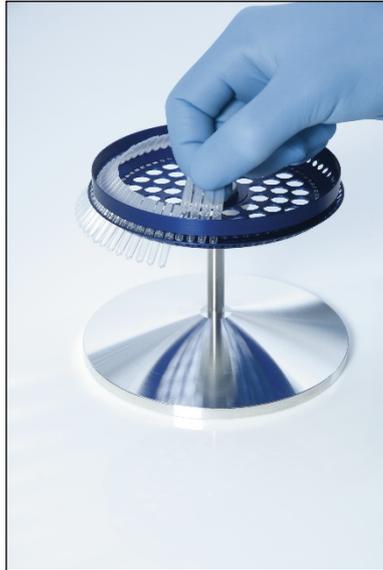


2. Coloque as tampas nos tubos de tiras de forma segura e inspecione visualmente para confirmar que estão bem selados.



3. Insira os tubos de tiras no 72-Well Rotor, certificando-se de que cada tubo se encontra colocado corretamente e na orientação correta.

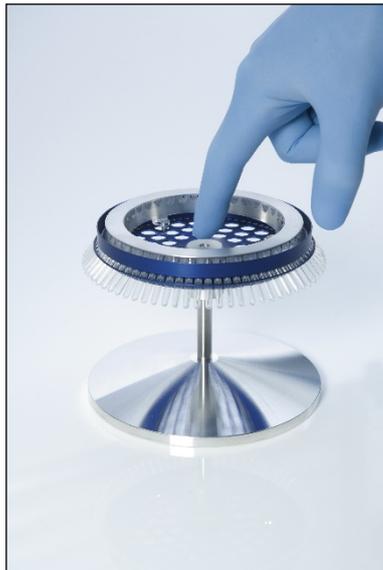
As amostras não serão alinhadas de forma otimizada no sistema de detecção se não estiverem corretamente colocadas no rotor. Isto pode resultar numa diminuição do sinal de fluorescência adquirido, assim como da sensibilidade da detecção. É fornecido um Rotor Holder que permite o carregamento fácil dos tubos.



Importante: Para garantir o máximo de uniformidade de temperatura, todas as posições do rotor têm de ter um tubo. Preencher todas as posições do rotor garante uma corrente de ar uniforme em todos os tubos. Tenha disponível um conjunto de tubos tapados vazios, que possam ser utilizados para preencher posições não utilizadas.

4. Insira o 72-Well Rotor Locking Ring no 72-Well Rotor empurrando os 3 pinos de fixação através dos orifícios externos do rotor.

O anel de bloqueio assegura que as tampas permanecem nos tubos durante uma execução.



5. Insira o conjunto na câmara do Rotor-Gene Q MDx encaixando-o devidamente no lugar, utilizando o pino de fixação no cubo do rotor. Para remover, basta empurrar o cubo do rotor para baixo para libertar o conjunto e puxá-lo para fora.



6. Feche a tampa e configure o perfil de execução utilizando o software Rotor-Gene Q.

5.2.3 Configuração do Rotor-Disc

O Rotor-Disc 72 ou Rotor-Disc 100 são constituídos por 72 ou 100 poços, respetivamente, num disco de uma peça concebido para elevado rendimento. O Rotor-Disc 72 e o Rotor-Disc 100 não utilizam tampas. Alternativamente, é aplicado o Rotor-Disc Heat Sealing Film no topo e selado a quente utilizando o Rotor-Disc Heat Sealer. A película previne a contaminação pois proporciona um vedante forte, duradouro e à prova de adulteração. A selagem a quente do Rotor-Disc é efetuada da seguinte forma descrita abaixo.

Importante: Leia o folheto do produto fornecido com o Rotor-Disc Heat Sealer antes de iniciar este procedimento.

1. Ligue o Rotor-Disc Heat Sealer utilizando o interruptor localizado na parte traseira do lado esquerdo. Acende-se uma luz vermelha "Power" (Alimentação). O Rotor-Disc Heat Sealer demora cerca de 10 min a atingir a temperatura de funcionamento até acender uma luz verde "Ready" (Pronto).
2. Escolha entre uma selagem permanente ou removível.
Nota: Quando o Rotor-Disc Heat Sealer estiver pronto, é seguro deixá-lo em execução continuamente.
3. Insira o Rotor-Disc no Rotor-Disc Loading Block utilizando a aba na posição um no Rotor-Disc e os orifícios guia para os tubos no Rotor-Disc Loading Block.

- Configure as reações no Rotor-Disc pipetando manualmente ou utilizando um sistema automático de tratamento de líquidos.



- Remova a parte central de uma folha do Rotor-Disc Heat Sealing Film, dobrando ligeiramente a película ao meio, apertando a parte central e retirando-a cuidadosamente.
- Coloque a película sobre o Rotor-Disc na orientação correta, conforme indicado pela etiqueta "SIDE UP" (LADO PARA CIMA). Certifique-se de que a etiqueta "SIDE UP" (LADO PARA CIMA) está posicionada no fundo do Rotor-Disc Loading Block.

O orifício no centro da película deve deslizar facilmente sobre o cilindro do Rotor-Disc Loading Block e para o topo do Rotor-Disc.



7. Deslize o conjunto para dentro do Rotor-Disc Heat Sealer utilizando as calhas guia nas laterais do Rotor-Disc Loading Block. Certifique-se de que o Rotor-Disc Loading Block está totalmente inserido.



8. Para ativar o mecanismo de selagem, primeiro prima a barra anodizada a azul no topo do Heat Sealer e, em seguida, empurre o trinco preto para trás.



9. Quando o mecanismo de selagem tiver baixado, acende-se uma luz laranja "Sealing" (A selar). Caso o Rotor-Disc Loading Block não esteja na posição correta, é emitido um sinal sonoro de aviso.
10. Quando a selagem estiver concluída, é emitido um sinal sonoro contínuo e a luz laranja "Sealing" (A selar) torna-se intermitente. Prima a barra anodizada a azul para levantar e libertar o mecanismo de selagem de volta à sua posição original.

Importante: Não continue a selagem durante mais tempo do que o indicado pelo sinal sonoro, caso contrário o Rotor-Disc pode deformar.

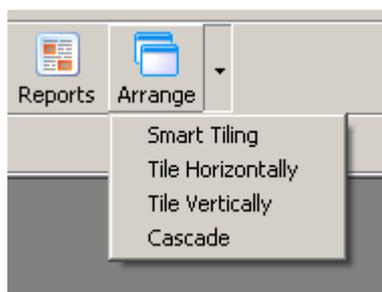
Nota: Para o avisar, caso acidentalmente não liberte o mecanismo de bloqueio, a luz laranja intermitente "Sealing" (A selar) irá acender permanentemente e o sinal sonoro contínuo irá tornar-se intermitente.

11. Deslize o Rotor-Disc Loading Block para fora do Rotor-Disc Heat Sealer. Deixe a película arrefecer durante aproximadamente 10 s. Remova o excesso de película vedante ao empurrá-la para baixo, para a separar. Não puxe o excesso de película em sentido ascendente.
12. Remova o Rotor-Disc do Rotor-Disc Loading Block.
13. Carregue o Rotor-Disc no rotor, utilizando a aba posicionadora na posição um como guia para a orientação correta.

6 Interface gráfica do utilizador

6.1 Espaço de trabalho

O espaço de trabalho é o fundo da janela principal. Nesta área, podem ser abertos gráficos de dados não processados e resultados de análises. Se estiverem abertas várias janelas simultaneamente, estas podem ser organizadas clicando no botão Arrange (Dispor) na barra de ferramentas. Existem várias opções de disposição da janela disponíveis que podem ser selecionadas, clicando na seta para baixo ao lado do botão Arrange (Dispor).



6.2 Barra de ferramentas

Estes botões são atalhos para operações utilizadas frequentemente. Estas operações também podem ser acedidas a partir dos menus pendentes.



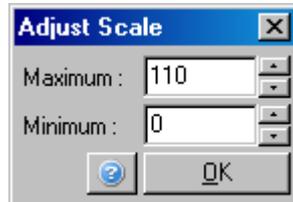
6.3 Visualizar canais não processados

Clique nestes botões para visualizar os dados não processados (não analisados) de canais específicos na execução.



Ao visualizar estes dados, existem várias opções disponíveis para alterar a apresentação dos dados. Os dados não processados também podem ser transformados para facilitar diferentes tipos de análises.

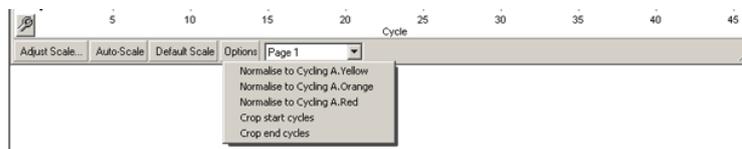
Adjust Scale (Ajustar escala): Para seleccionar Adjust Scale (Ajustar escala), clique com o botão direito do rato na janela apropriada. Adjust Scale (Ajustar escala) abre uma janela na qual pode ser especificada a escala.



Autoscale (Escala automática): Autoscale (Escala automática) tenta ajustar a escala às leituras máxima e mínima dos dados.

Default Scale (Escala predefinida): Default Scale (Escala predefinida) repõe a escala para apresentar de 0 até 100 unidades de fluorescência.

Ícone da chave inglesa: Consulte a secção 7.5 para obter mais informações.



Options (Opções): Apresenta o menu pendente mostrado acima, que fornece opções para a transformação de dados não processados.

Normalise to... (Normalizar para...): Permite a normalização de dados de amplificação para dados de um corante de referência passiva, como ROX, adquiridos noutra canal.

Crop start cycles (Eliminar ciclos de início): Cria um novo conjunto de dados do canal no qual alguns ciclos de início foram removidos. Isto é útil se forem observados grandes saltos nos ciclos iniciais, que podem ocorrer quando são utilizados certos químicos.

Crop end cycles (Eliminar ciclos de fim): Cria um novo conjunto de dados do canal no qual alguns ciclos de fim foram removidos.

Page 1 (Página 1): Indica a página atualmente selecionada para apresentar os gráficos dos dados não processados. A janela Edit Samples (Editar amostras) permite a criação de várias definições de amostras. Por exemplo, os dados podem ser visualizados com espessura de linha, definições de amostra e outras opções de apresentação variáveis. Isto é particularmente útil se for realizada a quantificação relativa num único canal, dado que o utilizador pode facilmente alternar a visualização entre o gene de interesse e as amostras constitutivas definindo 2 páginas de amostras.

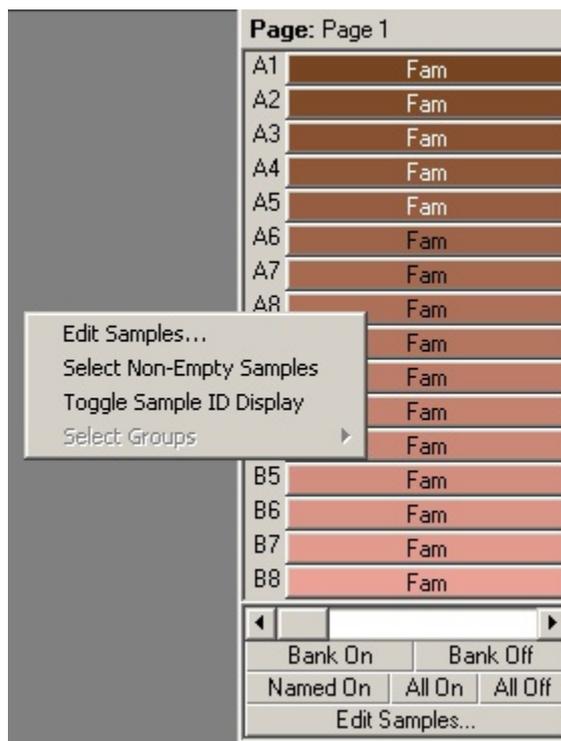
6.4 Alternar entre amostras

No lado direito da janela principal existe um botão de alternância que inclui uma legenda das amostras. Esta consiste em células coloridas, sendo que cada uma corresponde a uma amostra no ecrã. O botão de alternância é utilizado para controlar que amostras são apresentadas no ecrã. As amostras com uma célula com cores vivas são apresentadas, enquanto as amostras com uma célula com cores esbatidas não são apresentadas. As amostras podem ser ligadas e desligadas clicando na célula ou arrastando o ponteiro do rato sobre várias células ao mesmo tempo. Os botões Bank On (Banco ligado) e Bank Off (Banco desligado) apresentam ou ocultam, respetivamente, todas as amostras atualmente visíveis na lista. A barra de deslocamento pode ser utilizada para apresentar o grupo de amostras seguinte.

Nota: O número de amostras apresentadas é dinâmico e depende do espaço disponível na janela.

Clicar em **Named On** (Denominado em) mostra apenas as amostras às quais foi atribuído um nome. Esta é uma forma rápida de mostrar apenas amostras relevantes. Clicar em **All On** (Todas ligadas) ou **All Off** (Todas desligadas) apresenta todas ou nenhuma das amostras do rotor, respetivamente. Premir o botão **Edit Samples...** (Editar amostras...) abre a janela **Edit Samples** (Editar amostras) na qual podem ser editados os nomes, os tipos e as concentrações-padrão das amostras (consulte a secção 6.8.4).

O botão de alternância é mostrado abaixo. As opções adicionais apresentadas aparecem ao clicar com o botão direito do rato sobre o botão de alternância.

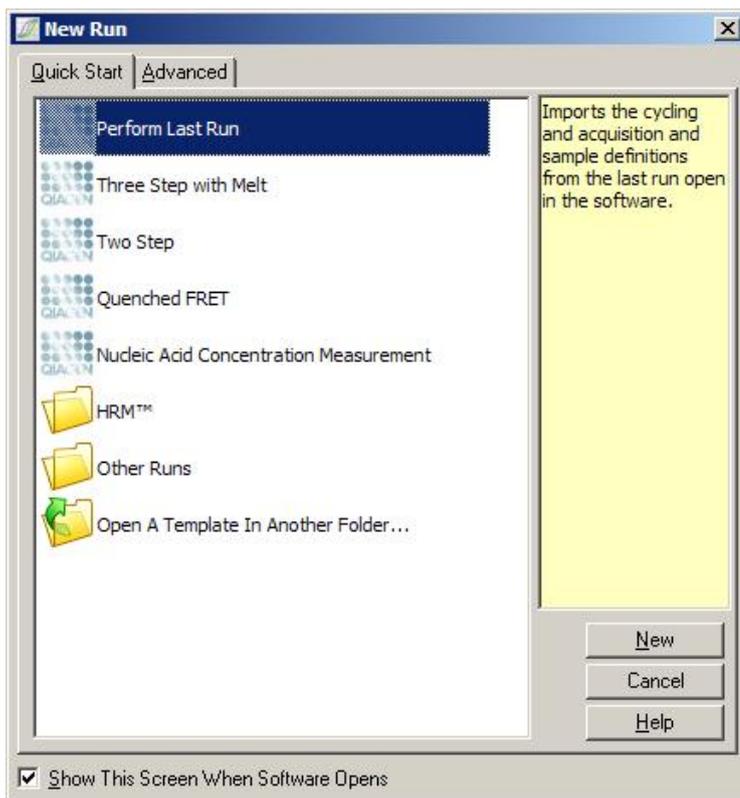


- Page (Página):** Esta etiqueta na parte superior do botão de alternância indica a página de amostras em apresentação. As páginas possibilitam análises independentes variadas de um conjunto de dados de um canal. Por exemplo, pode executar duas curvas-padrão no canal verde e gerar relatórios independentes. Estão disponíveis mais informações acerca da configuração das páginas de amostras na secção 6.8.4.
- Toggle Sample ID Display (Alternar apresentação da ID da amostra):** Se for utilizado um 72-Well Rotor, as amostras são apresentadas no formato A1 a A8, B1 a B8 etc. A opção **Toggle Sample ID Display** (Alternar apresentação da ID da amostra) permite que o utilizador altere a apresentação para uma ordenação numérica das amostras (1 a 72).
- Select Non-Empty Samples (Selecionar amostras não vazias):** Esta opção desmarca qualquer amostra que tenha o **Type** (Tipo) especificado como **None** (Nenhum) na janela **Edit Samples** (Editar amostras). Isto assegura que apenas são apresentadas amostras relevantes para a análise.
- Select Groups (Selecionar grupos):** Se tiver grupos definidos, esta funcionalidade irá alternar (ativar/desativar) a apresentação de amostras nos grupos. Os grupos consistem em colheitas de amostras arbitrárias que permitem a comunicação avançada de resultados estatísticos. Por exemplo, podem ser definidos grupos de amostras de doentes tratados e não tratados. Os grupos podem ser definidos na janela **Edit Samples** (Editar amostras).

6.5 Menu de ficheiros

6.5.1 Novo

Depois de seleccionar File (Ficheiro) e, em seguida, New (Novo), é apresentada a janela New Run (Nova execução). Esta janela fornece modelos comumente utilizados, organizados nos separadores Quick Start (Instalação rápida) e Advanced (Avançado). Quando o modelo estiver seleccionado, o assistente guia-o pela configuração da execução e permite a modificação de definições e perfis.



Para obter mais informações sobre os modelos fornecidos, consulte as secções 5.1.1 e 5.1.2.

Nova execução

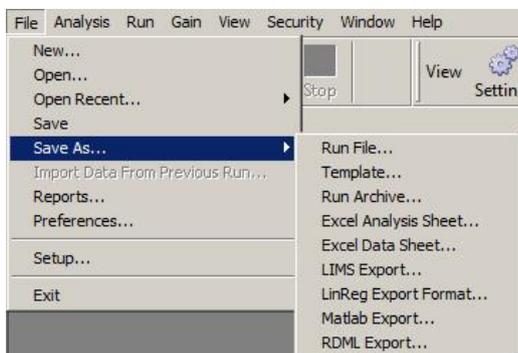
New (Novo):	Inicia a configuração da execução utilizando o modelo seleccionado.
Cancel (Cancelar):	Fecha a janela.
Help (Ajuda):	Abre a ajuda online.
Show This Screen When Software Opens (Mostrar este ecrã quando o software abre):	Se esta caixa de verificação estiver marcada, a janela New Run (Nova execução) será apresentada quando o software for iniciado.

6.5.2 Abrir e guardar

Open... (Abrir...): Abre um ficheiro de execução do Rotor-Gene Q previamente guardado (*.rex) ou um arquivo de execução Rotor-Gene Q (ficheiro *.rea).

Open Recent... (Abrir recente...): Apresenta os últimos 4 ficheiros que foram abertos ou guardados.

Save (Guardar): Guarda as alterações que foram feitas a um ficheiro de execução.



Save As... (Guardar como...): Utilize esta funcionalidade para guardar um ficheiro ou dados de execução em vários formatos. As opções estão listadas abaixo.

Run File... (Ficheiro de execução...): Guarda uma cópia do ficheiro. O utilizador pode alterar o nome e a localização de gravação. Este é o formato predefinido.

Template... (Modelo...): Guarda a configuração do perfil e as definições associadas, mas não os dados de execução. O modelo pode ser utilizado para iniciar execuções futuras.

Run Archive... (Arquivo de execução...): Guarda num formato de ficheiro mais compacto. Guarde os ficheiros neste formato antes de os enviar por e-mail. Isto diminui o tempo necessário para enviar o ficheiro e assegura que os ficheiros não são corrompidos por clientes do e-mail.

LIMS Export (Exportação para o LIMS): Guarda a análise em formatos compatíveis com o LIMS, de acordo com os requisitos do utilizador. Contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN para obter mais informações.

Excel Data Sheet... (Folha de dados do Excel...): Exporta todos os canais não processados para uma folha do Excel®. Apenas são exportadas as amostras selecionadas.

Excel Analysis Sheet... (Folhas de análise do Excel...): Exporta todas as análises na execução atual para uma folha do Excel.

LinReg Export Format... (Formato de exportação do LinReg): Exporta todos os dados não processados do canal para um formato que pode ser lido pelo LinReg (uma ferramenta de análise de eficiência). Consulte "Exportar para o LinReg" abaixo para obter mais informações.

Matlab Export... (Exportação Matlab): Exporta os dados para um formato que pode ser lido pelo pacote científico Matlab (ou o seu equivalente de código aberto, Octave). Isto pode ser útil para pesquisa de métodos.

RDML Export (Exportação para o RDML): Fornece a exportação de um ficheiro compatível com o RDML v1.1. O ficheiro de exportação RDML criado consiste num ficheiro comprimido ZIP de formato XML, com uma extensão de ficheiro *.rdml e é compatível com o documento de esquema RDML (https://rdml.org/rdml_v_1_1.html) fornecido no site https://rdml.org/rdml_v_1_1.html.

Exportar para o LinReg

O LinReg é uma ferramenta desenvolvida por C. Ramakers e os seus colegas. * A ferramenta LinReg está disponível em <https://medischebiologie.nl/files/>.

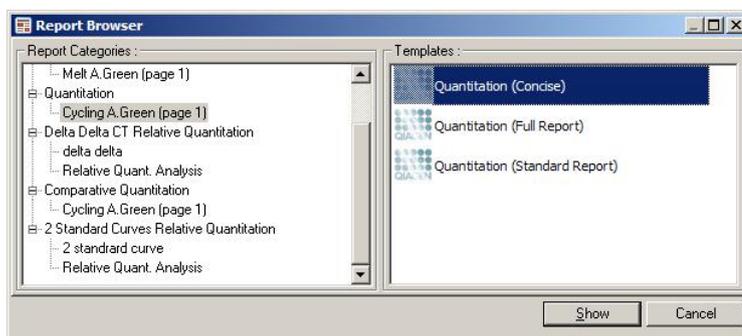
O software Rotor-Gene Q permite que o utilizador exporte dados não processados para um formato que, posteriormente, pode ser importado pela ferramenta LinReg para análise.

1. Abra o ficheiro de execução Rotor-Gene Q que contém os dados não processados.
2. Exporte os dados para o formato de exportação do LinReg selecionando Save As... (Guardar como...) e, em seguida, LinReg Export Format... (Formato de exportação do LinReg).
3. O Microsoft Excel apresenta automaticamente os dados não processados exportados.
4. Inicie a ferramenta LinReg.

A ferramenta solicita-lhe que selecione o intervalo de células que contém os dados não processados. A ferramenta apenas consegue analisar um canal não processado de cada vez, por isso deve ser selecionada a região adequada da folha do Excel.

6.5.3 Relatórios

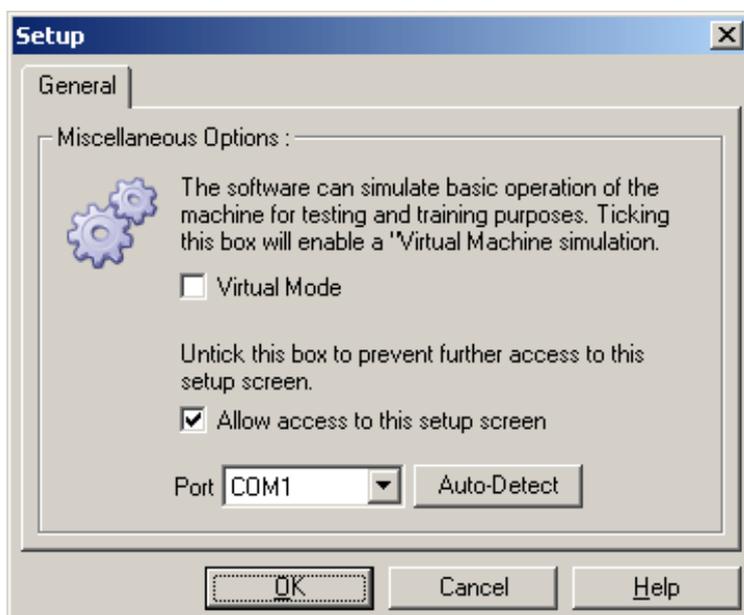
Após selecionar Reports (Relatórios), é apresentada a janela Report Browser (Browser de relatórios). Se os dados já tiverem sido analisados, o relatório da análise pode ser apresentado na janela Report Browser (Browser de relatórios). São disponibilizados vários tipos de relatórios com graus de detalhe variáveis.



* Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J., and Moorman, A.F. (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37, e45.

6.5.4 Configuração

A configuração inicial do Rotor-Gene Q MDx deve ser concluída durante a instalação. Contudo, esta opção permite-lhe alterar a configuração de ligação do Rotor-Gene Q MDx, se pretender fazê-lo depois da instalação.

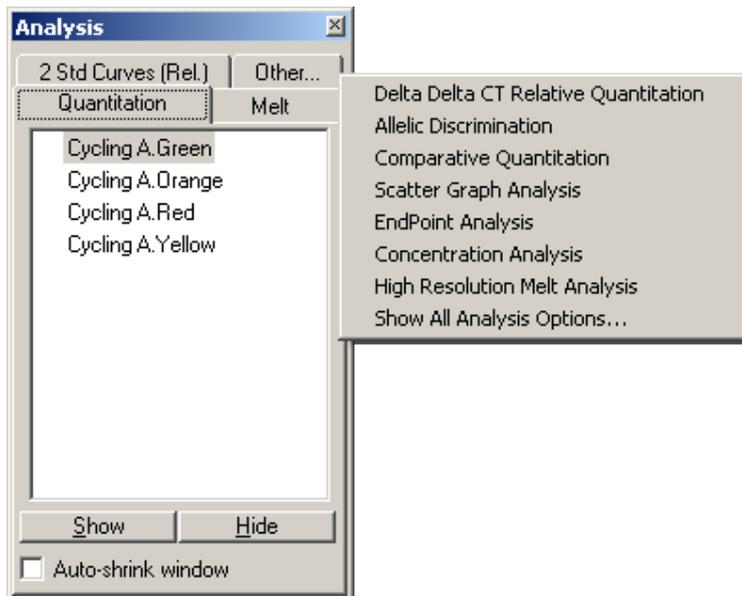


Virtual Mode (Modo virtual):	Selecione esta opção se o software for utilizado sem um Rotor-Gene Q MDx ligado. O software possui todas as funcionalidades. Este modo é útil para efeitos de demonstração, análise de dados e configuração de modelos.
Allow access to this setup screen (Permitir acesso a este ecrã de configuração):	Se esta opção não estiver marcada durante a configuração, esta janela não pode voltar a ser acedida. Esta medida de segurança evita que os utilizadores alterem as definições. Para restabelecer o acesso, contacte o seu distribuidor.
Port (Porta):	Selecione a porta de comunicação correta para permitir a comunicação entre o computador e o Rotor-Gene Q MDx.
Auto-Detect (Autodeteção):	Se não souber qual a porta que deve selecionar, clique em Auto-Detect (Autodeteção) para procurar por todas as portas disponíveis.

6.6 Menu de análise

6.6.1 Análise

Após clicar em Analysis (Análise), é apresentada a janela Analysis (Análise). Esta janela permite a criação de novas análises e a exibição de análises existentes. O método de análise é selecionado utilizando os separadores. É apresentada uma lista de canais que pode ser analisada utilizando o método selecionado. Execuções de vários ensaios no mesmo canal podem ser analisadas de forma independente, desde que tenham sido configuradas como páginas separadas na janela Edit Samples (Editar amostras). As páginas que já foram analisadas têm uma marca de verificação verde junto das mesmas. Isto significa que o limiar e as definições de normalização foram guardados para esta análise. Para visualizar e analisar um canal, clique duas vezes sobre o mesmo. É apresentada a janela de análise específica.

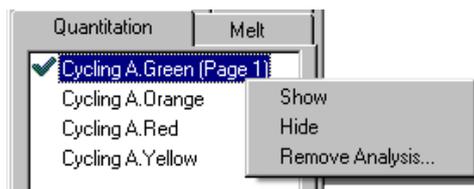


Auto-shrink window (Janela de redução automática):

Selecionar Auto-shrink window (Janela de redução automática) reduz a janela quando esta não está a ser utilizada. Mover o cursor sobre a janela aumenta novamente a janela.

Organizar o espaço de trabalho

De cada vez que é iniciada uma nova análise, as suas janelas são dispostas de forma a adaptarem-se às que já se encontram no ecrã. Se forem apresentadas muitas janelas, isto pode tornar-se incómodo. Feche as janelas de que não necessita e, em seguida, clique em Arrange (Dispor) na barra de ferramentas. As janelas são automaticamente dispostas de acordo com o método Smart Tiling (Mosaicos inteligentes). Em alternativa, seleccione outro método de disposição clicando na seta ao lado do botão Arrange (Dispor). Clicar com o botão direito do rato no nome de uma análise também fornece opções adicionais.



Show (Mostrar):

Apresenta a análise selecionada.

Hide (Ocultar):

Ocultar a análise selecionada.

Remove Analysis... (Remover análise...):

Remove completamente a análise selecionada. Isto significa que quaisquer definições de normalização ou recipientes de fusão configurados na análise serão perdidos.

6.6.2 Quantificação

Selecione o separador Quantitation (Quantificação) na janela Analysis (Análise) e, em seguida, clique duas vezes no nome do canal, ou selecione o canal e, em seguida, prima o botão Show (Mostrar) para abrir o canal de interesse. São apresentadas três janelas: o ecrã principal, a curva-padrão e os resultados.

Relatórios

Reports (Relatórios):

Reports (Relatórios) abre a janela Report Browser (Browser de relatórios) onde pode ser gerado um relatório da análise atual. Existem 3 opções: relatório padrão, relatório completo e relatório conciso. Clique duas vezes na opção pretendida para abrir o relatório na janela Preview (Pré-visualização).

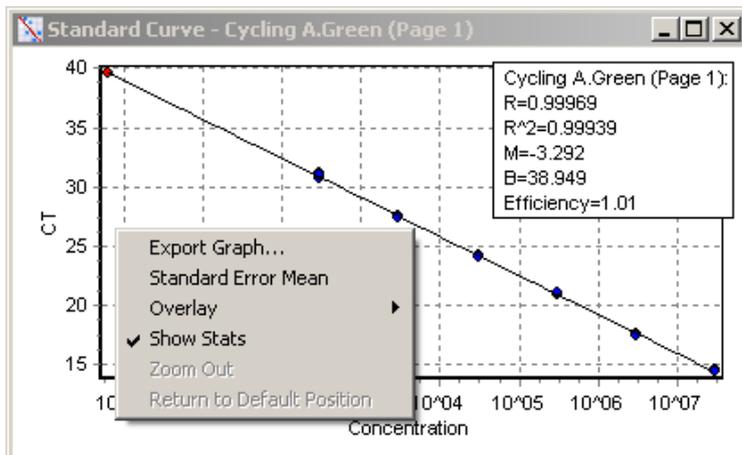
Depois de o relatório ter sido gerado, os botões na parte superior da janela Preview (Pré-visualização) podem ser utilizados para imprimir, guardar ou enviar o relatório por e-mail, ou então exportá-lo para o Word.



Curva-padrão

Std. Curve (Curva-padrão):

Este botão abre a janela Standard Curve (Curva-padrão). Por predefinição, esta janela abre quando é aberta uma análise. Se fechar a janela, esta pode ser reaberta utilizando este comando.

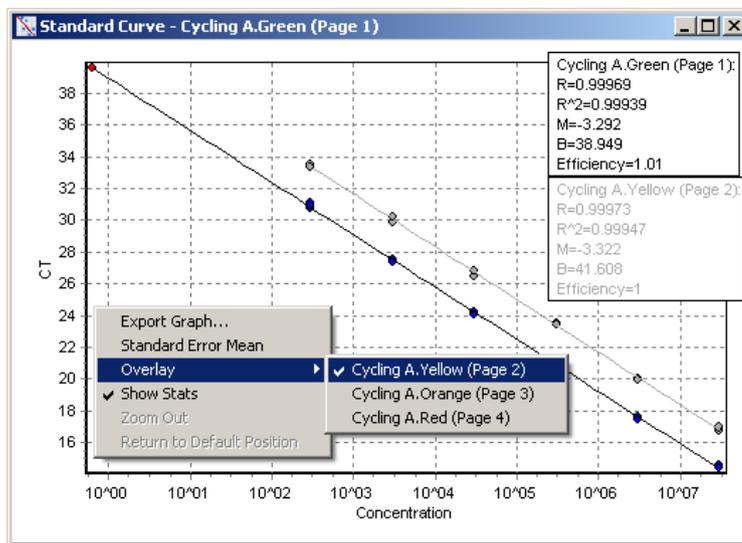


Os valores na curva-padrão são recalculados de forma dinâmica dado que o nível do limiar varia ao clicar e arrastar a linha do limiar na janela principal.

Os pontos azuis na curva representam as amostras que foram definidas como padrões e os pontos vermelhos representam pontos de dados da amostra desconhecidos.

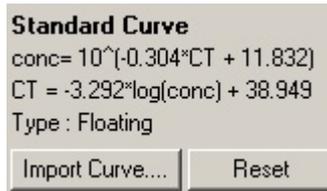
Nota: Se redefinir os padrões para recalcular a curva-padrão, desligar a visibilidade da amostra-padrão utilizando o botão de alternância do lado direito do ecrã irá removê-la do cálculo da curva-padrão. Remover padrões do gráfico para aumentar o valor de R² não é cientificamente válido. Um padrão falhado é uma indicação de que as amostras podem também ter falhado e, como tal, deve ser incluído nos resultados.

- Efficiency (Eficiência): Esta é a eficiência da reação da execução. Este valor é abordado com mais detalhe na página 93.
- Valor R² (coeficiente de correlação): O valor R² ou valor R2 corresponde à percentagem dos dados que estão de acordo com a hipótese de que os padrões formam uma curva-padrão. Se o valor R2 for baixo, os padrões não se ajustam facilmente a uma linha de correlação. Isto significa que os resultados (ou seja, as concentrações calculadas) podem não ser fiáveis. Um bom valor de R2 é aproximadamente 0,999.
- Nota: É possível atingir um valor de R² elevado com uma curva-padrão baixa se tiver sido executado um número insuficiente de padrões. O valor de R² melhora à medida que o número de padrões diminui. Para uma indicação mais exata da fiabilidade dos resultados, utilize os intervalos de confiança nas concentrações calculadas como guia.
- Valor R (raiz quadrada do coeficiente de correlação): O valor R diz respeito à raiz quadrada do valor R². De forma geral, o valor R² é mais útil para determinar correlações.
- M e B: O declive (M) e a intersecção (B) da curva-padrão são automaticamente calculados utilizando a fórmula $y = Mx + B$ e apresentados na janela Standard Curve (Curva-padrão).
- Export Graph... (Exportar gráfico...): Clicar com o botão direito do rato sobre a curva-padrão apresenta a opção de exportar o gráfico (consulte a secção 7.4).
- Overlay (Sobreposição): Caso tenham sido realizadas várias execuções de quantificação na mesma execução, é possível sobrepor as curvas-padrão na mesma janela. Isto é útil para visualizar graficamente a diferença entre diferentes limiares. Esta funcionalidade é apresentada na captura de ecrã abaixo.



Cálculo da curva-padrão

"conc = ...*CT + ..." e "CT = ..." são 2 versões da equação utilizada para relacionar os valores CT e concentrações. Em publicações, a fórmula "CT = ..." é normalmente a mais utilizada. A curva-padrão pode ser "Floating" (Flutuante) ou "Fixed" (Fixa). Se for "Floating" (Flutuante), é calculada uma equação ideal para a curva-padrão de cada vez que o limiar é movido na janela principal. Se for "Fixed" (Fixa), a equação não se altera, pois foi importada a partir de outra execução.



Importar a curva

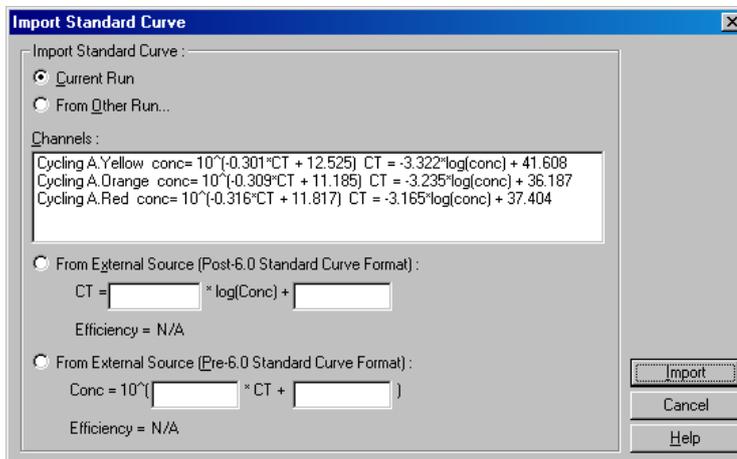
Importar uma curva-padrão permite estimar concentrações quando uma curva-padrão não está disponível numa execução em específico e a eficiência da reação não variou entre 2 execuções. As curvas podem ser importadas de outro canal ou de outra execução clicando em Import Curve (Importar curva).

É possível ajustar a curva-padrão, se necessário. Ajustar a curva-padrão significa que apenas é importada a eficiência da curva-padrão original para a execução atual. Se a curva-padrão deve ou não ser ajustada depende do químico utilizado.

Para ajustar a curva-padrão, utilize uma referência na nova execução com uma concentração conhecida. Determine uma referência definindo o tipo de amostra como "Standard" (Padrão) e introduzindo um valor de concentração na janela Edit Samples (Editar amostras). Podem ser introduzidas várias cópias da mesma referência para melhorar a exatidão. Tenha em atenção que não é possível definir mais do que uma concentração de referência ou padrão. Por exemplo, é possível ter 3 referências replicadas de 1000 cópias, mas não é possível ter uma referência de 1000 cópias e outra com 100 cópias na mesma execução.

Quando a curva-padrão tiver sido importada, o tipo de curva-padrão altera para "Fixed" (Fixa). Clique em Reset (Repor) para alterar o tipo de curva-padrão novamente para "Floating" (Flutuante).

Uma captura de ecrã da janela Import Standard Curve (Importar curva-padrão) é apresentada abaixo.



Ao utilizar esta janela, é possível importar uma curva-padrão de outro canal analisada na execução atual ou de outra execução.

Current Run (Execução atual):	Ao selecionar esta opção, as análises de quantificação noutras canais desta execução são listados com as curvas-padrão correspondentes.
From Other Run... (De outra execução...):	Selecionar esta opção abre uma caixa de diálogo a partir da qual pode ser selecionado um ficheiro de execução para abrir. Se tiver sido efetuada alguma análise de quantificação para a execução, as curvas-padrão são listadas para cada canal analisado. Nota: As definições da análise de quantificação devem ser guardadas no ficheiro de execução.
Channels (Canais):	Lista os canais analisados e as suas fórmulas da curva-padrão.
From External Source (De fonte externa):	Nesta área, os valores de M e B podem ser introduzidos diretamente. Isto é útil nos casos em que os valores são provenientes de uma fonte externa, como uma folha de cálculo do Excel.

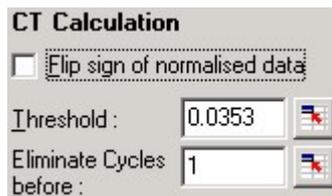
Cálculo de C_T

Invert Raw Data (Inverter dados não processados):	Certos químicos produzem um sinal fluorescente que diminui exponencialmente, em vez de aumentar. É possível analisar estes dados utilizando "Quantitation" (Quantificação), mas a caixa de verificação Invert Raw Data (Inverter dados não processados) deve estar marcada. Para todas as outras análises de quantificação, esta opção deve permanecer desmarcada.
---	--



C_T Calculations (Cálculos de C_T):	O valor de C_T é o número de ciclo no ponto em que a curva de amplificação passa um limiar de deteção. Ao definir uma linha de limiar e calcular a intersecção com cada uma das curvas, é estabelecido o valor de C_T para cada amostra.
--	--

Threshold (Limiar):	Para definir o limiar, clique no ícone (uma grelha com uma seta vermelha) e, em seguida, clique continuamente no gráfico e arraste a linha para o nível pretendido. Em alternativa, introduza um valor logarítmico. Em alternativa, é possível utilizar Auto-Find Threshold (Localização automática do limiar) para determinar automaticamente o limiar. Ao definir manualmente um limiar, este deve ser definido na fase exponencial da execução, significativamente acima do nível de fundo para evitar ruído e abaixo do início do planalto do sinal em ciclos posteriores.
---------------------	--



Eliminate Cycles before (Eliminar ciclos antes de):	Para definir, clique no ícone (uma grelha com uma seta vermelha) e, em seguida, clique continuamente no gráfico e arraste a linha para a direita. Isto elimina o limiar para números de ciclos baixos.
---	--

Nota: Isto é útil quando existe ruído durante os ciclos iniciais, por exemplo, devido a efeitos de mistura da amostra.

Auto-Find Threshold (Localização automática do limiar):	Esta funcionalidade analisa a região selecionada do gráfico para encontrar uma definição do limiar que proporcione uma estimativa ideal das concentrações indicadas. A região selecionada pode ser alterada ao introduzir novos limites superior e inferior nas caixas de texto apresentadas.
---	---

Para a maioria das análises, os limites superior e inferior predefinidos são adequados. O intervalo dos níveis de limiar é analisado para obter a correlação da curva-padrão, com base nas amostras que foram definidas como padrões (ou seja, nas quais o valor de R é mais próximo de 1,0).



Resultados

Abre a janela Quantitation Results (Resultados de quantificação). Por predefinição, esta janela abre quando é aberta uma análise. Se tiver sido fechada, pode ser reaberta utilizando este comando.

Analysis	No.	Color	Name	Type	C _T	C _T Comment	Given Conc	Calc Conc [c]	% Var	Rep. C _T	Rep. C _T Std	Rep. C _T (95% CI)	Rep. Calc. Conc.	Rep. Calc. Conc. (95% CI)
Cycling A.Green (Page 1)	1	10e8	Standard		3.73		1.00E+08	7.15E+07	28.1%	3.73	0.00	(3.73, 3.74)	7.17E+07	(1.17E+07, 4.39E+08)
Cycling A.Green (Page 1)	2	10e8	Standard		3.74		1.00E+08	7.17E+07	28.3%					
Cycling A.Green (Page 1)	3	10e8	Standard		3.74		1.00E+08	7.16E+07	29.4%					
Cycling A.Green (Page 1)	4	10e7	Standard		6.11		1.00E+07	1.44E+07	44.0%	6.06	0.06	(5.91, 6.21)	1.49E+07	(3.29E+06, 6.73E+07)
Cycling A.Green (Page 1)	5	10e7	Standard		6.08		1.00E+07	1.47E+07	46.6%					
Cycling A.Green (Page 1)	6	10e7	Standard		5.99		1.00E+07	1.56E+07	55.9%					
Cycling A.Green (Page 1)	7	10e6	Standard		10.43		1.00E+06	7.73E+05	22.6%	10.38	0.09	(10.15, 10.60)	8.00E+05	(2.62E+05, 2.44E+06)
Cycling A.Green (Page 1)	8	10e6	Standard		10.27		1.00E+06	8.58E+05	14.2%					
Cycling A.Green (Page 1)	9	10e6	Standard		10.43		1.00E+06	7.71E+05	22.9%					
Cycling A.Green (Page 1)	10	10e5	Standard		13.49		1.00E+05	9.65E+04	3.2%	13.65	0.13	(13.31, 13.98)	8.74E+04	(2.96E+04, 2.59E+05)
Cycling A.Green (Page 1)	11	10e5	Standard		13.75		1.00E+05	8.13E+04	18.7%					
Cycling A.Green (Page 1)	12	10e5	Standard		13.69		1.00E+05	8.48E+04	15.2%					
Cycling A.Green (Page 1)	13	10e4	Standard		15.66		1.00E+04	2.24E+04	123.7%	15.46	0.25	(14.84, 16.08)	2.56E+04	(7.82E+03, 8.36E+04)
Cycling A.Green (Page 1)	14	10e4	Standard		15.54		1.00E+04	2.42E+04	141.7%					
Cycling A.Green (Page 1)	15	10e4	Standard		15.18		1.00E+04	3.09E+04	208.8%					
Cycling A.Green (Page 1)	16	10e3	Standard		21.36		1.00E+03	4.71E+02	52.9%	21.09	0.24	(20.49, 21.69)	5.65E+02	(8.13E+01, 3.50E+03)
Cycling A.Green (Page 1)	17	10e3	Standard		20.89		1.00E+03	5.47E+02	36.3%					
Cycling A.Green (Page 1)	18	10e3	Standard		21.02		1.00E+03	5.94E+02	40.6%					
Cycling A.Green (Page 1)	19	10e2	Standard			NEG (Multi Ct)	1.00E+02							
Cycling A.Green (Page 1)	20	10e2	Standard		23.98		1.00E+02	7.99E+01	20.1%					
Cycling A.Green (Page 1)	21	10e2	Standard			NEG (Multi Ct)	1.00E+02							
Cycling A.Green (Page 1)	22	NTC	NTC			NEG (NTC)								
Cycling A.Green (Page 1)	23	NTC	NTC			NEG (NTC)								
Cycling A.Green (Page 1)	24	NTC	NTC			NEG (NTC)								

Na janela Quantitation Results (Resultados de quantificação), os resultados da execução são resumidos numa tabela. Clicar no botão direito do rato e seleccionar Export to Excel (Exportar para Excel) exporta a tabela para o Excel. O Excel abre automaticamente. Para copiar os dados para uma folha de cálculo existente, escolha a opção Copy (Copiar), abra a folha de cálculo e, em seguida, selecione Paste (Colar).

A janela Quantitation Results (Resultados de quantificação) inclui as colunas seguintes.

Analysis (Análise):	O conjunto de dados atual (canal de aquisição e página de amostras).
No. (N.º):	O número da amostra.
Color (Cor):	A cor do gráfico da amostra individual definida.
Type (Tipo):	O tipo de amostra definido.
C _T :	O valor de C _T determinado.
C _T Comment (Comentário de C _T):	Uma anotação automática da determinação do C _T , caso os valores de C _T sejam excluídos. Podem ser obtidos os seguintes sinalizadores: NEG (Multi Ct): O limiar passa a curva de fluorescência pelo menos duas vezes (dupla intersecção). Um valor de C _T não ambíguo não pode ser determinado. NEG (NTC): O aumento da fluorescência geral não satisfaz as condições definidas na funcionalidade "NTC threshold" (Limiar do NTC) do menu Outlier Removal (Remoção de valor atípico) (consulte abaixo). Por exemplo, uma curva de fluorescência intersecta o limiar indicado, mas o mínimo aumento do declive geral sugere que não há um controlo de modelo e não é fornecido um valor de C _T . NEG (R.Eff): O aumento da fluorescência geral não satisfaz as condições definidas na funcionalidade "Reaction efficiency threshold" (Limiar da eficiência da reação) do menu Outlier Removal (Remoção de valor atípico) (consulte abaixo). As amostras que não possuem uma certa eficiência da reação são excluídas e não é fornecido um valor de C _T . Este sinalizador só é apresentado se a funcionalidade correspondente estiver ativa.
%Var	A percentagem de variação entre a concentração calculada e conhecida. $\%Var = \text{Abs}(\text{Calculado} / \text{Determinado} - 1)$
Rep. C _T :	A média de C _T de todas as amostras com o mesmo nome desta amostra.

Rep. Ct Std. Dev. (Rep. DP Ct): O desvio-padrão do valor de Ct de todas as amostras com o mesmo nome desta amostra.

Rep. Ct. 95% C.I.
(Rep. IC 95% conc. calc.): Um intervalo de C_t que, estatisticamente, representa cerca de 95% da variação no valor de C_t . Trata-se de uma medida estatística conservadora que pode ser utilizada como uma medida de qualidade. Este intervalo pode ser reduzido executando mais réplicas ou tendo menos variação nas réplicas.

Rep. Calc. Conc
(Rep. conc. calc.): A concentração calculada para todas as amostras com o mesmo nome.
Nota: Não se trata da média simples das concentrações calculadas. Trata-se da média geométrica, que é uma média mais adequada matematicamente devido à natureza exponencial da amplificação em tempo real.

Rep. Calc. Conc. 95% C.I.
(Rep. IC 95% conc. calc.): Um intervalo de concentrações que representa cerca de 95% da variação na amostra individual, assim como o modelo de regressão linear no qual se baseia. Uma interpretação desta medida é que se trata do intervalo de concentrações que pode ser esperado 95% do tempo, caso esta execução seja efetuada repetidamente com a mesma quantidade de variação. Trata-se de uma estimativa conservadora e o intervalo pode ser bastante grande devido à variação inerente a qualquer análise em tempo real. Este intervalo pode ser grande se os padrões forem executados com concentrações diferentes das amostras desconhecidas, se for utilizado um número pequeno de réplicas ou se existir variação significativa.

Importante: As variações comunicadas por esta medida são inerentes ao processo exponencial da amplificação em tempo real e não são devidas ao Rotor-Gene Q MDx. Testes semelhantes efetuados em cicladores com base em blocos teriam uma maior variação devido à menor uniformidade da temperatura dos sistemas com base em blocos. Se pretender comparar cicladores, recomendamos que compare o desvio-padrão do valor de C_t .

Nota: Estão disponíveis mais informações detalhadas sobre intervalos de confiança no Apêndice B.

Nota: À exceção da cor, nome, C_t e comentário de C_t , todas as colunas podem ser apresentadas ou ocultadas ao clicar com o botão direito do rato na janela e, em seguida, selecionar ou anular a seleção do nome da coluna.

No.	C	Name	Ct	Ct Comment	Given Conc (Cop)	Calc. Conc (Copie)	% Var
1		3x10 ⁸	Analysis		300.000.000.	324.345.068.	8,1%
2		3x10 ⁸	✓ No.		300.000.000.	301.264.230.	0,4%
3		3x10 ⁸	✓ Color		300.000.000.	308.453.920.	2,8%
4		3x10 ⁸	✓ Name		300.000.000.	298.576.301.	0,5%
5		3x10 ⁷	Type		30.000.000.	27.524.578.	8,3%
6		3x10 ⁷	✓ Ct		30.000.000.	26.405.444.	12,0%
7		3x10 ⁷	✓ Ct Comment		30.000.000.	28.701.296.	4,3%
8		3x10 ⁷	✓ Given Conc (Copies)		30.000.000.	23.847.613.	20,5%
9		3x10 ⁶	✓ Calc Conc (Copies)		3.000.000.	3.392.142.	13,1%
10		3x10 ⁶	✓ % Var		3.000.000.	3.170.880.	5,7%
11		3x10 ⁶	✓ Rep. Ct		3.000.000.	3.130.752.	4,4%
12		3x10 ⁶	✓ Rep. Ct Std. Dev.		3.000.000.	3.166.396.	5,5%
13		3x10 ⁵	✓ Rep. Ct (95% CI)		300.000.	321.913.	7,3%
14		3x10 ⁵	Rep. Calc. Conc.		300.000.	305.744.	1,9%
15		3x10 ⁵	Rep. Calc. Conc. (95% CI)		300.000.	312.045.	4,0%
16		3x10 ⁵			300.000.	324.696.	8,2%
17		3x10 ⁴		19,47	30.000.	32.420.	8,1%
18		3x10 ⁴		19,59	30.000.	29.872.	0,4%
19		3x10 ⁴		19,53	30.000.	31.102.	3,7%
20		3x10 ⁴		19,52	30.000.	31.301.	4,3%
21		3x10 ³		22,93	3.000.	2.850.	5,0%
22		3x10 ³		22,96	3.000.	2.793.	6,9%
23		3x10 ³		22,94	3.000.	2.825.	5,8%
24		3x10 ³		22,91	3.000.	2.888.	3,7%
25		3x10 ²		26,03	300.	322.	7,5%
26		3x10 ²		26,11	300.	305.	1,6%
27		3x10 ²		26,26	300.	275.	8,5%
28		3x10 ²		26,18	300.	291.	3,1%

Para uma maior conveniência, a funcionalidade AutoStat (Estatística automática) calcula automaticamente a média, o desvio-padrão e os valores mínimo e máximo das amostras de interesse. Selecione os resultados de interesse arrastando-os com o botão esquerdo do rato e os valores são apresentados numa tabela no lado direito do ecrã.

Nesta captura de ecrã, são analisadas as concentrações de várias amostras.

Ct	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var	f
14.42	30000000	2825064	5.8%	
14.59	30000000	25142920	16.2%	
14.40	30000000	28730050	4.2%	
17.44	3000000	3422624	14.1%	
17.58	3000000	3103391	3.4%	
17.42	3000000	3467111	15.6%	
20.99	300000	285353	4.9%	
20.92	300000	298898	0.4%	
21.04	300000	275802	8.1%	
24.20	30000	30786	1.0%	

Statistics	
Maximum :	28730050
Minimum :	25142920
Count :	3
Mean :	27328521
Std. Dev :	1.07537
(Orders of Mag.)	

Importante: A funcionalidade AutoStat (Estatística automática) é sensível ao contexto. Isto significa que, sempre que possível, apenas gera informações úteis.

Por exemplo:

- Não é possível obter um intervalo de confiança de 95% a partir de um conjunto de concentrações calculadas selecionadas, uma vez que o modelo de regressão também deve ser tido em conta.
- O desvio-padrão "Orders of Magnitude" (Ordens de magnitude) é comunicado para concentrações calculadas em vez de para um valor absoluto. Isto é uma variação de percentagem. Por exemplo, um valor de 1,07537 representa uma variação de 7,54% $(278,974 - 322,611) = (300,000/1,07537 - 00,000 * 1,07537)$. Comunicar um valor absoluto não faz sentido para uma curva-padrão. O valor pode ser comunicado na concentração mais baixa para criar um erro baixo percebido (± 3 cópias) ou na concentração mais elevada ($\pm 3\ 000\ 000$ cópias). Por este motivo, o desvio padrão "Orders of Magnitude" (Ordens de magnitude) é relatado.
- Para concentrações calculadas, é utilizada a média geométrica em vez da média aritmética. Isto representa a natureza exponencial de real-time PCR. Por exemplo, no caso de diluições duplas com 1, 2, 8 e 16 cópias, a média deve ser 4 cópias, visto que é o meio da série de diluições. Contudo, a média aritmética é 6,75. A média geométrica é $(1 * 2 * 8 * 16)^{(1/4)} = 4$ cópias.

Normalização do tubo dinâmico

A opção Dynamic Tube (Tubo dinâmico) é selecionada por predefinição e é utilizada para determinar a média de fundo de cada amostra imediatamente antes de a amplificação começar.

A normalização-padrão tem em conta os primeiros 5 ciclos e utiliza-os como um indicador do nível de fundo de cada amostra. Todos os pontos de dados para a amostra são, posteriormente, divididos por este valor para normalizar os dados. Isto pode ser impreciso, pois, para algumas amostras, o nível de fundo sobre os primeiros 5 ciclos pode não ser indicador do nível de fundo imediatamente antes da amplificação. Por outro lado, a normalização do tubo dinâmico utiliza a segunda derivada de cada gráfico das amostras para determinar o ponto de remoção de cada amostra. Posteriormente, é calculada a média do nível de fundo desde o ciclo 1 até este número de ciclo de remoção para cada amostra. Isto fornece os resultados de quantificação mais precisos.

Tenha em atenção que para alguns conjuntos de dados, a fluorescência de fundo não é consistente durante os ciclos antes de a amplificação começar. Nestes casos, pode ser necessário anular a seleção da normalização do tubo dinâmico clicando em Dynamic Tube (Tubo dinâmico), pois tal pode resultar numa quantificação menos precisa.

Correção do declive do ruído

A fluorescência de fundo (FI) de uma amostra, idealmente, deveria permanecer constante antes da amplificação. Contudo, por vezes a FI mostra um aumento ou uma diminuição gradual ao longo de diversos ciclos devido ao químico utilizado. Isto produz um nível de ruído distorcido. A correção do declive do ruído utiliza uma linha de correlação para determinar o nível de ruído em vez de uma média e normaliza em relação a essa linha. Selecionar esta opção clicando no botão Slope Correct (Correção do declive), pode melhorar os dados provenientes das réplicas se as linhas de base das amostras tiverem um declive visível. A correção do declive do ruído melhora os dados quando se observa um declive em sentido ascendente ou descendente dos fundos dos dados não processados antes do ponto de remoção (C_T).

Nos locais em que o declive não é estável ou que os ciclos iniciais da linha de base mostram um aumento ou uma diminuição significativa do sinal comparado com o resto da curva, a correção do declive do ruído pode provocar alguns efeitos indesejados, como, por exemplo, as curvas do controlo negativo passarem o limiar, devido à aproximação da linha de base como uma linha de correlação e à normalização dos dados não processados em conformidade. Como consequência, esta funcionalidade nem sempre melhora a qualidade dos dados e deve ser utilizada apenas se as curvas dos dados não processados mostrarem um declive estável.

Ajuste do ponto de remoção

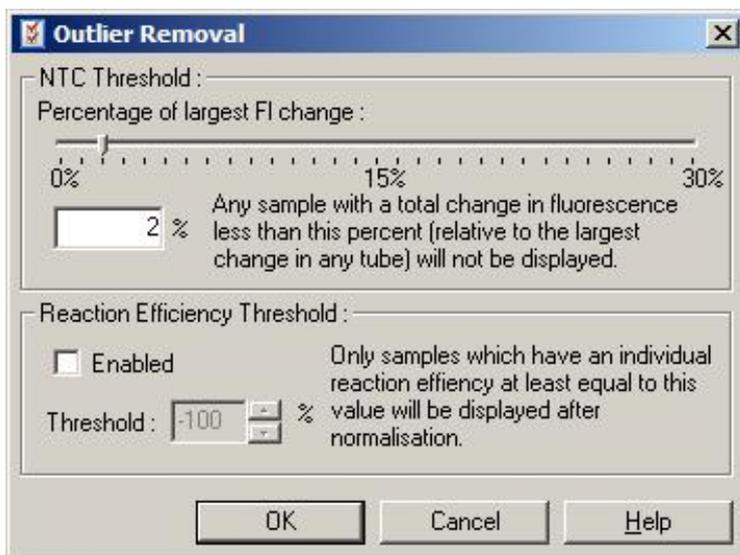
O algoritmo de ajuste do ponto de remoção pode ser utilizado para definir um comprimento mínimo da linha de base utilizada para a normalização. Devem ser definidos dois parâmetros para aplicar o ajuste do ponto de remoção. Se for calculado um ponto de remoção pelo Dynamic Tube (Tubo dinâmico) que seja inferior ao primeiro parâmetro, o segundo parâmetro é utilizado como o ponto de remoção. O ajuste do ponto de remoção apenas pode ser utilizado em conjunto com a normalização do Dynamic Tube (Tubo dinâmico).

Ignorar primeiro

O sinal de fluorescência proveniente dos primeiros ciclos numa execução pode não ser representativo do resto da execução. Por este motivo, podem ser alcançados melhores resultados se os primeiros ciclos forem ignorados. Pode ignorar até 10 ciclos. Contudo, se os primeiros ciclos parecerem semelhantes a ciclos posteriores, serão alcançados melhores resultados se desmarcar "Ignore First" (Ignorar primeiro), dado que o algoritmo de normalização terá mais dados com que trabalhar.

Remoção de valor atípico

Para distinguir alterações mínimas na fluorescência e nas reações reais nos controlos sem modelo (No Template Controls, NTC), são fornecidas 2 medidas: NTC Threshold (Limiar de NTC) e Reaction Efficiency Threshold (Limiar de eficiência da reação). O NTC Threshold (Limiar de NTC) é recomendado para a maioria das aplicações. A abordagem utilizada deve ser validada.



NTC Threshold (Limiar de NTC): Permite que as amostras ou os NTC que têm um ligeiro desvio em sentido ascendente sejam excluídos da análise. Todas as amostras com uma alteração abaixo do "NTC Threshold" (Limiar de NTC) não serão comunicadas e será apresentado um sinalizador "NEG (NTC)" na coluna "CT Comment" (Comentário de CT).

A percentagem é relativa à maior alteração máxima encontrada em qualquer tubo. Por exemplo, se uma amostra iniciou com um fundo de 2 FI e aumentou para 47 FI, então 45 FI representa 100%. Um "NTC Threshold" (Limiar de NTC) de 10% iria considerar qualquer amostra inferior a 4,5 FI como ruído.

Reaction Efficiency Threshold
(Limiar de eficiência da reação):

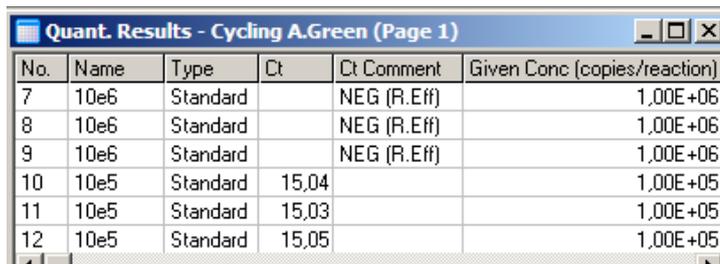
O "Reaction Efficiency Threshold" (Limiar de eficiência da reação) representa um método alternativo de excluir ruído da análise. Este algoritmo de normalização utiliza técnicas de estimativa da eficiência da reação utilizadas na quantificação comparativa (consulte a secção 6.6.6). Todas as amostras que não têm uma eficiência da reação de, pelo menos, este nível são excluídas e será apresentado um sinalizador "NEG (R.Eff)" na coluna "Ct Comment" (Comentário de Ct).

Um nível de 0% indica que, durante a fase exponencial, não ocorreu nenhuma reação. 100% indica que ocorreu uma reação completamente eficiente durante a fase exponencial. Percentagens negativas indicam que durante a fase exponencial, o sinal de fluorescência diminuiu.

Os estudos atuais não são conclusivos acerca dos níveis precisos de eficiência necessários para distinguir reações genuínas provenientes de contaminação e outros efeitos. Por este motivo, recomendamos a utilização prudente desta funcionalidade, assumindo que qualquer amostra com uma reação genuína terá alguma fase exponencial visível com alguns incrementos na fluorescência. A definição deste valor superior a 0% irá excluir algumas amostras com um aumento da fluorescência ineficiente, mas perceptível, enquanto a definição inferior a 0% irá apresentar amostras que diminuem a fluorescência durante a fase exponencial, que deveriam claramente ser excluídas.

Nota: Se um valor for excluído devido à ativação de qualquer uma destas técnicas, não será apresentado um valor correspondente de Ct na janela Quantitation Results (Resultados da quantificação). Simultaneamente, será apresentado um sinalizador a indicar a exclusão na coluna "Ct Comment" (Comentário de Ct). Assim, é importante assegurar que a coluna "Ct Comment" (Comentário de Ct) é sempre apresentada.

Na imagem abaixo, as amostras 7, 8 e 9 foram excluídas devido ao "Reaction Efficiency Threshold" (Limiar de eficiência da reação).



No.	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (copies/reaction)
7	10e6	Standard		NEG (R.Eff)	1,00E+06
8	10e6	Standard		NEG (R.Eff)	1,00E+06
9	10e6	Standard		NEG (R.Eff)	1,00E+06
10	10e5	Standard	15,04		1,00E+05
11	10e5	Standard	15,03		1,00E+05
12	10e5	Standard	15,05		1,00E+05

Declive, amplificação, eficiência da reação

O declive (M) de uma reação (apresentado na janela Standard Curve [Curva-padrão]) pode ser utilizado para determinar a amplificação exponencial e a eficiência de uma reação utilizando os cálculos seguintes:

$$\text{Amplificação exponencial} = 10^{(-1/M)}$$

$$\text{Eficiência da reação} = [10^{(-1/M)}] - 1$$

Os valores ideais para M, amplificação exponencial e eficiência da reação são, respetivamente, -3,322, 2 e 1. A eficiência da reação é apresentada no relatório (em relatórios-padrão e completos; consulte a página 82) e na janela Standard Curve (Curva-padrão).

O declive é calculado como a alteração em C_T dividido pela alteração na entrada do registo (por exemplo, número de cópia). Uma amplificação 100% eficiente representa a duplicação do produto da amplificação em cada ciclo, resultando num valor de M de -3,322, um fator de amplificação de 2 e uma eficiência da reação de 1.

Dado um valor de M de -3,322, os cálculos são os seguintes:

Amplificação exponencial: $10^{(-1/-3,322)} = 2$

Eficiência da reação: $[10^{(-1/-3,322)}] - 1 = 1$

Como exemplo alternativo: um valor de M de 3,8 significa que a reação tem uma amplificação exponencial de aproximadamente 1,83 e uma eficiência da reação de 0,83 (ou 83%).

Desvio

Numa fórmula que descreve a relação entre 2 variáveis, o desvio é expresso com a letra B ($y = Mx + B$). O desvio por vezes também é designado de intersecção. B representa o C_T para uma dada concentração de 1 unidade. Ao substituir 1 pela fórmula de concentração conforme é apresentado abaixo:

$$C_T = \log(1) * M + B$$

$$C_T = 0 * M + B$$

O resultado é $C_T = B$

A intersecção pode diferir conforme a execução e é uma medida menos estável do que o gradiente. Por este motivo, o gradiente é analisado mais frequentemente do que a intersecção.

Janela principal

A janela principal apresenta os gráficos de amplificação numa escala logarítmica.

Clicar em Linear Scale (Escala linear) na parte inferior da janela altera a escala, da logarítmica para a linear e vice-versa. Alternar entre estas duas escalas apenas altera a apresentação dos gráficos, não os cálculos. Isto pode ser verificado pelo utilizador recorrendo à ferramenta de localização do ponteiro ao clicar com o botão direito do rato no gráfico e seleccionar Show pinpointer (Mostrar localizador do ponteiro). Utilizando uma escala logarítmica, os valores menores são mais visíveis no gráfico, enquanto uma escala linear facilita a visualização da reação completa.

Nota: Os gráficos de amplificação atualizam em tempo real à medida que o Rotor-Gene Q MDx adquire ativamente dados durante uma execução. Esta monitorização de dados em tempo real permite que o utilizador visualize os resultados à medida que as curvas mostram um crescimento exponencial. Podem ser retiradas conclusões preliminares e tomadas decisões para a execução seguinte.

Modelos de análise de quantificação

Os modelos de análise de quantificação permitem ao utilizador exportar definições de normalização e de limiar para um ficheiro *.qut único. Este ficheiro pode ser importado e aplicado novamente noutras experiências. Consulte a secção 7.1 para obter mais informações.



6.6.3 Duas curvas-padrão

A análise da expressão de genes relativa, utilizando um gene de normalização, pode ser efetuada através do método de 2 curvas-padrão.

O método necessita de uma curva-padrão para cada gene. A concentração de cada gene é quantificada de acordo com a sua curva-padrão. A expressão do gene de interesse é, em seguida, normalizada com o gene de normalização (normalmente um gene constitutivo).

É importante que os padrões e as amostras replicadas sejam determinados corretamente durante a configuração da amostra (consulte a secção "Configuração da amostra"). Em particular, as amostras correspondentes devem ter o mesmo nome em cada análise. Numa reação multiplex, na qual as posições dos tubos do gene de interesse e do gene de normalização são as mesmas, um conjunto de definições de amostra é suficiente. Se estiver a efetuar uma análise relativa com um gene de normalização utilizando um canal único (ou seja, as reações são executadas em tubos separados utilizando o mesmo fluoróforo), devem ser criadas 2 páginas de amostras. A primeira deve etiquetar as posições dos tubos com os nomes das amostras para o gene de interesse. As restantes posições devem permanecer sem nome. A segunda deve etiquetar as posições utilizadas para o gene de normalização. O software irá fazer corresponder as amostras nas 2 análises com base nos seus nomes.

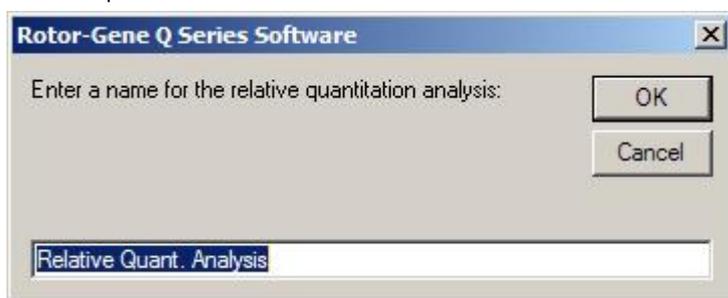
Análise de expressão utilizando o método de duas curvas-padrão

Os dados podem primeiro ser analisados para cada gene utilizando a análise de quantificação. Caso contrário, os resultados para cada gene serão automaticamente determinados com a ferramenta Autofind Threshold (Localização automática do limiar).

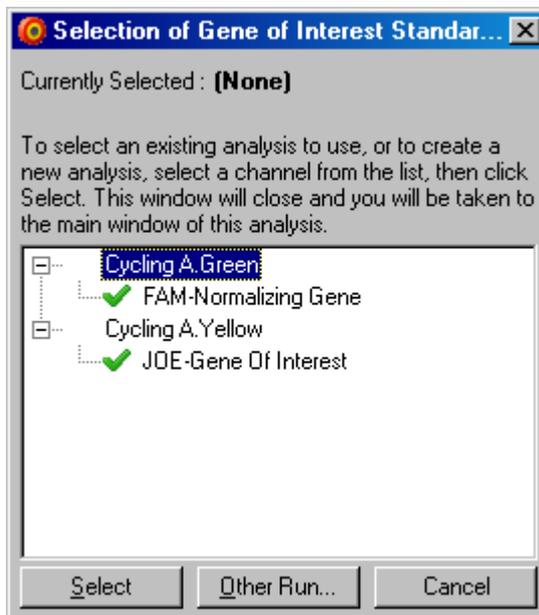
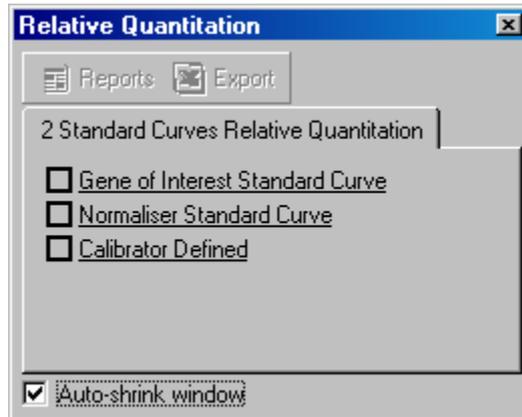
1. Na janela Analysis (Análise), selecione o separador 2 Std Curve (Rel.) (2 curvas-padrão [Rel.]). Clique em New Analysis... (Nova análise...).



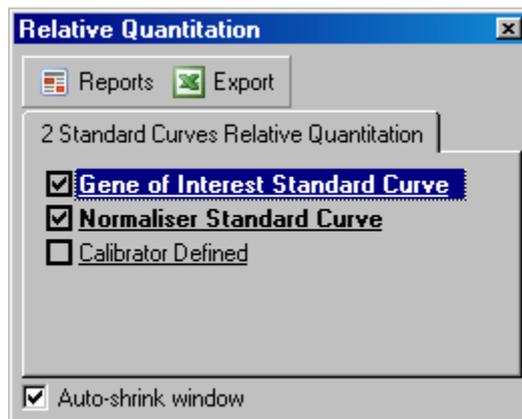
2. Introduza um nome para a análise.



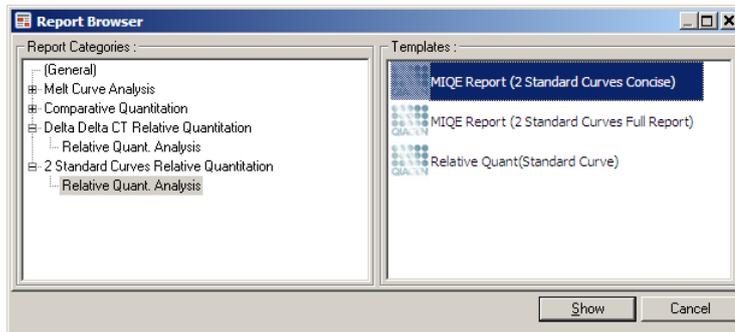
3. Determine as páginas utilizadas para a análise do gene de normalização e a análise do gene de interesse. Por exemplo, clicar em Gene of Interest Standard Curve (Curva-padrão do gene de interesse) abre a janela Selection of Gene of Interest Standard... (Seleção do padrão do gene de interesse...). Selecione a página na qual foi quantificado o gene de interesse. Repita o procedimento para o gene de normalização. Opcionalmente, pode ser definido um calibrador. Se for selecionada esta opção, é atribuído um valor de 1 ao calibrador e todas as outras concentrações das amostras são calculadas em relação a esta amostra.



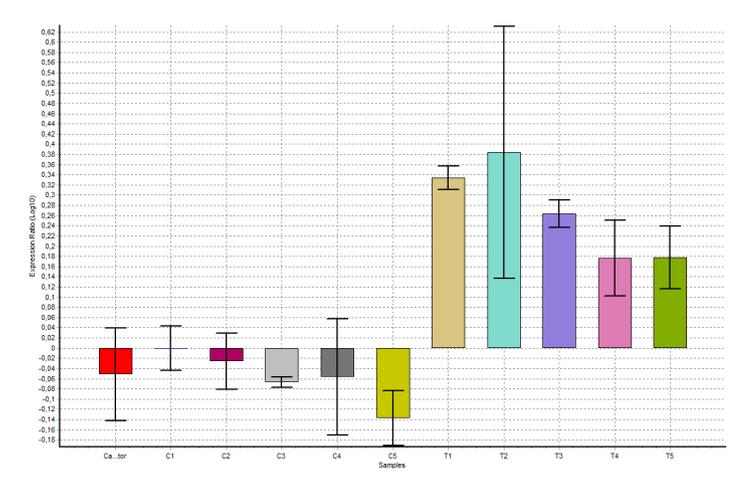
Após concluir as seleções, as opções serão marcadas com uma marca de verificação conforme apresentado abaixo.

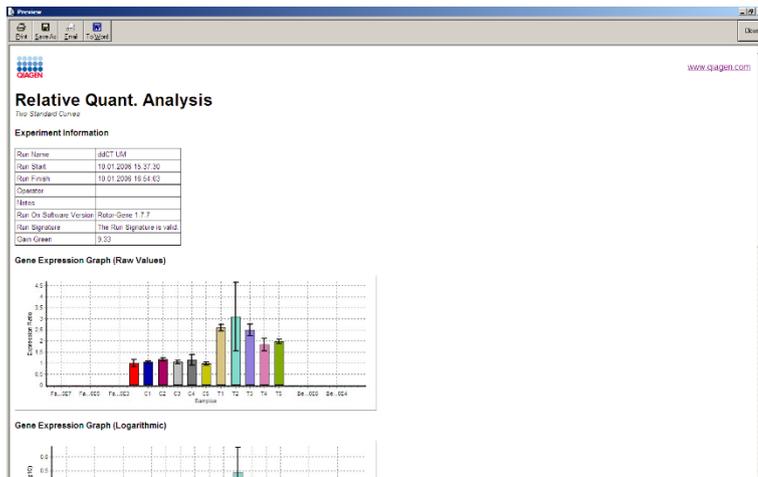


4. Clique no botão Reports (Relatórios) para apresentar o Report Browser (Browser de relatórios). Selecione a análise com o nome correto a partir da lista. Clique no botão Show (Mostrar) para apresentar o relatório de quantificação relativa. A opção Export (Exportar) exporta os resultados para uma nova folha de cálculo do Excel. Se estiver incluído um calibrador, os resultados são calculados em relação à amostra do calibrador, à qual é atribuído um valor de 1.



5. São apresentadas as concentrações lidas nas curvas-padrão para o gene de interesse (GOI Conc. [Conc. GOI]) e o gene de normalização (Norm. Conc. [Conc. Norm.]), assim como as concentrações relativas (Relative Conc. [Conc. relativa]). Os resultados podem ser guardados num ficheiro do Word.





6. Os valores Rel Min (Mín. rel.) e Rel Max (Máx. rel.) são gerados através do cálculo do desvio-padrão do quociente com base nos desvios-padrão do GOI e no gene de normalização utilizando a fórmula seguinte:

$$CV_{relconc} = \sqrt{CV_{GOI}^2 + CV_{Norm}^2}$$

sendo que:

$$cv = \frac{s}{X} = \frac{stddev}{meanvalue}$$

6.6.4 Quantificação relativa de delta delta C_T

O método delta delta CT possibilita a análise da expressão de genes relativa. É descrita por Livak e Schmittgen (2001).*

Este método não necessita que as curvas-padrão sejam incluídas em cada execução. Primeiro, cada amostra é normalizada para a quantidade de modelo adicionada por comparação com o gene de normalização. Estes valores normalizados são posteriormente normalizados em relação a um tratamento de calibrador. O calibrador poderia ser, por exemplo, amostras do tipo selvagem, de controlo não tratado ou de tempo zero.

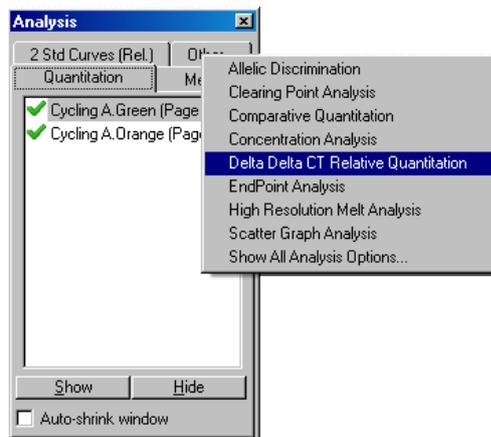
É fundamental que as eficiências da amplificação do gene de interesse e do gene de normalização sejam idênticas e que isto seja validado de acordo com as diretrizes de Livak e Schmittgen.

É fundamental que os nomes das amostras sejam definidos corretamente na janela Edit Samples (Editar amostras) com as mesmas amostras etiquetadas de forma idêntica em cada compósito da análise de quantificação.

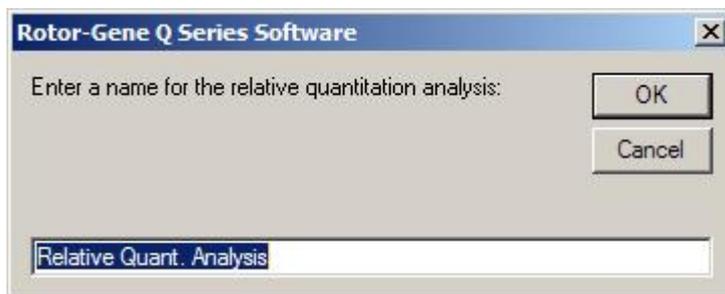
* Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods* 25, 402.

1. Analise os dados utilizando "Quantitation" (Quantificação). Não é necessário executar uma curva-padrão quando já tiver sido efetuada a validação.

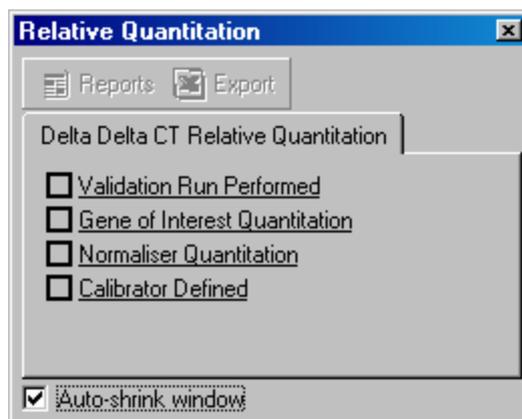
No separador Other (Outro) na janela Analysis (Análise), selecione Delta Delta CT Relative Quantitation (Quantificação relativa de delta delta CT). Selecione New Analysis (Nova análise).

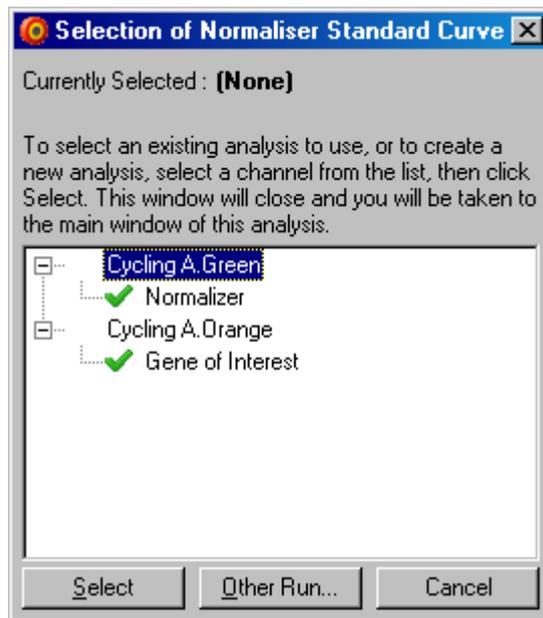


2. Introduza um nome para a análise.

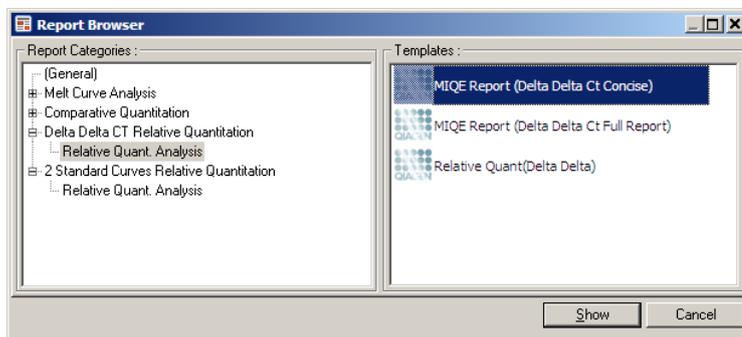


3. A opção Validation Run Performed (Execução de validação efetuada) deve ser marcada para continuar com a análise. Defina as páginas nas quais foram analisados o gene de interesse e o gene de normalização.





4. Clique no botão Reports (Relatórios) para apresentar o Report Browser (Browser de relatórios). Selecione a análise com o nome correto a partir da lista. Clique no botão Show (Mostrar) para apresentar o relatório de quantificação relativa. A opção Export (Exportar) exporta os resultados para uma nova folha de cálculo do Excel. Se estiver incluído um calibrador, os resultados são relativos à amostra do calibrador, que tem um valor de 1.



É apresentado um exemplo de resultados desta análise abaixo. São apresentados os valores de C_T para o gene de interesse (GOI C_T [C_T GOI]), os valores de C_T para o gene de normalização (Norm. C_T [C_T Norm.]), Delta C_T , Delta delta C_T e a concentração relativa (Relative Conc. [Conc. relativa]). A expressão é relativa à amostra do calibrador, à qual é atribuída a expressão relativa de 1.

Para obter mais informações acerca da derivação dos cálculos do Rel Min (Mín. rel.) e Rel Max (Máx. rel.), consulte Litvak e Schmittgen (2001).*

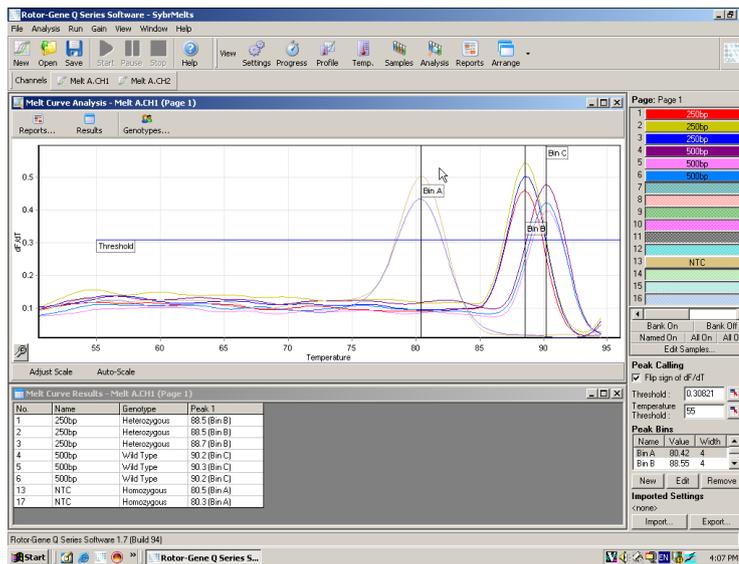
* Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25, 402.

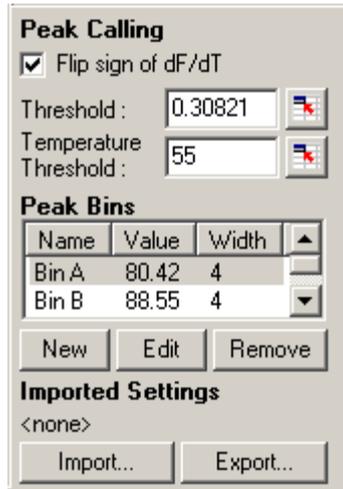
C	Replicate Name	GOI CT	Norm. CT	Delta CT	Delta Delta CT	Relative Conc.	Rel Min	Rel Max	Calibrator
	Dilution 8		28.37						
	Dilution 7	37.61	28.39	9.22	4.40	0.04728	0.04128	0.05414	
	Dilution 6	35.72	28.28	7.44	2.62	0.16228	0.14904	0.17669	
	Dilution 5	35.04	28.24	6.80	1.98	0.25292	0.11715	0.54605	
	Dilution 4	32.94	28.12	4.82	0.00	1.00000	0.69432	1.44025	Yes
	Dilution 3	31.66	28.23	3.43	-1.38	2.60825	2.16257	3.14579	
	Dilution 2	30.05	28.02	2.03	-2.79	6.92153	6.49040	7.38130	
	Dilution 1	28.61	27.92	0.69	-4.12	17.41896	16.47839	18.41322	
	QS 0.1 IU/µl		28.11						
	0.316 IU/µl	37.62	28.10	9.51	4.70	0.03957	0.03633	0.04094	
	1 IU/µl	36.84	28.15	8.69	3.88	0.06805	0.04415	0.10489	
	3.16 IU/µl	34.45	28.05	6.40	1.59	0.33305	0.28206	0.39325	
	QS4	32.67	28.29	4.38	-0.43	1.34925	1.09820	1.65770	
	QS3	30.07	27.98	2.09	-2.73	6.61982	6.18888	7.08076	
	QS2	26.88	27.64	-0.76	-5.57	47.61474	45.02202	50.35677	
	QS1	24.07	27.10	-3.03	-7.85	230.60440	208.45384	255.10870	

6.6.5 Análise da curva de fusão

A análise da curva de fusão analisa a derivada dos dados não processados após a regularização. Esta análise é comumente utilizada para genotipagem e discriminação alélica. Os picos na curva são agrupados em recipientes e todos os picos abaixo do limiar são descartados. Os recipientes podem, posteriormente, ser mapeados para genótipos utilizando o comando "Genotypes" (Genótipos).

Após a conclusão de uma execução, pode ser adicionado um passo de fusão para alguns químicos, para visualizar a cinética da dissociação dos produtos amplificados. A temperatura é aumentada a uma taxa linear e é registrada a fluorescência de cada amostra. É apresentada uma análise da curva de fusão comum abaixo.





Flip sign of dF/dT (Inverter sinal de dF/dT):

Antes de definir os picos, certifique-se de que o sinal dF/dT está correto para o conjunto de dados para apresentar picos positivos.

Defining peaks (Definir picos):

Na análise da curva de fusão, os picos podem ser definidos e comunicados utilizando métodos diferentes. Um deles consiste em determinar automaticamente todos os picos para cada amostra. Outro consiste em atribuir os picos aos recipientes, o que é útil para a genotipagem.

Os recipientes definem a área na qual é esperado que ocorram picos. O software de análise da curva de fusão agrupa os picos em grupos de recipientes, com base nos valores reais dos picos na curva. Os recipientes podem ser editados, se necessário.

Qualquer pico que esteja dentro do intervalo definido do recipiente pode ser atribuído a tal recipiente. Se existirem 2 recipientes próximos, o pico será atribuído ao recipiente mais próximo.

Nota: Os recipientes não devem ser posicionados visualmente para estimar as posições dos picos. Defina os recipientes na área de interesse aproximada e utilize os valores reais registados na tabela de resultados para um resultado mais exato.

Peak Bins (Recipientes de picos):

Para definir um recipiente, clique no botão New Bin (Novo recipiente) e, em seguida, clique continuamente no gráfico para definir o centro do recipiente. Para adicionar outro recipiente, repita o processo. Utilize o botão Remove (Remover) para eliminar recipientes.

Threshold (Limiar):

Para definir o limiar (eixo y), clique no ícone  e, em seguida, clique continuamente no gráfico e arraste a linha do limiar para o nível pretendido.

Temperature Threshold (Limiar de temperatura):

Para definir o limiar de temperatura (eixo x), clique no ícone  e, em seguida, clique continuamente no gráfico e arraste a linha do limiar para a direita. Isto elimina a linha do limiar para temperaturas inferiores.

Nota: Isto é útil quando não existe ruído no sinal a temperaturas baixas.

Relatórios

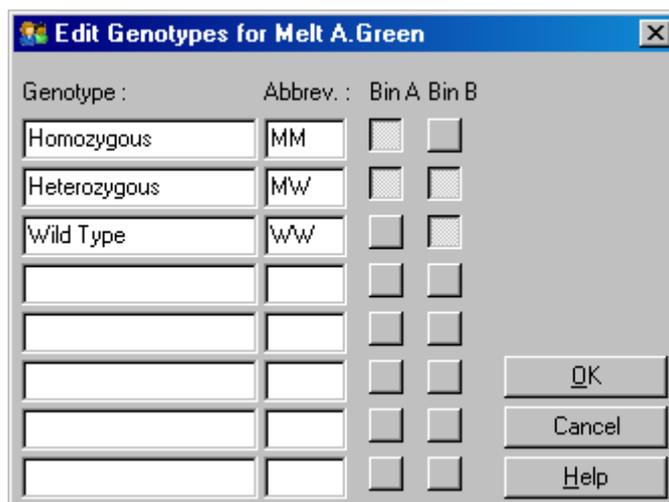
Abre o Report Browser (Browser de relatórios) onde pode ser escolhido um relatório para pré-visualizar. Um relatório pode ser gerado com base no canal atualmente selecionado ou pode ser gerado um relatório de genotipagem multicanal.

Resultados

Apresenta a janela Melt Curve Results (Resultados da curva de fusão), que mostra os picos das amostras.

Genótipos

Clique em Genotypes... (Genótipos...) e selecione os genótipos, conforme mostrado abaixo.



Esta janela permite que os genótipos sejam atribuídos à incidência de picos nos recipientes. A configuração de genótipo predefinida é apresentada na captura de ecrã, sendo que as amostras heterozigotas têm 2 picos, as amostras homozigotas têm um pico no primeiro recipiente e as amostras de tipo selvagem têm um pico no segundo recipiente. Pode ser introduzida uma abreviatura no campo ao lado do nome de cada genótipo. Isto é utilizado quando são impressos relatórios de genotipagem multicanal, para que todos os resultados de vários canais possam ser facilmente analisados.

Para análises multiplex, os genótipos devem ser configurados em cada canal. Se, por exemplo, for executada uma análise de FRET de supressão de canal duplo, na qual são esperados genótipos heterozigotos e de tipo selvagem em cada canal, os parâmetros do recipiente devem ser configurados para cada canal. Os resultados serão posteriormente apresentados num relatório multiplex.

Modelos de análise de fusão

Os modelos de análise de fusão permitem ao utilizador exportar definições de normalização, limiar, genótipo e recipiente para um ficheiro *.met único. Este ficheiro pode ser importado e aplicado novamente noutras experiências. Consulte a secção 7.1 para obter mais informações.



6.6.6 Quantificação comparativa

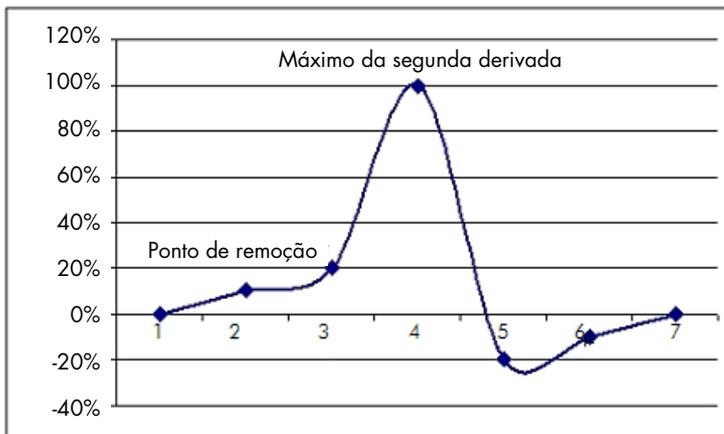
A quantificação comparativa compara a expressão relativa de amostras a uma amostra de controlo numa execução quando não está disponível uma curva-padrão. Isto é utilizado frequentemente numa análise de microarray. Warton e colegas (2004)* forneceram um exemplo desta técnica.

1. Para efetuar a análise, selecione Other (Outro) e, em seguida, Comparative quantitation (Quantificação comparativa) na janela Analysis (Análise). Clique duas vezes no canal para analisar.
2. Escolha uma amostra de controlo utilizando o menu pendente do lado direito do ecrã, abaixo do botão de alternância.
3. Os resultados serão automaticamente calculados e apresentados na janela Comparative Quantitation Results (Resultados de quantificação comparativa) abaixo do gráfico.

As primeiras colunas da janela Comparative Quantitation Results (Resultados de quantificação comparativa) mostram o número e o nome da amostra. A coluna Takeoff (Remoção) apresenta o ponto de remoção da amostra. A segunda derivada do gráfico de amplificação produz picos correspondentes à taxa máxima do aumento da fluorescência na reação. O ponto de remoção é definido como o ciclo no qual a segunda derivada se encontra a 20% do nível máximo e indica o final do ruído e a transição para a fase exponencial.

Este gráfico mostra a segunda derivada de um gráfico de amplificação que mostra as posições relativas do pico da segunda derivada e do ponto de remoção.

* Warton, K., Foster, N.C., Gold, W.A., and Stanley, K.K. (2004) A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells. *Gene* 342, 85.



A coluna "Amplification" (Amplificação) fornece a eficiência da amostra. Uma reação 100% eficiente iria resultar num valor de amplificação de 2 para todas as amostras, o que significa que o amplicon duplicou em todos os ciclos. Nos dados não processados, o sinal deve duplicar na fase exponencial. Por exemplo, se o sinal fosse de 50 unidades de fluorescência no ciclo 12 e 51 unidades de fluorescência no ciclo 13, deveria aumentar para 53 unidades de fluorescência no ciclo 14. É calculada a média de todos os valores de amplificação para cada amostra para originar o valor de amplificação que é mostrado no lado direito do ecrã abaixo do botão de alternância. Quanto maior for a variação entre os valores de amplificação estimados de cada amostra, maior será o intervalo de confiança (indicado pelo valor a seguir ao sinal \pm). O intervalo de confiança, para um número de amostra (N) considerável, apresenta uma probabilidade de 68,3% de que a verdadeira amplificação das amostras se encontre neste intervalo (desvio padrão 1). Ao duplicar o intervalo de \pm , é atingido um intervalo de confiança de 95,4% para um N considerável.

Réplicas do calibrador

Tal como no método delta delta C_T , é necessária uma amostra do calibrador e as medições são relativas a esta amostra. As réplicas do calibrador podem ser analisadas dado que, se várias posições das amostras tiverem o mesmo nome, será utilizada a média dos pontos de remoção destas amostras. Para utilizar corretamente esta funcionalidade, certifique-se de que as réplicas têm nomes idênticos.



A amplificação média é utilizada para calcular a expressão. Por exemplo, uma amostra com um valor de amplificação baixo irá demorar mais a atingir um certo número de cópias absoluto do que uma amostra com um valor de amplificação mais elevado. A coluna "Rep. Conc." (Conc. rep.)

da janela **Comparative Quantitation Results** (Resultados de quantificação comparativa) fornece a concentração relativa. A concentração relativa de cada amostra comparada com a amostra do calibrador é calculada com base no ponto de remoção e na eficiência da reação. Isto é expresso em notas científicas.

Nota: O valor apresentado em **Average Amplification** (Amplificação média) à direita do sinal \pm representa o desvio-padrão da amplificação média, após a remoção dos valores atípicos de amplificação. Se este valor for elevado, pode existir um erro maior nos valores de concentração gerais calculados.

As concentrações relativas são calculadas pelo software da seguinte forma:

1. O ponto de remoção de cada amostra é calculado a partir dos picos da segunda derivada.
2. É calculado o aumento médio nos dados não processados 4 ciclos após a remoção. Isto representa o valor de amplificação para a amostra.
3. As amplificações de valores atípicos são removidas, pois representam o ruído na fluorescência de fundo.
4. É calculada a média das restantes amplificações. Esta é a amplificação média.
5. O ponto de remoção médio é calculado para cada réplica do calibrador.
6. A concentração relativa para uma amostra é calculada como $\text{Amplificação}^{\text{Remoção do calibrador} - \text{Remoção da amostra}}$.
7. O resultado é apresentado numa nota científica na coluna "Rep. Conc." (Conc. rep.) da janela **Comparative Quantitation Results** (Resultados de quantificação comparativa).

6.6.7 Discriminação alélica

A discriminação alélica utiliza dados da cinética em tempo real de 2 ou mais canais para genotipar amostras. Para efetuar esta análise, seleccione **Other** (Outro) e, em seguida, **Allelic Discrimination** (Discriminação alélica) na janela **Analysis** (Análise). Quando efetuar a discriminação alélica, não basta clicar duas vezes num canal para o analisar, uma vez que esta análise é efetuada utilizando vários canais simultaneamente. Para efetuar esta análise, mantenha premida a tecla CTRL e clique para realçar os canais que pretende analisar ou arraste o ponteiro do rato sobre estes canais. Quando os canais pretendidos estiverem realçados, clique em **Show** (Mostrar). A lista é atualizada para mostrar todos os canais numa linha, com uma marca de verificação junto aos referidos canais. Isto indica que serão todos utilizados numa análise. Para remover um ou mais destes canais, clique com o botão direito do rato na análise e seleccione **Remove Analysis...** (Remover análise...). Estes canais podem então ser incluídos noutra análise de discriminação alélica. Um canal apenas pode ser utilizado numa análise de cada vez.

Reports (Relatórios): Abre o relatório "Allelic Discrimination Analysis" (Análise de discriminação alélica) para pré-visualização.

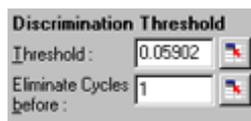
Results (Resultados): Apresenta a janela Allelic Discrimination Results (Resultados de discriminação alélica). Esta janela é aberta por predefinição quando a análise é apresentada pela primeira vez.

Normalization options (Opções de normalização): Está disponível uma variedade de opções para otimizar a normalização dos dados não processados:

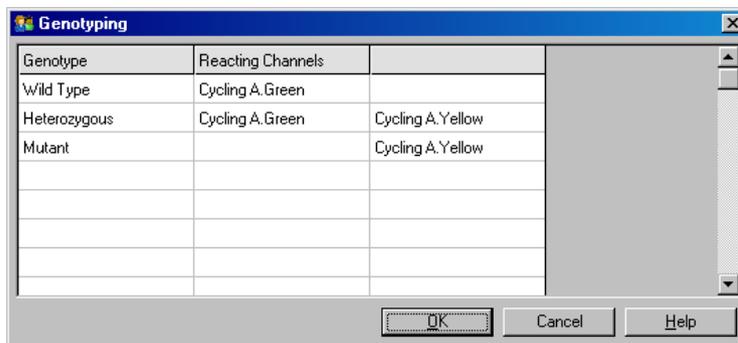
- Dynamic Tube (Tubo dinâmico) (normalização do tubo dinâmico)
- Slope Correct (Correção do declive) (correção do declive do ruído)
- Ignore First x cycles (Ignorar primeiros x ciclos) (correção do ruído nos ciclos iniciais)
- Takeoff point adjustment (Ajuste do ponto de remoção)

Para obter mais informações, consulte a página 91.

Discrimination Threshold (Limiar de discriminação): Introduza valores nestas caixas de texto para posicionar o limiar de discriminação. Todas as curvas que passem este limiar são consideradas amostras de genotipagem. Clique no ícone à direita de cada caixa de texto e, em seguida, arraste o limiar no gráfico para definir visualmente estes valores.



Genotypes (Genótipos): Abre a janela Genotyping (Genotipagem), que é utilizada para determinar que genótipo é detetado em cada canal. Esta janela permite que sejam atribuídos genótipos a canais para a análise de discriminação alélica. No exemplo abaixo, uma amostra é heterozigota se as leituras nos canais Cycling A.Green e Cycling A.Yellow passarem o limiar.



Modelos de análise alélica: Os modelos de análise alélica permitem a exportação de definições de normalização, limiar e genótipo para um ficheiro *.alt único. Este ficheiro pode ser importado e aplicado novamente noutras experiências. Consulte a secção 7.1 para obter mais informações.



6.6.8 Análise do gráfico de dispersão

A análise do gráfico de dispersão possibilita a genotipagem com base na expressão relativa de gráficos de amplificação em 2 canais. Ao contrário da discriminação alélica, o genótipo é decidido com base nas regiões definidas a partir do gráfico de dispersão e não de um único limiar. Para efetuar esta análise, selecione Other (Outro) e, em seguida, Scatter Graph Analysis (Análise do gráfico de dispersão) na janela Analysis (Análise).

Quando efetuar a análise do gráfico de dispersão, não basta clicar duas vezes num canal para o analisar, uma vez que esta análise é efetuada utilizando 2 canais simultaneamente. Para efetuar esta análise, mantenha premida a tecla SHIFT e clique para realçar os canais a analisar ou arraste o ponteiro do rato sobre tais canais. Quando os canais pretendidos estiverem realçados, clique em Show (Mostrar).

A lista é atualizada para mostrar todos os canais numa linha, com uma marca de verificação junto aos referidos canais. Isto indica que serão todos utilizados numa análise. Para remover um ou mais destes canais, clique com o botão direito do rato na análise e selecione Remove Analysis... (Remover análise...). Estes canais podem então ser incluídos noutra análise do gráfico de dispersão. Um canal apenas pode ser utilizado numa análise de cada vez.

Reports (Relatórios):	Abre o relatório Scatter Analysis (Análise de dispersão) para pré-visualização.
Results (Resultados):	Apresenta a janela Scatter Analysis Results (Resultados da análise de dispersão). Esta janela é aberta por predefinição quando a análise é apresentada pela primeira vez.
Normalization options (Opções de normalização):	<p>Está disponível uma variedade de opções para otimizar a normalização dos dados não processados:</p> <ul style="list-style-type: none">• Dynamic Tube (Tubo dinâmico) (normalização do tubo dinâmico)• Slope Correct (Correção do declive) (correção do declive do ruído)• Ignore First x cycles (Ignorar primeiros x ciclos) (correção do ruído nos ciclos iniciais)• Takeoff point adjustment (Ajuste do ponto de remoção) <p>Para obter mais informações, consulte a página 91.</p>
Genotypes (Genótipos):	Abre a janela Genotyping (Genotipagem), que é utilizada para determinar que genótipo é detetado em cada canal. Nesta janela, os genótipos podem ser atribuídos com base nos canais nos quais uma amostra reage. Os canais selecionados serão utilizados para etiquetar os cantos do gráfico de dispersão e irão guiar o utilizador para a área geral do gráfico de dispersão na qual devem ser determinadas as regiões.

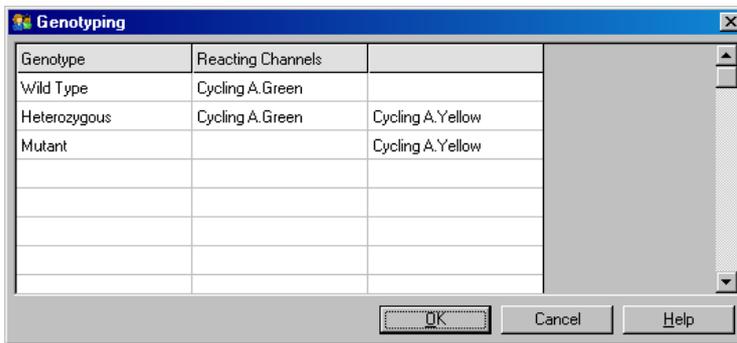
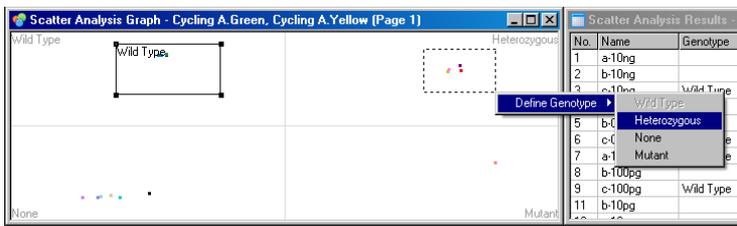


Gráfico de dispersão:

O gráfico de dispersão apresenta a expressão relativa dos 2 canais selecionados. A exibição é normalizada para ter em conta os diferentes aumentos em cada canal e a transformação logarítmica para acentuar as diferenças na expressão entre amostras.

Para efetuar a genotipagem, o utilizador determina regiões clicando e arrastando uma seleção no gráfico. Posteriormente, a seleção pode ser etiquetada com base nos genótipos configurados na janela Genotyping (Genotipagem).



Modelos de análise do gráfico de dispersão:

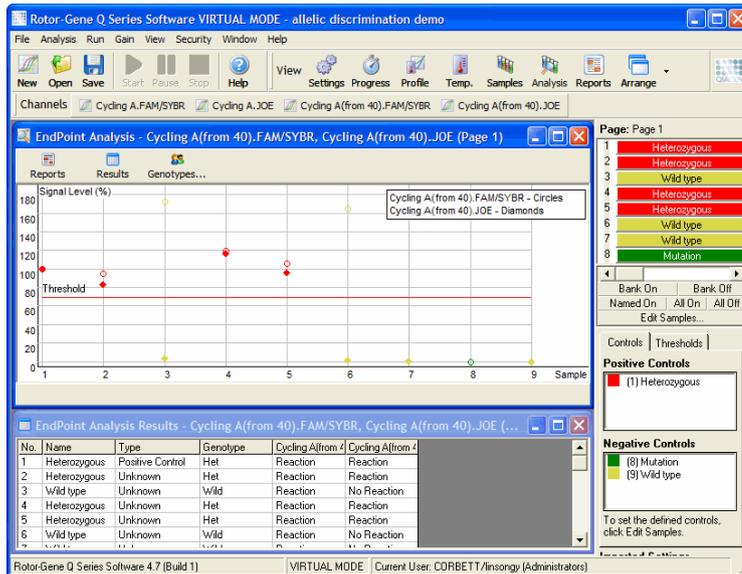
Os modelos de análise do gráfico de dispersão permitem a exportação de definições de genótipo e região para um ficheiro *.sct único. Este ficheiro pode ser importado e aplicado novamente noutras experiências. Consulte a secção 7.1 para obter mais informações.



6.6.9 Análise do ponto final

A análise do ponto final possibilita a discriminação entre amostras amplificadas e não amplificadas no final de uma execução. Os resultados são qualitativos (positivo/negativo) e não quantitativos.

A análise do ponto final é apresentada na captura de ecrã abaixo.



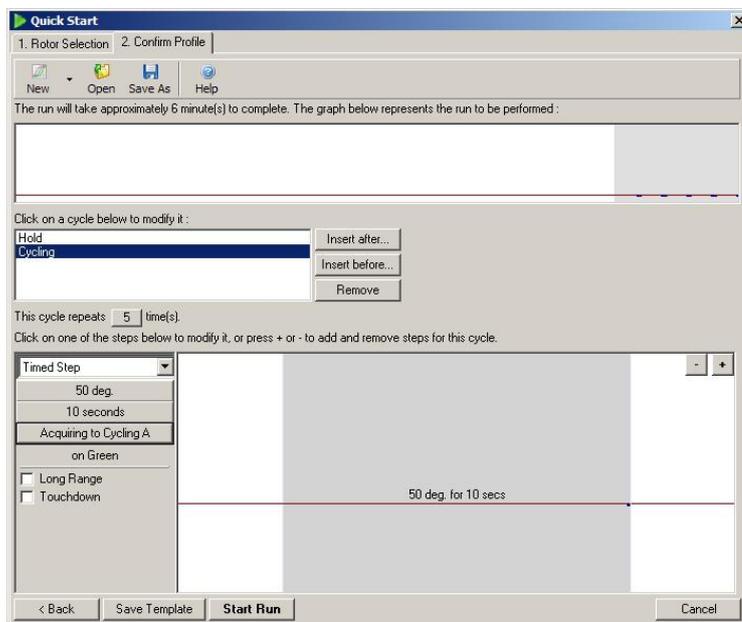
A análise do ponto final é semelhante à discriminação alélica, no sentido em que os resultados são qualitativos e que os nomes podem ser atribuídos a certas permutações de reações em diferentes canais. Contudo, na análise do ponto final, apenas está disponível uma única leitura, ao contrário da discriminação alélica que utiliza uma leitura de ciclo em ciclo para cada amostra. Isto significa que o utilizador deve identificar os controlos positivos e negativos para facilitar a análise. Para os dados não processados, os níveis do sinal são normalizados em relação aos controlos positivos e negativos conhecidos para cada canal. O utilizador seleciona então uma percentagem do nível do sinal para o limiar.

Termos utilizados na análise do ponto final

Em seguida, são explicados alguns dos termos utilizado na análise do ponto final.

- Positive control (Controlo positivo): Trata-se de uma amostra conhecida por amplificar.
- Negative control (Controlo negativo): Trata-se de uma amostra conhecida por não amplificar. Representa o sinal de fundo comum.
- Threshold (Limiar): Trata-se de um nível de sinal acima do qual se considera que uma amostra é positiva (amplificada). Esta definição deve ser ajustada pelo utilizador para cada execução.
- Signal level (Nível de sinal): Uma percentagem de sinal fluorescente, normalizado para que o sinal mais elevado dos controlos positivos seja 100% e o sinal mais baixo dos controlos negativos seja 0%.
- Genotype (Genótipo): Uma interpretação de diferentes permutações de reações em diferentes canais. Por exemplo, o genótipo "heterozygous" (heterozigoto) pode ser atribuído a amostras que reajam em ambos os canais verde e amarelo. O genótipo também pode ser utilizado para a comunicação dos resultados de reações com controlos internos. Por exemplo, os resultados podem ser comunicados como "inhibited" (inibida), "positive" (positiva) ou "negative" (negativa), dependendo se a reação foi observada ou não em determinados canais.

Configuração do perfil



Para efetuar a análise do ponto final, realize um perfil com uma espera de alguns minutos a 50 °C e, em seguida, um passo de ciclagem com 1 passo (50 °C durante 10 s), procedendo à aquisição no canal necessário. Defina o número de repetições para 5, conforme mostrado acima. Estes tempos são meramente orientativos e podem variar na sua aplicação específica. Quantas mais repetições existirem no perfil, mais informações estão disponíveis para efetuar a análise. A análise irá calcular automaticamente a média de todas as leituras para alcançar um único valor para cada amostra. Não é exigido um número específico de repetições. A não ser que seja necessário um nível muito elevado de exatidão, normalmente 5 repetições são suficientes.

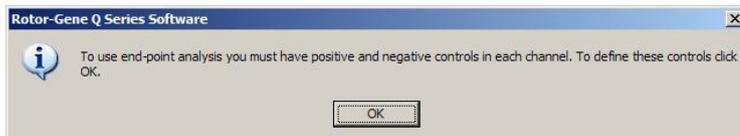
Análise

A análise do ponto final pode ser efetuada simultaneamente em vários canais. Para criar uma nova análise, clique no separador EndPoint (Ponto final), selecione os canais arrastando o ponteiro do rato sobre os mesmos e, em seguida, clique em Show (Mostrar).



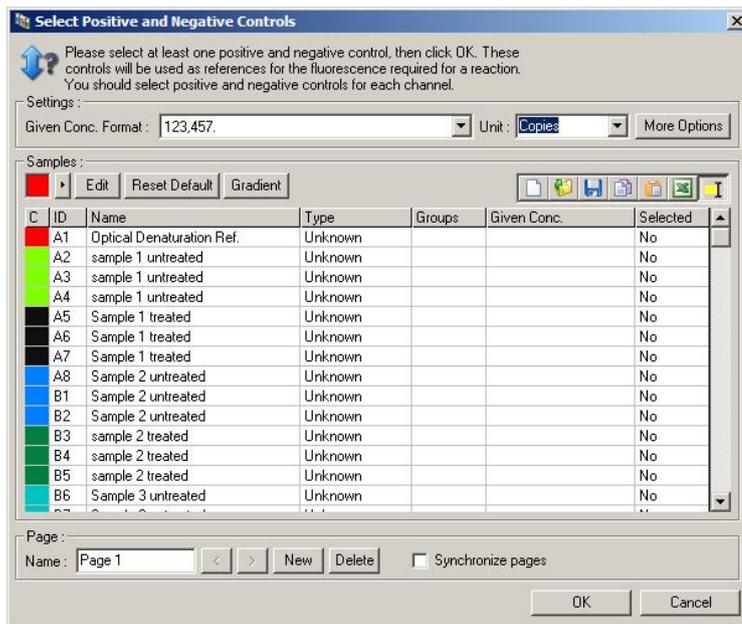
Definir controlos

Quando uma análise do ponto final é aberta pela primeira vez, a seguinte mensagem é apresentada se não tiverem sido definidos controlos positivos e negativos.



Clique em OK. É apresentada a janela Edit Samples (Editar amostras), permitindo que sejam definidos controlos positivos e negativos. Para definir uma amostra como controlo positivo ou negativo, clique na célula do tipo de amostra e, em seguida, selecione o tipo de controlo relevante a partir do menu pendente.

Nota: Os controlos devem ser ativados utilizando o botão de alternância no lado direito da janela principal, para efetuar a análise.



Este ecrã funciona da mesma forma que a janela Edit Samples (Editar amostras) (secção "Configuração da amostra").

Normalização

A normalização dos dados da análise do ponto final representa em forma de escala todos os níveis de sinal dentro do intervalo de 0–100%. Devem ser selecionados pelo menos um controlo positivo e um controlo negativo (ou mais) se forem analisados vários canais e os padrões não forem multiplexados. Devem ser executados mais do que um controlo negativo e positivo se existir um risco de que o controlo positivo não amplifique.

1. São analisados todos os controlos positivos para cada canal e o que apresentar a fluorescência mais elevada é fixado em 100%. Isto significa que se forem executados controlos duplicados, um controlo positivo pode falhar sem afetar a execução.
2. São analisados todos os controlos negativos e o que apresentar a fluorescência mais baixa é fixado em 0%.
3. Os valores de fluorescência de dados não processados das restantes amostras são representados em formato de escala, em relação ao controlo positivo mais elevado e ao controlo negativo mais baixo.

Por exemplo:

Amostra	Tipo	Fluorescência
1	Controlo positivo	53,6
2	Controlo positivo	53,0
3	Controlo negativo	4,5
4	Controlo negativo	4,3
5	Amostra	48,1
6	Amostra	6,4

Esta execução foi bem-sucedida, visto que os 2 controlos positivos e os 2 controlos negativos estão próximos e estão fora dos valores de fluorescência das amostras.

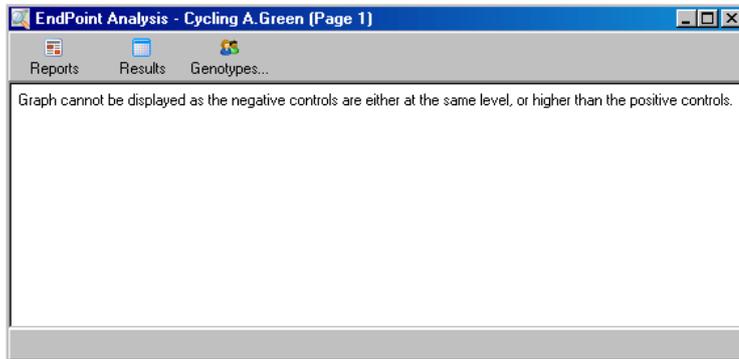
Os valores normalizados são:

Amostra	Tipo	Expressão (%)
1	Controlo positivo	100,0
2	Controlo positivo	97,3
3	Controlo negativo	0,4
4	Controlo negativo	0,0
5	Amostra	84,2
6	Amostra	4,0

A amostra 1 foi o controlo positivo com a fluorescência mais elevada, logo foi definida para 100%. O outro controlo positivo foi ligeiramente inferior. A amostra 4, o controlo negativo mais baixo, foi definida para 0%. É agora evidente que a amostra 5 provavelmente amplificou enquanto a amostra 6 provavelmente não amplificou.

Nota: Dependendo dos controlos positivos e negativos selecionados, é possível atingir níveis de expressão superiores a 100% ou inferiores a 0%. Um resultado superior a 100% pode ser interpretado no sentido de que a amostra é mais fortemente expressa do que os controlos positivos. Um resultado inferior a 0% pode ser interpretado no sentido de que é menos provável que a amostra tenha amplificado do que os controlos negativos terem amplificado. Dado que a análise é qualitativa, tais resultados não são preocupantes.

Se os controlos negativos resultarem numa fluorescência superior à dos controlos positivos, as amostras foram configuradas incorretamente e é apresentada a seguinte mensagem.



Normalização em vários canais

É possível analisar os dados do sinal em vários canais, mas a configuração da amostra é mais complexa. A análise do ponto final assume que é efetuada a multiplexação e, portanto, cada tubo pode ter apenas uma posição única. Atualmente não é possível analisar uma configuração na qual a posição de uma amostra é um controlo positivo para um canal e um controlo negativo para outro.

Embora seja atribuída apenas uma definição de amostra por cada posição do tubo na janela Edit Samples (Editar amostras), a normalização ocorre de forma independente para cada canal.

Se uma posição do tubo for um controlo positivo para pelo menos um canal, deve ser especificado como um controlo positivo na coluna "Type" (Tipo) da janela Edit Samples (Editar amostras). Caso contrário, o seu tipo deve ser Sample (Amostra). Isto também se aplica aos controlos negativos.

Por exemplo, se uma amostra for um controlo positivo no canal verde, mas não no canal amarelo, a amostra deve ser, ainda assim, definida como um controlo positivo. Visto que é utilizado o controlo positivo mais elevado em cada canal, se houver pelo menos um controlo positivo no canal amarelo que amplifica, é ignorada a definição da amostra como um controlo para o canal verde.

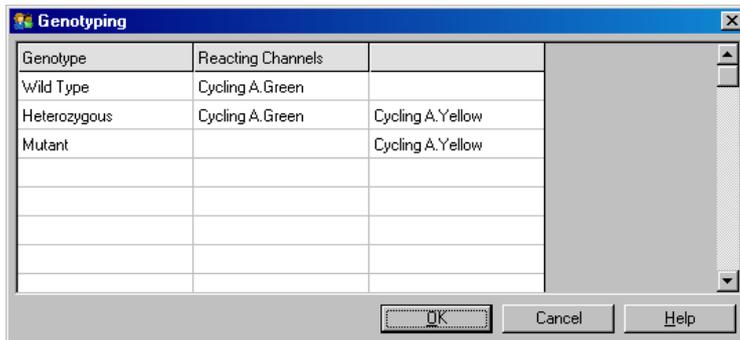
Limiar

O limiar é utilizado para determinar a percentagem da expressão necessária para uma reação em cada canal. Quando os controlos positivos e negativos tiverem sido definidos, todos os canais serão normalizados para a mesma escala de 0–100%. Por este motivo, apenas é necessário um limiar, mesmo quando forem analisados vários canais.

Clique e arraste a linha do limiar para uma zona entre 0 e 100. O limiar não deve estar demasiado próximo das amostras em nenhum dos lados da linha, pois tal indica que a execução não foi conclusiva. Se a diferença entre uma amostra ser definida como amplificada ou não amplificada for apenas uma percentagem mínima, tal significa que se a reação fosse repetida, a amostra poderia aparecer do outro lado do limiar.

Genótipos

Esta opção abre a janela Genotyping (Genotipagem), que é utilizada para determinar que genótipo é detetado em cada canal.



Esta janela permite que os genótipos sejam atribuídos a canais. No exemplo acima, uma amostra é heterozigota se as leituras nos canais Cycling A.Green e Cycling A.Yellow passarem o limiar.

Modelos de análise do ponto final

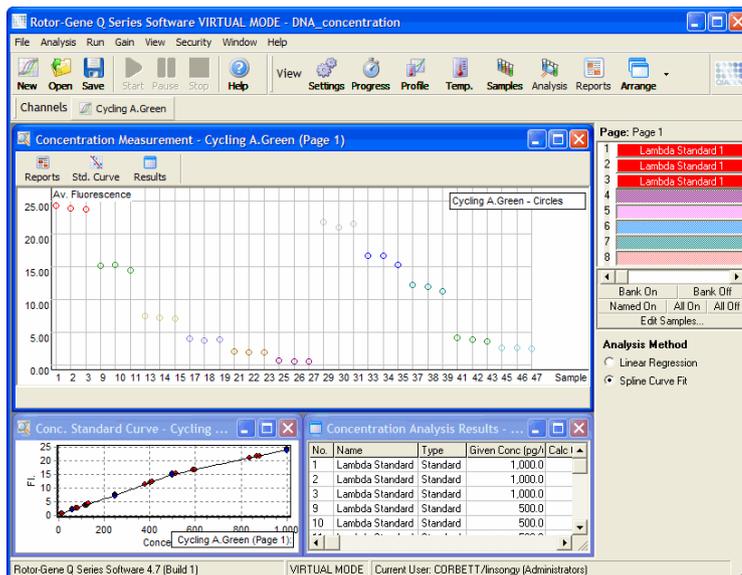
Os modelos de análise do ponto final permitem ao utilizador exportar definições de normalização e limiar para um ficheiro *.ent único. Este ficheiro pode ser importado e aplicado novamente noutras experiências. Consulte a secção 8.1 para obter mais informações.



6.6.10 Análise da concentração

A análise da concentração permite que o Rotor-Gene Q MDx seja utilizado para medir concentrações de ADN ou para obter leituras de fluorímetro.

A captura de ecrã abaixo apresenta esta análise.



Preparar uma execução

Para efetuar uma análise da concentração, primeiro prepare os padrões e amostras de fluorescência, idealmente em triplicado.

Preparação dos padrões

É utilizada uma curva-padrão para determinar a concentração de ADN de cada amostra medida.

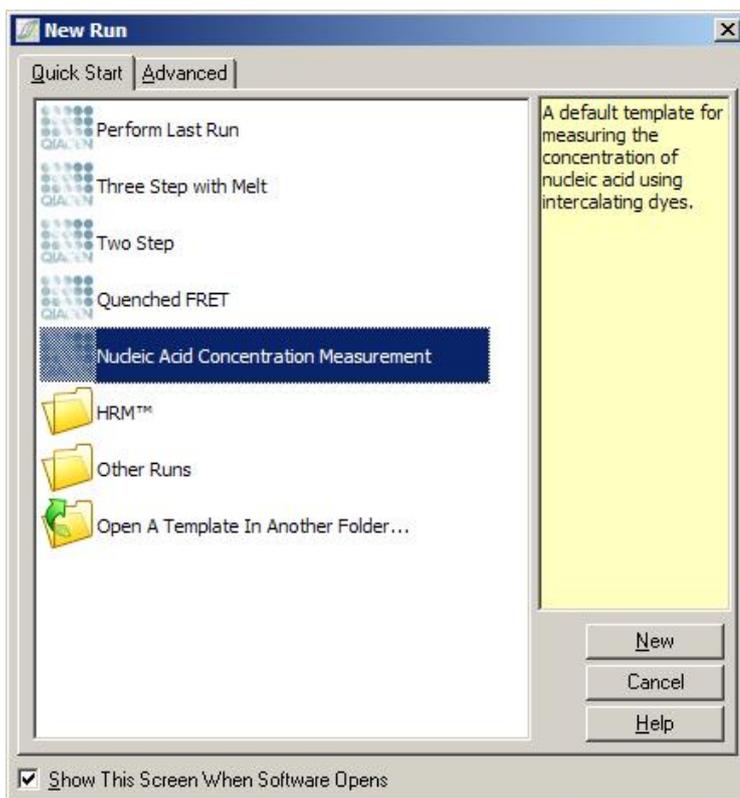
O ADN utilizado para a curva-padrão deve ser um tipo de ADN semelhante, como nas amostras a ser medidas. A concentração de pelo menos uma amostra de ADN deve ser determinada utilizando espectrofotometria ultravioleta e esta amostra deve ser utilizada como o padrão. Deve ser utilizado um mínimo de 3 padrões (com réplicas). Mais importante, os padrões de ADN utilizados na detecção de fluorescência são lineares apenas dentro do intervalo de 1–100 ng/μl. Dentro deste intervalo, se a concentração de ADN for reduzida para metade, o mesmo acontece com a leitura de fluorescência. Os intervalos de confiança para qualquer concentração fora deste intervalo são muito amplos devido à não linearidade do químico.

Tipo de ADN medido

Foram observadas diferenças na medição de várias formas de ADN (por exemplo, ADN genómico comparado ao ADN plasmídico). Desta forma, apenas os tipos semelhantes de ADN devem ser medidos em conjunto e a utilização de ADN plasmídico como um padrão deve ser evitado ao medir ADN genómico.

Configuração da execução

Para configurar a execução, selecione Nucleic Acid Concentration Measurement (Medição da concentração de ácidos nucleicos) no assistente Quick Start (Instalação rápida).



Nota: Certifique-se de que o controlo positivo, como o padrão de concentração elevada, é executado na posição do tubo 1. Sem um controlo positivo, o software não irá conseguir otimizar as definições de ganho para sensibilidade máxima. Isto será solicitado antes de cada execução.

Análise

A análise da concentração funciona relacionando o nível de fluorescência a um valor de concentração. Estão disponíveis dois modelos de análise. A análise ideal a escolher depende do químico e da aplicação.

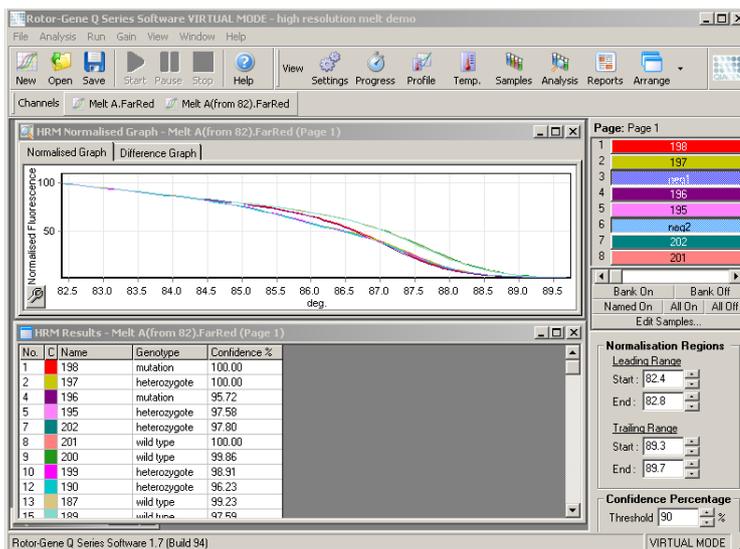
"Linear Regression" (Regressão linear) analisa dados assumindo uma relação linear e estimando valores desconhecidos com base num modelo linear gerado. Determina erros de medição examinando o desvio das leituras de um modelo linear. Se as leituras de concentração forem lineares, esta é a análise mais adequada pois fornece uma análise estatística de variação (ANOVA) ao utilizador.

"Spline Curve Fit" (Ajuste da curva polinomial) assume apenas que os valores de concentração aumentam com a fluorescência. Embora esta abordagem torne as estimativas de dados não lineares mais exatas, não consegue fornecer ANOVA, uma vez que não assume um modelo linear.

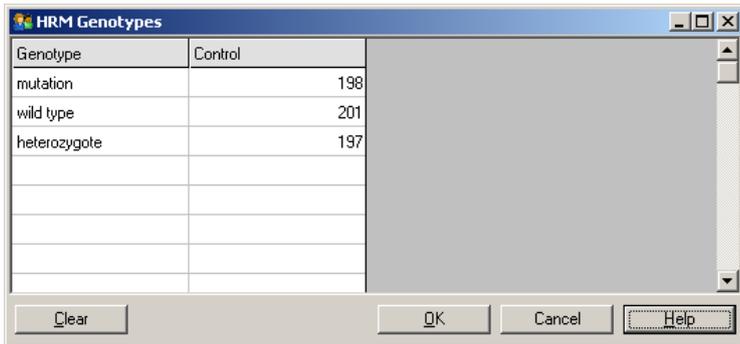
6.6.11 Análise de fusão de alta resolução

A análise de fusão de alta resolução (High Resolution Melt, HRM) caracteriza as amostras com base no comprimento da sequência, conteúdo de GC e complementaridade. A análise de HRM é utilizada em aplicações de genotipagem, como a análise de mutações de genes ou polimorfismos de nucleótido único (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) e em aplicações epigenéticas para análise do estado de metilação do ADN. A análise de HRM fornece resultados exatos e poupanças nos custos de etiquetas e da sonda, comparativamente a outros métodos.

Para efetuar a análise, selecione **Other (Outro)** e, em seguida, **High Resolution Melt Analysis (Análise de fusão de alta resolução)** na janela **Analysis (Análise)**. Clique duas vezes no canal para analisar. As curvas de fusão do canal não processado são normalizadas calculando a média de todos os valores de fluorescência iniciais e finais e, em seguida, forçando os pontos finais de cada amostra a serem iguais à média.



A determinação automática das amostras é alcançada, clicando em **Genotypes (Genótipos)**. Introduza o nome do genótipo, seguido do número da amostra, que é utilizada como um controlo positivo para determinar amostras desconhecidas automaticamente.



Para obter mais informações sobre a análise de HRM, consulte a secção 10.

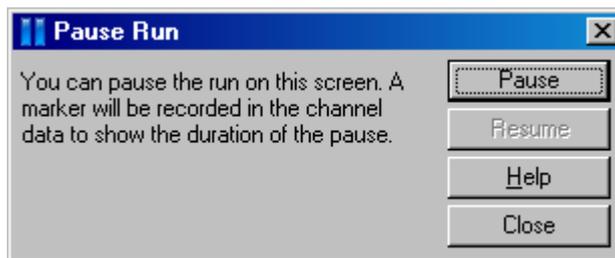
6.7 Menu de execução

6.7.1 Iniciar execução

Esta opção inicia o perfil de temperatura especificado com as definições de ganho atuais. Antes do início da execução, é apresentada a janela Profile Run Confirmation (Confirmação da execução do perfil). É apresentada uma representação gráfica do perfil de temperatura juntamente com as definições de ganho para cada canal.

6.7.2 Colocar a execução em pausa

Esta opção permite que uma execução seja colocada em pausa e retomada. Colocar em pausa e retomar pode afetar seriamente os resultados de uma execução. Por este motivo, um marcador nos dados irá indicar que a execução foi colocada em pausa e a duração da mesma. É também introduzida uma mensagem no separador das mensagens na janela Run Settings (Definições de execução) (consulte a secção 6.8.1).



AVISO



Superfície quente

Quando uma execução estiver em pausa, o Rotor-Gene Q MDx não irá arrefecer completamente até à temperatura ambiente. Tenha cuidado antes de manusear o rotor ou quaisquer tubos do instrumento.

6.7.3 Parar a execução

Se for selecionada esta opção, será apresentado um pedido para confirmar que a execução deve ser parada.

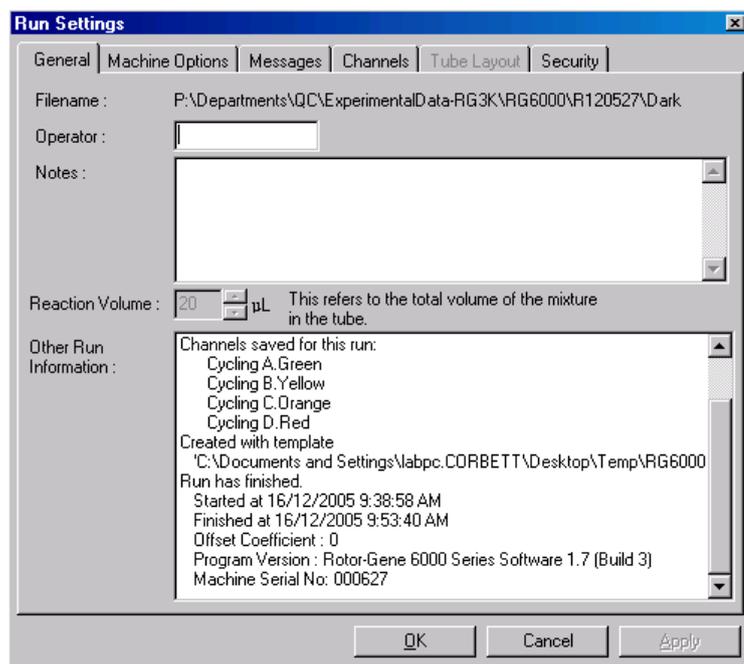
6.8 Menu de visualização

6.8.1 Definições de execução

Geral

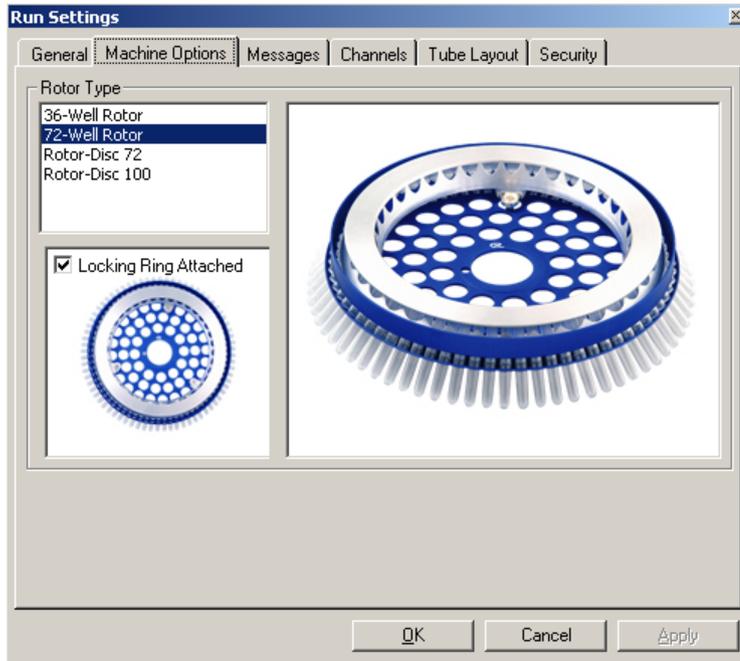
Esta janela permite a configuração de informações de execução, nome do ficheiro de execução, dados da análise, operador e quaisquer notas relacionadas.

A janela contém todas as informações necessárias para configurar uma execução, à exceção do perfil. Após uma execução estar concluída, são apresentadas as seguintes informações na janela: ciclador utilizado, definições do ganho, número de canais e hora de início e fim.



Opções do instrumento

Este separador apresenta definições para a configuração do Rotor-Gene Q MDx.



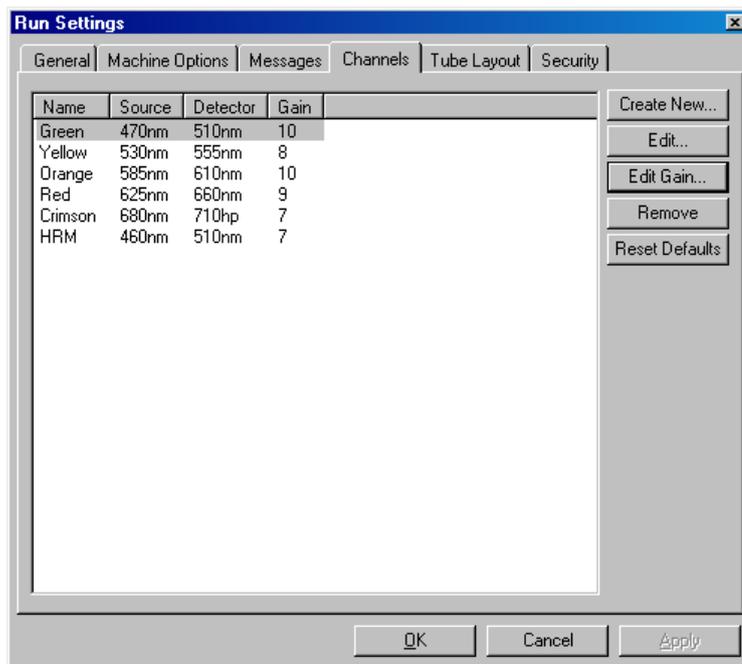
O rotor deve ser definido para o atualmente instalado no Rotor-Gene Q MDx. Ao abrir uma execução existente, esta definição irá refletir o rotor instalado no ciclador naquele momento.

Mensagens

Este separador apresenta mensagens que indicam se o utilizador fez alterações, como colocar o ciclador em pausa ou ignorar ciclos durante uma execução. Também apresenta avisos recebidos durante a execução. É necessário verificar este separador se os resultados não forem os esperados.

Canais

Se configurar uma nova execução, o separador dos canais apresenta a configuração atual dos canais disponíveis. Se visualizar uma execução existente, as informações apresentadas representam a configuração dos canais quando é efetuada a execução. Se uma execução corromper as definições do canal, os canais predefinidos podem ser restaurados clicando em Reset Defaults (Repor predefinições).



- Name (Nome): Nome do canal.
- Source (Origem): Especifica o comprimento de onda da excitação do LED de origem.
- Detector (Detetor): Especifica o comprimento de onda da deteção e o tipo de filtro (nm=passa-banda, hp=passa-alto).
- Gain (Ganho): Especifica o ganho para o canal específico.
- Create New... (Criar novo...): Esta funcionalidade permite a criação de novos canais. Clicar em Create New... (Criar novo...) abre uma janela que solicita um novo nome, origem e filtro de deteção. Os filtros podem ser escolhidos utilizando o menu pendente junto de cada janela.
- Channels (Canais): Os canais verde, amarelo, laranja e vermelho são configurações padrão para a deteção multiplex de 4 canais.

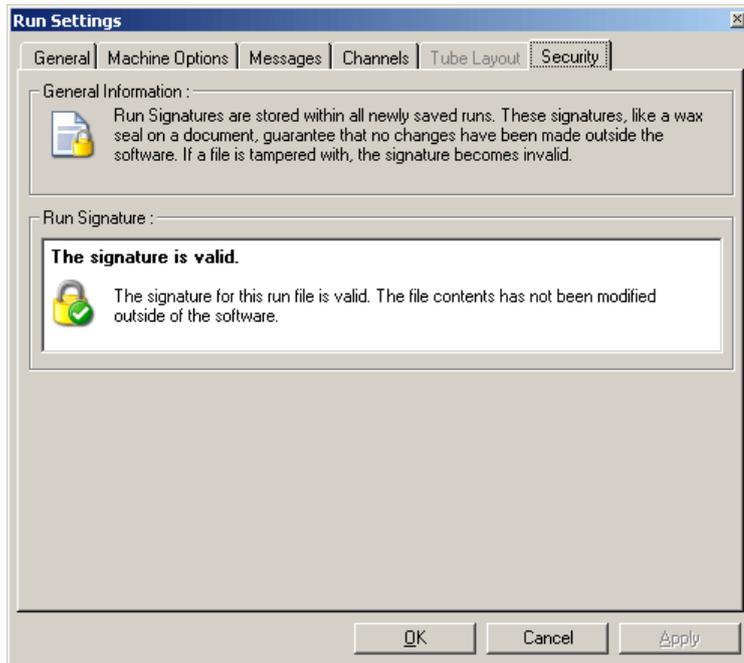
Configuração dos tubos

Se utilizar um 72-Well Rotor, as amostras podem ser organizadas de modo a ter uma correspondência próxima à etiquetagem num bloco de 9 x 8. Por predefinição, o separador de configuração dos tubos possibilita que as amostras sejam etiquetadas sequencialmente (ou seja, 1, 2, 3...). Isto significa que as amostras são etiquetadas consecutivamente pela ordem em que são colocadas no Rotor-Gene Q MDx. Em alternativa, as amostras podem ser etiquetadas como 1A, 1B, 1C etc. Esta opção pode ser útil se as amostras tiverem sido preparadas com uma pipeta multicanal.

Segurança

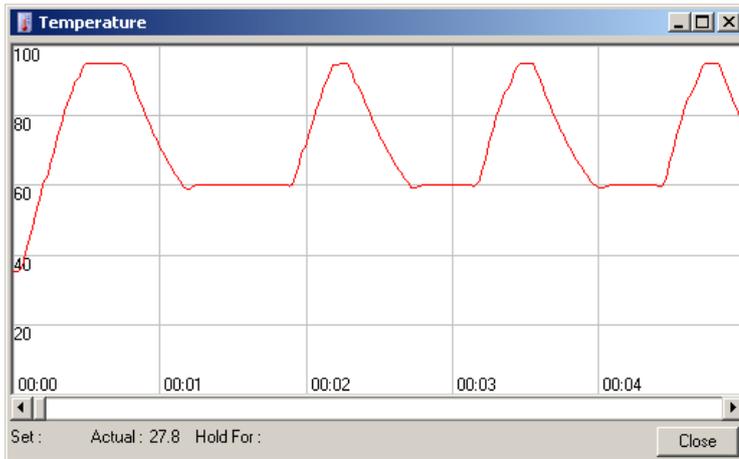
O separador de segurança apresenta informações sobre a assinatura da execução. A assinatura da execução consiste numa chave irreversível que é gerada novamente de cada vez que o ficheiro é alterado. Se qualquer secção do ficheiro *.rex for modificado fora do software, a assinatura e o ficheiro deixarão de corresponder. Verificar a assinatura possibilita a confirmação de que os dados não processados não foram modificados fora da aplicação, o perfil não foi adulterado e o gráfico de temperatura é válido. A assinatura também protege contra a corrupção, como erros no sistema de ficheiros.

Nota: Se forem enviados ficheiros *.rex por e-mail, o processo de encriptação pode invalidar a assinatura. Para evitar esta situação, comprima o ficheiro em zip antes de o enviar por e-mail.



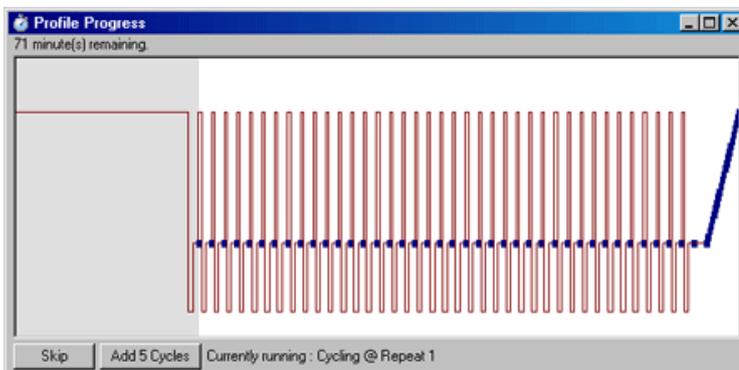
6.8.2 Gráfico de temperatura

Selecione Temperature Graph (Gráfico de temperatura) no menu View (Visualizar) ou clique no botão Temp. para abrir a janela Temperature (Temperatura). O gráfico apresenta a evolução das temperaturas definidas durante a ciclagem. Não reflete uma medição da temperatura em tempo real. À medida que a execução prossegue, o tempo Set (Definido), Actual (Real) e Hold (Em espera) é apresentado para cada passo do programa. Para um ficheiro de execução existente, a janela Temperature (Temperatura) apresenta o histórico de temperatura durante a execução. A escala vertical representa a temperatura e a escala horizontal representa o tempo. Utilize a barra de deslocamento para navegar para a frente e para trás na janela Temperature (Temperatura).



6.8.3 Progresso do perfil

Selecione Profile Progress (Progresso do perfil) no menu View (Visualizar) ou clique no botão Progress (Progresso) para abrir a janela Profile Progress (Progresso do perfil). Esta janela apresenta uma representação gráfica do perfil térmico associado à execução. Ao realizar uma execução, a parte sombreada da janela indica o número de ciclos concluídos. Existe também uma estimativa de quantos minutos irá demorar a concluir a execução.



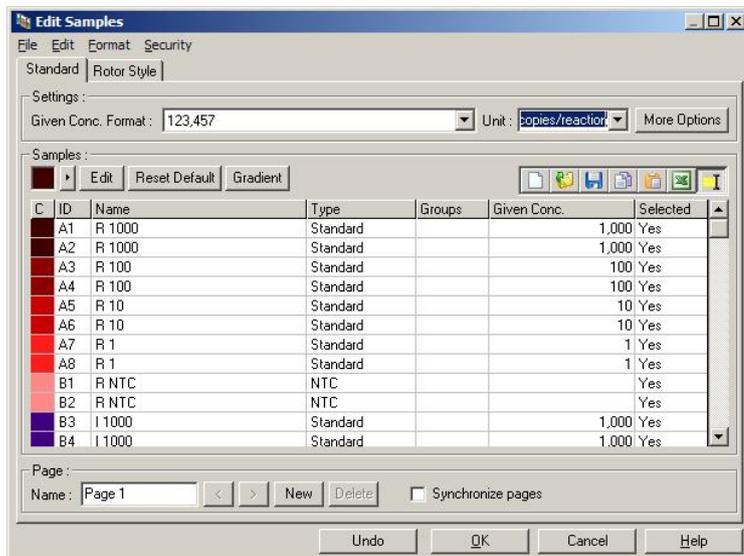
Skip (Ignorar):

Skip (Ignorar) permite ignorar qualquer passo do perfil.

Add 5 Cycles (Adicionar 5 ciclos):

Add 5 Cycles (Adicionar 5 ciclos) adiciona 5 repetições ao passo de ciclagem atual.

6.8.4 Editar amostras



Clique no botão Samples (Amostras) para abrir a janela Edit Samples (Editar amostras). A janela Edit Samples (Editar amostras) também pode ser acedida clicando com o botão direito do rato sobre a lista de amostras no lado direito do ecrã. Esta janela tem funcionalidades idênticas à janela Edit Samples (Editar amostras) nos assistentes, com exceção de que as funcionalidades da barra de ferramentas também estão disponíveis nos menus File (Ficheiro) e Edit (Editar).

São apresentados quatro menus na parte superior da janela: File (Ficheiro), Edit (Editar), Format (Formato) e Security (Segurança). O menu File (Ficheiro) é utilizado para criar uma nova janela (em branco) Edit Samples (Editar amostras), para abrir um modelo de amostras existente ou para guardar nomes de amostras como um modelo para utilização futura. A extensão destes ficheiros de modelos é *.smp. O menu Edit (Editar) permite que as linhas sejam copiadas e coladas. O menu Security (Segurança) permite que as definições da amostra sejam bloqueadas.

Nota: Se os nomes das amostras forem introduzidos muito rápido durante a execução (por exemplo, utilizando um leitor de código de barras), tal pode dar origem a letras transpostas nos nomes das amostras. Por isso, é recomendado que evite utilizar um leitor de código de barras e, se aplicável, introduza os nomes das amostras após a execução ter terminado.



Este menu pendente é utilizado para escolher um formato adequado para a apresentação da concentração. As concentrações são automaticamente formatadas de acordo com a localização selecionada atualmente.



Este menu pendente determina as unidades de medida para o ensaio.



Botão**Importância**

Estilo da linha:

O estilo da linha pode ser modificado para melhorar a legibilidade dos gráficos em impressoras a preto e branco. Certas linhas podem ser salientadas ao modificar o seu estilo. Para aceder a esta funcionalidade, clique no botão com uma seta virada para a direita ao lado do botão Edit (Editar).



Premir "Edit" (Editar) abre o seletor de cores. Podem ser selecionadas várias linhas ao atribuir uma cor aos tubos.



Clique em "Reset Default" (Repór predefinições) para repor as cores de todas as células selecionadas nos valores de cores predefinidos.



"Gradient" (Gradiente) permite que seja escolhido um gradiente desde a primeira à última cor selecionada. Podem ser definidos vários gradientes numa configuração de amostra.



O ícone New (Novo) limpa a janela Edit Samples (Editar amostras) como preparação para a introdução de dados.



O ícone Open (Abrir) abre uma caixa de diálogo na qual pode ser selecionado um ficheiro Rotor-Gene Q MDx para importação.
Nota: O número de amostras na janela aberta e o ficheiro a ser importado devem corresponder.



O ícone Save (Guardar) abre uma caixa de diálogo na qual podem ser introduzidos o nome e a pasta na qual serão guardadas as definições atuais da amostra.



O ícone Copy (Copiar) copia as células selecionadas.



O ícone Paste (Colar) cola as células selecionadas com o comando de copiar na posição selecionada na grelha.



O ícone Excel abre uma caixa de diálogo que solicita o nome do ficheiro e uma pasta para guardar as informações da amostra. Após premir Save (Guardar), o ficheiro Excel abre automaticamente.



O ícone Append/Overwrite (Acrescentar/Substituir) altera a edição das células na janela Edit Samples (Editar amostras). Se optar por substituir, os dados existentes são substituídos ao editar. Se optar por acrescentar, os novos dados são adicionados ao final dos dados existentes ao editar.

Sample Types (Tipos de amostra):

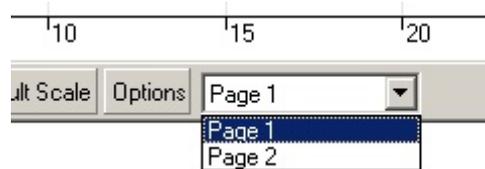
As amostras podem ser definidas como um de vários tipos, listados na tabela seguinte.

Tipo de amostra	Descrição
None (Nenhum)	Nenhuma amostra naquela posição
NTC	Controlo sem modelo
Negative Control (Controlo negativo)	Controlo negativo
Positive Control (Controlo positivo)	Controlo positivo
Unknown (Desconhecido)	Amostra desconhecida a ser analisada
Standard (Padrão)	Os valores-padrão são utilizados para construir uma curva-padrão para calcular concentrações de amostras desconhecidas
Calibrator (RQ) (Calibrador [RQ])	É atribuído um valor de 1 ao calibrador e todas as outras concentrações das amostras são calculadas em relação a esta amostra

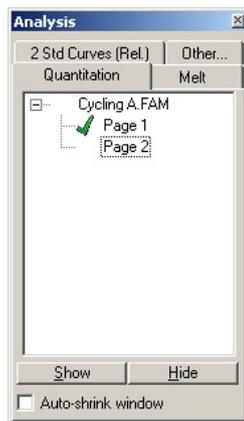
Page (Página):

Esta funcionalidade permite que o utilizador tenha diferentes definições de amostras, assim como experiências separadas, na mesma execução. Isto é útil para a análise de diferentes produtos em diferentes canais. Utilize os botões de seta para alternar entre as páginas de amostras. Utilize os botões New (Novo) e Delete (Eliminar) para criar e eliminar páginas. É possível ter várias definições de amostras para o mesmo canal, para executar várias curvas-padrão sem efetuar multiplexação. Basta que defina as amostras de interesse e as suas curvas-padrão relacionadas em páginas diferentes. O canal único pode, posteriormente, ser analisado com cada conjunto de definições de forma independente. As páginas de amostras podem ser etiquetadas como Page 1 (Página 1), Page 2 (Página 2) etc. ou podem ser designadas com qualquer nome (por exemplo, "Housekeeper" [Constitutiva]). Este nome irá aparecer nos relatórios.

Ao visualizar os dados não processados, é possível selecionar as definições da amostra utilizadas para apresentar os dados através do menu pendente ao lado do botão Options (Opções):



A página de amostras a utilizar quando efetuar uma análise pode ser selecionada na janela Analysis (Análise) (consulte a secção 6.6.1).



Given Conc. (Conc. indicada):

Mostra a concentração para cada um dos padrões. As unidades podem ser definidas como um número decimal ou logarítmico. Se os padrões forem uma série de diluições, apenas é necessário introduzir os primeiros 2 padrões. Ao premir ENTER, o programa adiciona automaticamente a próxima diluição lógica na série.

Estilo da linha:

O estilo da linha pode ser modificado para melhorar a legibilidade dos gráficos em impressoras a preto e branco. Certas linhas podem ser salientadas ao modificar o seu estilo. Para aceder a esta funcionalidade, clique no botão com uma seta virada para a direita ao lado do botão Edit (Editar).



A barra de ferramentas irá apresentar o estilo predefinido Solid (Sólido). Tal pode ser alterado para Dashed (Tracejado), Dotted (Pontilhado), Hairline (Linha muito fina), Thin (Linha fina) ou Thick (Linha grossa). Quando estiver concluído, clique no botão com uma seta virada para a esquerda para voltar a visualizar Edit (Editar), Reset Default (Repor predefinição) e Gradient (Gradiente).



Introdução de várias linhas:

Se for necessário introduzir a mesma informação em várias linhas ao mesmo tempo, selecione todas as linhas e comece a escrever. A informação será introduzida em cada linha. Isto também funciona para selecionar tipos de amostra, escolher cores ou introduzir concentrações.

Tecla de atalho para o tipo de amostra:

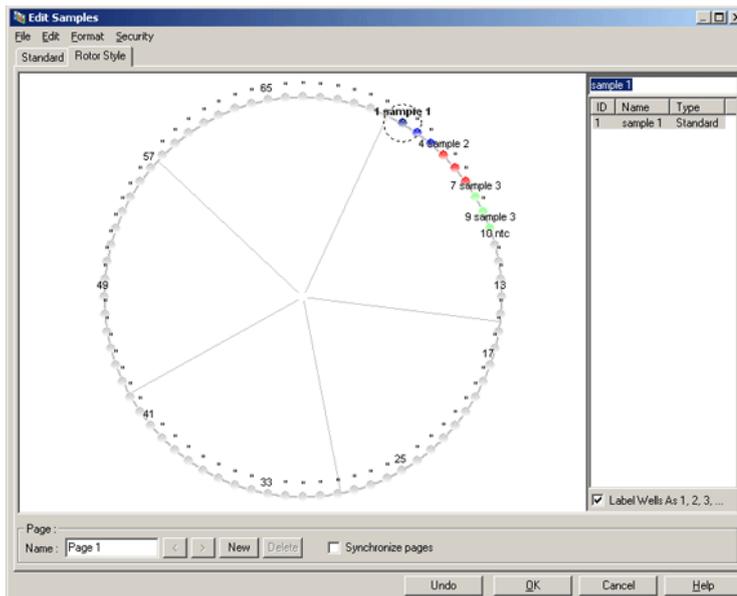
Para selecionar rapidamente um tipo de amostra, introduza a primeira letra do seu nome. Por exemplo, para definir 5 amostras para como controlos sem modelo, selecione-as na coluna do tipo de amostra e, em seguida, prima N para NTC. Todas as amostras serão convertidas em NTC.

Guarde e reutilize:

É possível guardar uma descrição completa da amostra como um ficheiro de amostras (*.smp) e carregá-la para execuções futuras com a mesma configuração da amostra.

Estilo do rotor

Este separador na janela Edit Samples (Editar amostras) fornece uma forma alternativa de introduzir os nomes das amostras. Selecione as réplicas clicando e arrastando o ponteiro do rato sobre a imagem do rotor. A lista no lado direito da janela irá atualizar. O nome da amostra pode ser introduzido e isto irá determinar o mesmo nome para a seleção atual. O software reconhece estes poços como sendo réplicas.

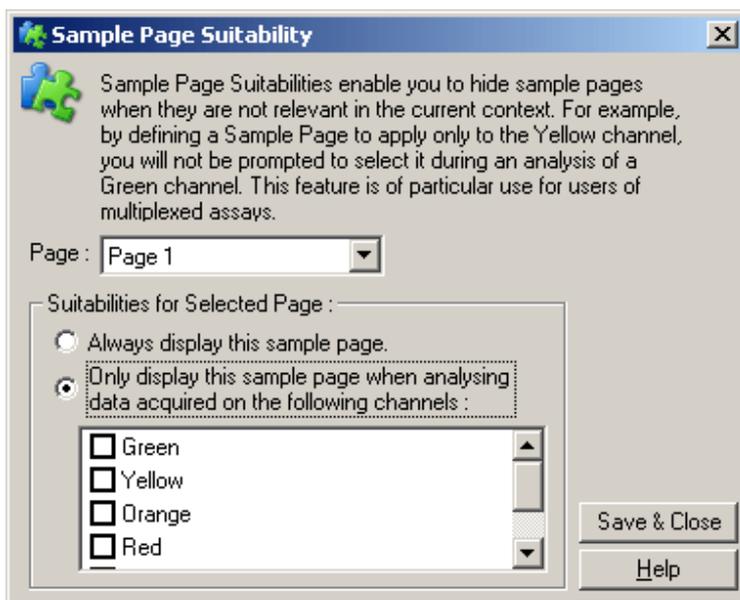


O separador Rotor Style (Estilo do rotor) fornece uma versão reduzida do separador Standard (Padrão) e foi concebido para os utilizadores que pretendem configurar nomes e cores de amostras rapidamente. Não é possível determinar algumas definições neste separador, como por exemplo se a amostra representa um padrão ou a concentração conhecida em cada padrão. Se for necessário determinar as definições, deve ser utilizado o separador padrão.

Adequabilidade da página de amostras

Para aceder à janela Sample Page Suitability (Adequabilidade da página de amostras), clique em More Options (Mais opções) na janela Edit Samples (Editar amostras) e, em seguida, clique em Define Suitabilities (Definir adequabilidades). A janela Sample Page Suitability (Adequabilidade da página de amostras) permite aos utilizadores estabelecer correspondência entre as páginas de amostras aos canais. Por exemplo, a página de amostras para o gene de interesse pode ser aplicável ao canal verde e a página de amostras para o gene constitutivo pode ser aplicável ao canal amarelo. Neste exemplo, configurar a adequabilidade da página de amostras diminui o número de opções de análise disponíveis para incluir apenas as que são relevantes para o ensaio específico.

A janela Sample Page Suitability (Adequabilidade da página de amostras) é apresentada abaixo.

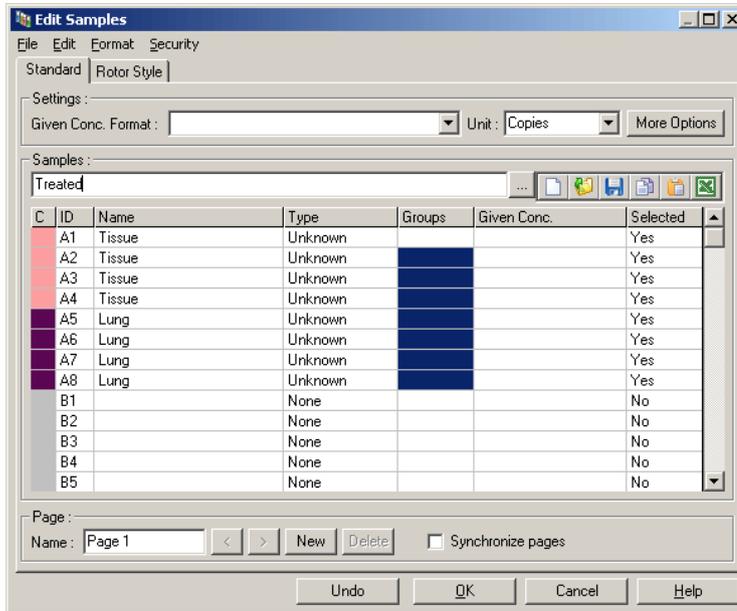


Nota: Ao configurar um ensaio, crie todas as páginas de amostras e adequabilidades da página de amostras e, em seguida, guarde-as como um modelo. Isto diminui a quantidade de configuração necessária para cada execução.

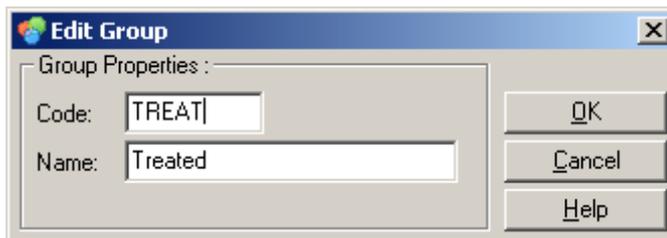
Grupos

Os grupos de amostras possibilitam o cálculo de estatísticas para uma colheita de amostras arbitrária. Ao contrário das réplicas, que devem ter nomes idênticos, as amostras podem ter qualquer nome, podem ser colocadas em qualquer zona do rotor e podem pertencer a vários grupos.

1. Para definir um grupo, introduza o nome completo do grupo junto a uma amostra e, em seguida, prima ENTER.



2. É apresentada a janela Edit Group (Editar grupo).

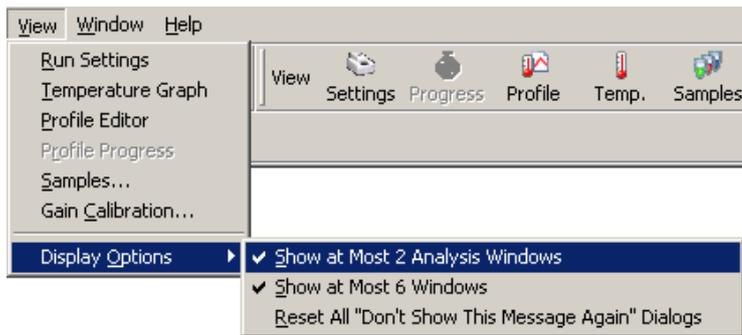


3. Defina uma abreviatura adequada e, em seguida, clique em OK. A abreviatura agora pode ser utilizada para configurar grupos. Os resultados agregados, como o valor médio e intervalos de confiança de 95%, são automaticamente calculados para grupos em qualquer análise.

No.	Name	Type	Ct	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct Stc	Rep. Ct (95% CI)	Rep.
A1	Tissue	Unknown	18.82				18.75	0.17	[18.48, 19.02]	
A2	Tissue	Unknown	18.75							
A3	Tissue	Unknown	18.32							
A4	Tissue	Unknown	18.52							
A5	Lung	Unknown	18.73				18.70	0.09	[18.55, 18.85]	
A6	Lung	Unknown	18.62							
A7	Lung	Unknown	18.81							
A8	Lung	Unknown	18.63							
A1-A8	Treated	Group					18.72	0.13	[18.62, 18.83]	

6.8.5 Opções de apresentação

O menu Display Options (Opções de apresentação) é mostrado abaixo.



Show at Most 2 Analysis Windows (Mostrar no máximo 2 janelas de análise):

Se esta opção estiver marcada, são apresentadas no máximo 2 janelas de análise ao mesmo tempo. Se estiverem abertas várias janelas, a legibilidade pode ser afetada. Marcar esta opção fecha a primeira janela de análise e substitui-a pela última janela aberta. Se a opção não estiver marcada, podem ser apresentadas mais de 2 janelas de análise.

Show at Most 6 Windows (Mostrar no máximo 6 janelas):

Para melhorar a legibilidade, o software remove as janelas não utilizadas quando são abertas novas janelas. Esta opção está ativa por predefinição, pois mantém o ecrã do software Rotor-Gene Q limpo. Se for necessário visualizar mais do que 6 janelas de uma vez, desmarque esta opção.

Reset All "Don't Show This Message Again" Dialogs (Repor todas as caixas de diálogo "Não mostrar esta mensagem novamente"):

Se esta opção for selecionada, o software irá apresentar novamente todas as caixas de diálogo Do not display this message again (Não mostrar esta mensagem novamente) nas quais foi colocada uma marca na caixa de verificação. Isto inclui mensagens sobre definições suspeitas que anteriormente possam ter sido configuradas para não serem apresentadas novamente. Isto pode ser útil para um novo utilizador que não está familiarizado com o Rotor-Gene Q MDx ou com o software Rotor-Gene Q.

6.9 Proteção de acesso ao software Rotor-Gene Q

Nota: Este capítulo descreve a proteção ao acesso para o software Rotor-Gene Q. Consulte o *Manual do utilizador do Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application* ou o *Manual do utilizador do Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* para obter mais informações sobre o software Rotor-Gene AssayManager.

O software Rotor-Gene Q inclui funcionalidades que permitem que este seja utilizado de forma segura. Quando é configurado corretamente, o software Rotor-Gene Q pode assegurar o seguinte:

- O acesso ao Rotor-Gene Q MDx ou ao software de análise é restrito a grupos de utilizadores
- As modificações a ficheiros de execução são registadas
- As modificações não autorizadas são detetadas (assinaturas)
- Os modelos utilizados para efetuar execuções são registados
- Os nomes das amostras estão protegidos

Integração com a segurança do Windows

Para proporcionar um forte nível de responsabilidade, o software Rotor-Gene Q não gere a segurança internamente. As contas, grupos e palavras-passe são todos geridos utilizando o modelo de segurança integrado do Windows (segurança do Windows). A integração permite que a mesma palavra-passe que fornece acesso aos ficheiros e programas da rede controle o acesso ao software Rotor-Gene Q, resultando numa menor administração. Em organizações com grandes dimensões, por exemplo, os administradores da rede podem facilmente remover o acesso a antigos utilizadores devido a um modelo de segurança centralizado.

Por este motivo, configurar o software Rotor-Gene Q com segurança, primeiramente envolve a configuração dos direitos de acesso do Windows, de acordo com as melhores práticas.

Pré-requisitos

Para utilizar a segurança, deve utilizar o Windows 10 ou o Windows 7 Professional Edition. As funcionalidades de segurança não podem ser utilizadas com o Windows 10 ou Windows 7 Home Edition, pois as Home Editions não possuem o modelo de acesso detalhado utilizado pelo software. O software deve ser instalado com a opção Force authentication through Windows domain (Forçar autenticação através do domínio do Windows).

Nota: O menu Security (Segurança) não irá aparecer se estiver com sessão iniciada num domínio Linux Samba. Deve ter um início de sessão local ou um servidor Windows para utilizar as funcionalidades de segurança.

6.9.1 Configuração do Windows 7

Esta secção descreve como configurar o sistema para executar o software Rotor-Gene Q em segurança.

Para utilizar as funcionalidades de segurança, o software deve ser instalado com a opção Force authentication through Windows domain (Forçar autenticação através do domínio do Windows). Tal consulta o domínio do Windows sobre o seu nível de acesso e credenciais e é essencial para fornecer as funcionalidades de segurança e responsabilidade.

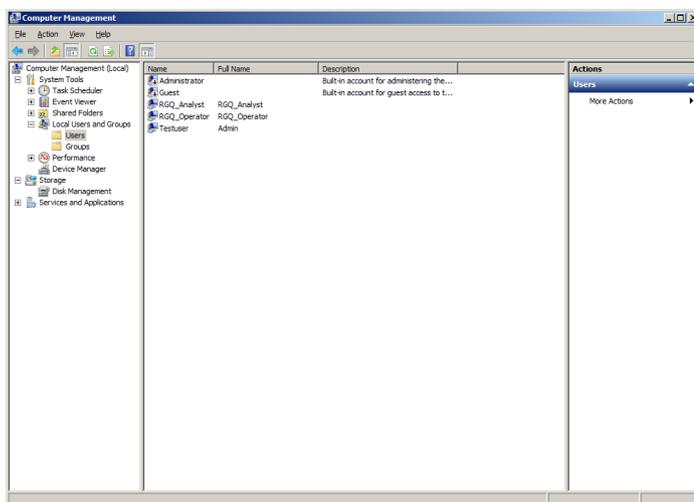
Executar como administrador

Muitos utilizadores utilizam os seus computadores como administrador, sem palavra-passe. Embora isto seja conveniente, torna impossível determinar quem está a utilizar o computador. Isto elimina a responsabilidade e impede a ativação de muitas das medidas de segurança do software Rotor-Gene Q. Ao realizar execuções como administrador, todas as funcionalidades do software são ativadas. Por conseguinte, a execução como administrador assegura que todos os utilizadores que não necessitam de funcionalidades de segurança podem aceder a todas as funcionalidades do software.

Criar uma nova conta de utilizador

Crie contas de utilizador para cada utilizador do software. Para cada utilizador, repita os passos abaixo até que todas as contas tenham sido criadas.

1. Para criar um novo utilizador, selecione Start/Control Panel/Administrative Tools/Computer Management (Iniciar/Painel de controlo/Ferramentas administrativas/Gestão de computadores) e navegue até Local Users and Groups (Utilizadores e grupos locais) no lado esquerdo.
2. Na janela apresentada, selecione a pasta Users (Utilizadores). Clique com o botão direito do rato na janela do lado direito e selecione New User (Novo utilizador).



3. Introduza um nome de utilizador e uma palavra-passe. Por predefinição, o utilizador será criado com privilégios de acesso normais. Isto significa que este utilizador pode executar o software, mas não pode instalar novos programas ou alterar definições do sistema.

The image shows a 'New User' dialog box with the following fields and options:

- User name: newuser
- Full name: New User
- Description: (empty)
- Password: (masked with 5 dots)
- Confirm password: (masked with 5 dots)
- User must change password at next logon
- User cannot change password
- Password never expires
- Account is disabled

Buttons: Help, Create, Close

4. Clique em Create (Criar). Pode agora iniciar sessão como este utilizador.

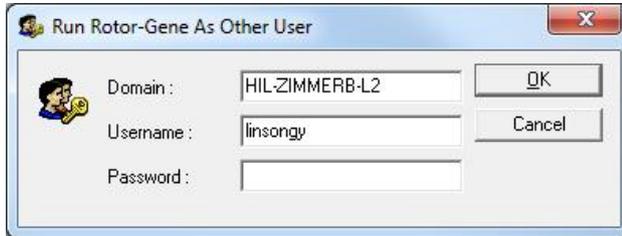
Atribuir funções a cada utilizador

Pode agora atribuir funções a cada utilizador. O acesso é dividido nas seguintes áreas:

- Rotor-Gene Q Operator (Operador do Rotor-Gene Q) — pode efetuar execuções, mas não pode gerar relatórios nem efetuar análises
- Rotor-Gene Q Analyst (Analista do Rotor-Gene Q) — pode analisar dados de execução e gerar relatórios, mas não pode efetuar novas execuções
- Rotor-Gene Q Operator and Analyst (Operador e analista do Rotor-Gene Q) — tem as capacidades de ambas as funções
- Administrator (Administrador) — pode desbloquear nomes de amostras e efetuar todas as operações do analista e operador
- None (Nenhum) — o acesso ao software é recusado

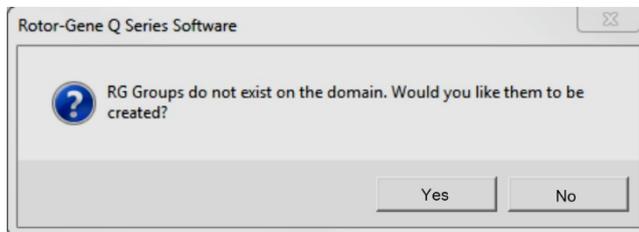
Para atribuir funções:

1. Inicie sessão no Windows como administrador ou utilize o ícone Rotor-Gene Q Software Login (Início de sessão no software Rotor-Gene Q) para abrir o software e iniciar sessão.

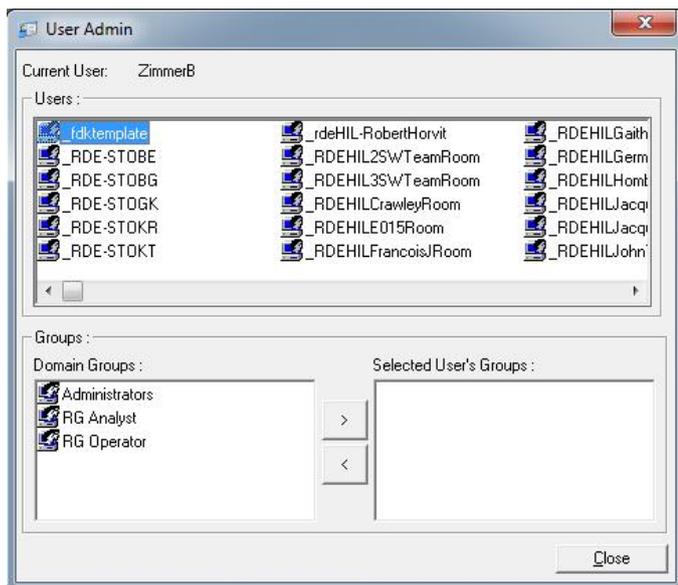


Nota: Para criar os grupos do RG com o software Rotor-Gene Q é necessário executar o software com direitos de administrador. Tal pode ser concretizado ao clicar com o botão direito do rato no ícone do ambiente de trabalho e seleccionar Run as administrator (Executar como administrador) no menu de contexto.

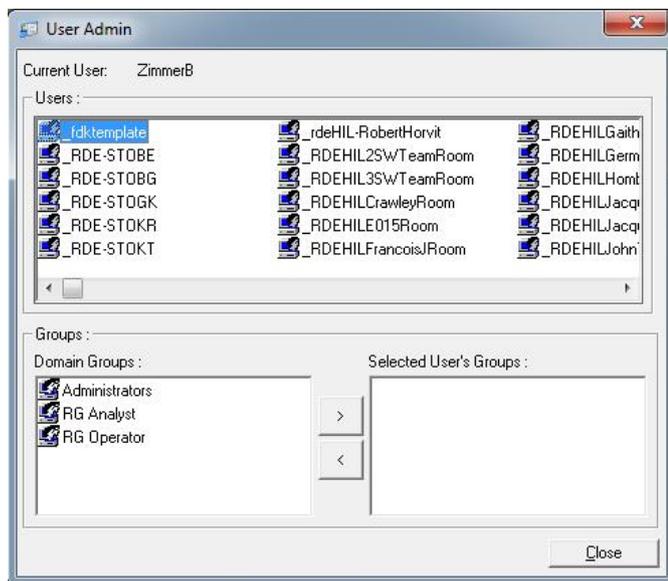
2. Quando o software estiver aberto, clique no menu Security (Segurança). Na primeira vez que aceder ao menu Security (Segurança), o software Rotor-Gene Q configura vários grupos do sistema que irão controlar o acesso ao software.



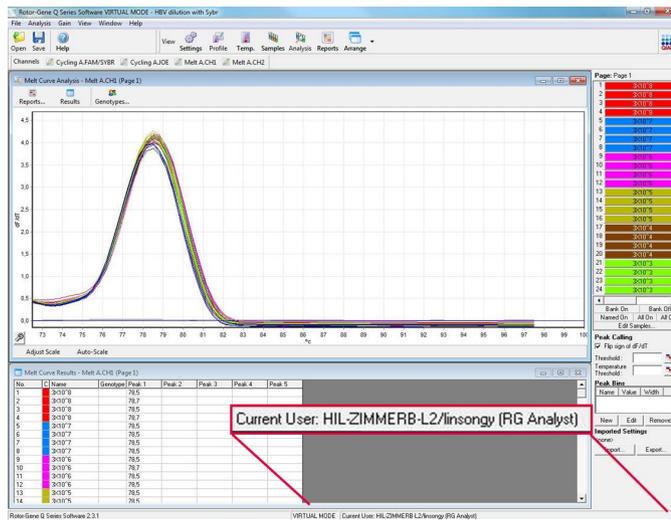
3. Clique em Yes (Sim). A janela User Admin (Administração de utilizadores) é apresentada. No painel superior, são apresentados todos os utilizadores do computador. Algumas contas são utilizadas pelo sistema e, como tal, serão desconhecidas. O painel inferior mostra os grupos atribuídos ao utilizador.



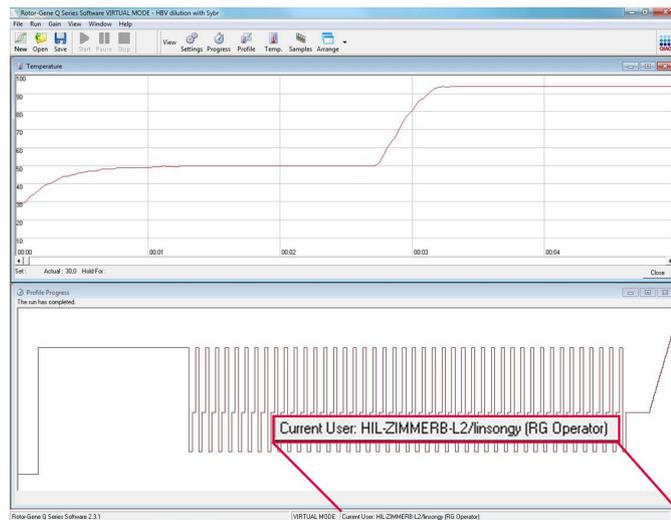
4. Para atribuir um grupo a um utilizador, selecione o nome do utilizador a partir da lista. O painel inferior será atualizado. Se o utilizador não tiver grupos, não pode iniciar o software.
5. No exemplo abaixo, atribuímos o utilizador linsongy ao grupo analista do RG, selecionando o grupo no lado esquerdo e, em seguida, clicando no botão >. Os grupos podem ser removidos selecionando-os e, em seguida, clicando no botão <.



6. Inicie sessão como este utilizador. Enquanto analista do RG, o menu Run (Executar) e o botão Profile (Perfil) não estão disponíveis. Contudo, os ficheiros existentes podem ser abertos e analisados, conforme mostrado na captura de ecrã abaixo. A barra de estado indica que o utilizador linsongy é um analista do RG.



7. Ao iniciar sessão novamente como administrador, os direitos do operador do RG podem ser atribuídos a linsongy e os direitos de analista do RG podem ser novamente removidos. Em seguida, o software deve ser iniciado novamente. Desta vez, o menu Analysis (Análise) e o botão Reports (Relatórios) estão em falta e o menu Run (Execução) está ativo. A barra de estado indica que o utilizador linsongy pertence ao grupo de operador do RG.



8. Se iniciar sessão como administrador e remover todos os grupos do utilizador linsongy, será apresentada a mensagem seguinte quando linsongy abrir o software.



6.9.2 Configuração do Windows 10

Esta secção descreve como configurar o sistema para executar o software Rotor-Gene Q em segurança.

Para utilizar as funcionalidades de segurança, o software deve ser instalado com a opção Force authentication through Windows domain (Forçar autenticação através do domínio do Windows). Tal consulta o domínio do Windows sobre o seu nível de acesso e credenciais e é essencial para fornecer as funcionalidades de segurança e responsabilidade.

Executar como administrador

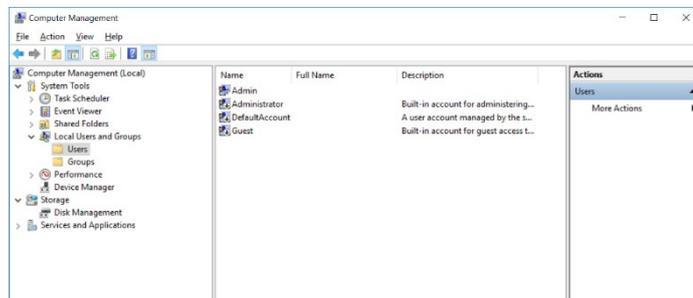
Muitos utilizadores utilizam os seus computadores como administrador, sem palavra-passe. Embora isto seja conveniente, torna impossível determinar quem está a utilizar o computador. Isto elimina a responsabilidade e impede a ativação de muitas das medidas de segurança do software Rotor-Gene Q.

Ao realizar execuções como administrador, todas as funcionalidades do software são ativadas. Por conseguinte, a execução como administrador assegura que todos os utilizadores que não necessitam de funcionalidades de segurança podem aceder a todas as funcionalidades do software.

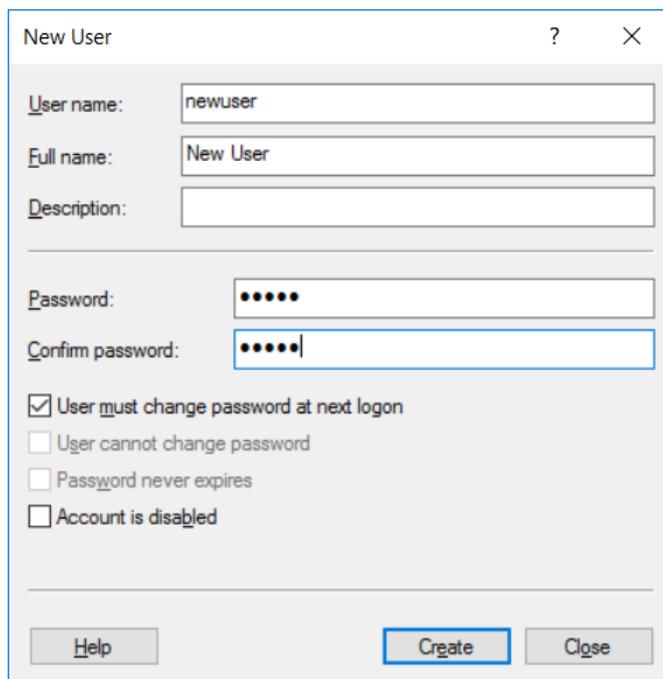
Criar uma nova conta de utilizador

Crie contas de utilizador para cada utilizador do software. Para cada utilizador, repita os passos abaixo até que todas as contas tenham sido criadas.

1. Para criar um novo utilizador, selecione Start (Iniciar), aceda a Computer Management (Gestão de computadores), prima Enter e navegue até Local Users and Groups (Utilizadores e grupos locais) no lado esquerdo.
2. Na janela apresentada, selecione a pasta Users (Utilizadores). Clique com o botão direito do rato na janela do lado direito e selecione New User... (Novo utilizador...).



3. Introduza um nome de utilizador e uma palavra-passe. Por predefinição, os utilizadores serão criados com privilégios de acesso normais. Isto significa que este utilizador pode executar o software, mas não pode instalar novos programas ou alterar definições do sistema.



4. Clique em Create (Criar). Pode agora iniciar sessão como este utilizador.

Atribuir funções a cada utilizador

Pode agora atribuir funções a cada utilizador. O acesso é dividido nas seguintes áreas:

- Rotor-Gene Q Operator (Operador do Rotor-Gene Q) — pode efetuar execuções, mas não pode gerar relatórios nem efetuar análises
- Rotor-Gene Q Analyst (Analista do Rotor-Gene Q) — pode analisar dados de execução e gerar relatórios, mas não pode efetuar novas execuções
- Rotor-Gene Q Operator and Analyst (Operador e analista do Rotor-Gene Q) — tem as capacidades de ambas as funções
- Administrator (Administrador) — pode desbloquear nomes de amostras e efetuar todas as operações do analista e operador
- None (Nenhum) — o acesso ao software é recusado

Nota: No Microsoft Windows 10, não é possível criar grupos de utilizador dentro do software Rotor-Gene Q. Os grupos têm de ser criados no domínio por um administrador do domínio, assim como a atribuição de utilizadores a um grupo específico. É ativado o menu Run (Execução). A barra de estado indica que o utilizador linsongy pertence ao grupo de operador do RG.

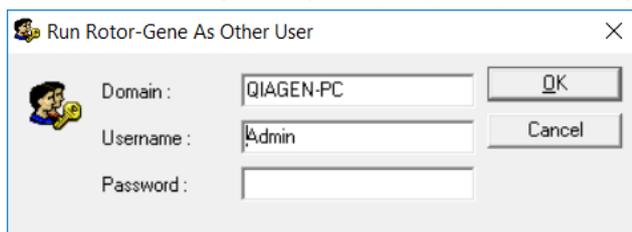
6.9.3 Executar vários utilizadores no mesmo computador

Para utilizar o software Rotor-Gene Q com vários utilizadores, crie uma nova conta de utilizador que não tenha acesso ao software Rotor-Gene Q. Inicie sessão no Windows utilizando esta conta para que os utilizadores não consigam aceder anonimamente ao Rotor-Gene Q MDx.

1. Ao utilizar o ícone Rotor-Gene Q Software Login (Início de sessão no software Rotor-Gene Q), os utilizadores podem abrir as suas contas de utilizador no software Rotor-Gene Q.



2. Introduza o nome de utilizador e a palavra-passe (obrigatório) na caixa apresentada.



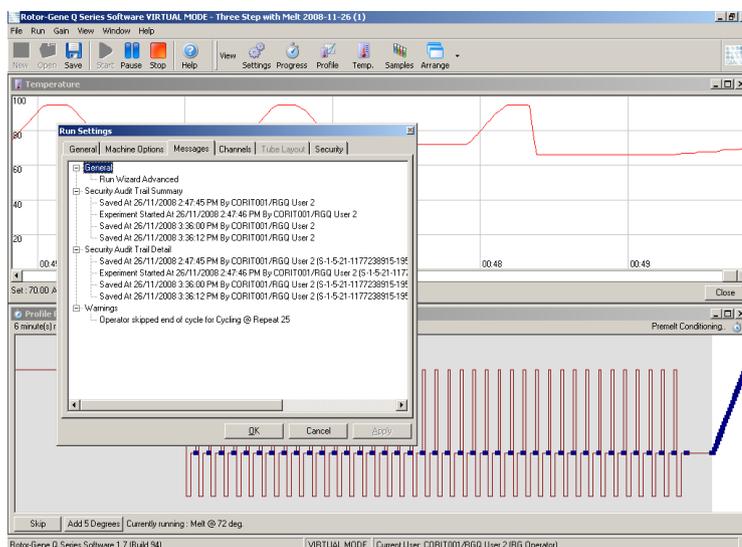
3. O domínio corresponde ao computador no qual está a iniciar sessão ou o nome da sua rede local, juntamente com o nome do anfitrião. Consulte o administrador da sua rede se não tem a certeza de que domínio deve introduzir neste campo.

Nota: Depois de iniciar sessão, todos os ficheiros do utilizador ficarão disponíveis. Todos os utilizadores podem guardar ficheiros na sua própria área. Isto assegura um alto nível de segurança.

Nota: Todos os utilizadores devem terminar sessão depois de a sua execução estar concluída, para evitar que outros utilizadores efetuem uma execução em seu nome.

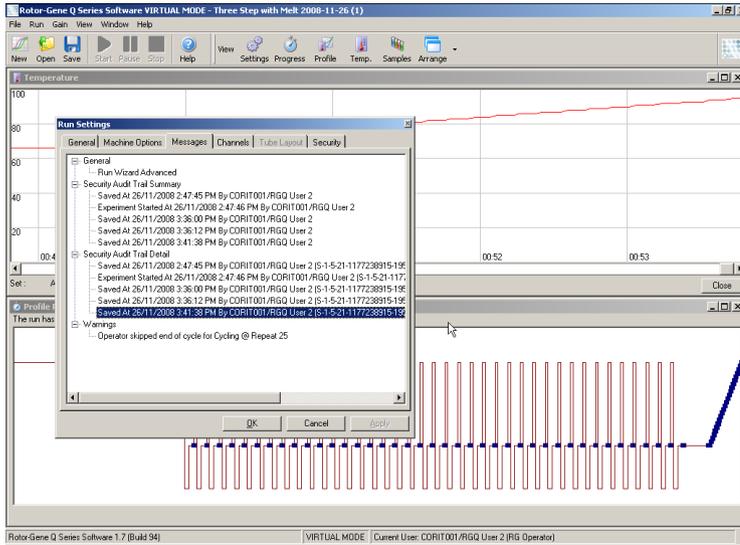
6.9.4 Pistas de auditoria

Sempre que um ficheiro é guardado por um utilizador, os seus detalhes são registados em Run Settings (Definições de execução), no separador Messages (Mensagens), como Security Audit Trail Summary (Resumo das pistas de auditoria de segurança) e Security Audit Trail Detail (Detalhes das pistas de auditoria de segurança).



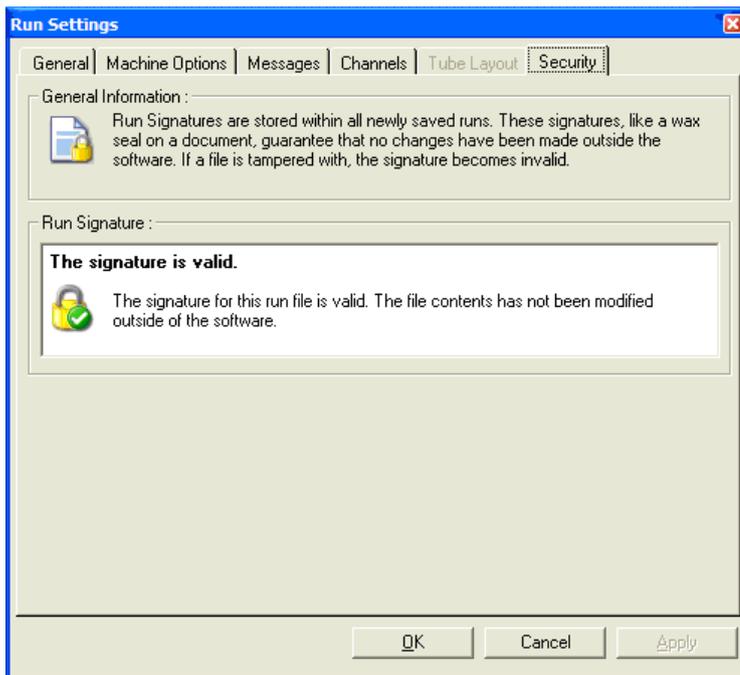
Isto pode ser utilizado para monitorizar quem modificou os conteúdos de um ficheiro. Em Security Audit Trail Detail (Detalhes das pistas de auditoria de segurança) estão presentes mais detalhes, como o identificador único do utilizador. Este identificador é importante para evitar que um utilizador crie uma conta com o mesmo nome noutro computador e, assim, se faça passar por outro utilizador. Neste caso, os nomes de utilizador serão os mesmos, mas as ID da conta serão diferentes.

O identificador para o utilizador 2, S-1-5-21-1177238915-195, da conta CORIT001/RGQ, é apresentado nos detalhes.

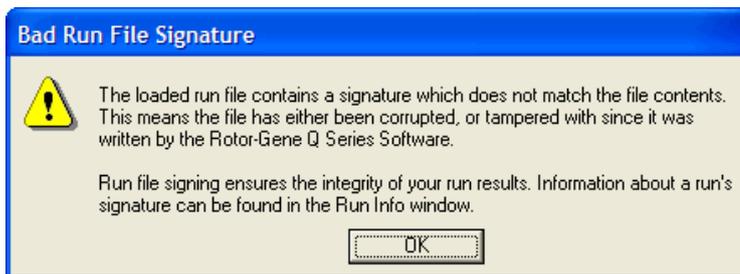


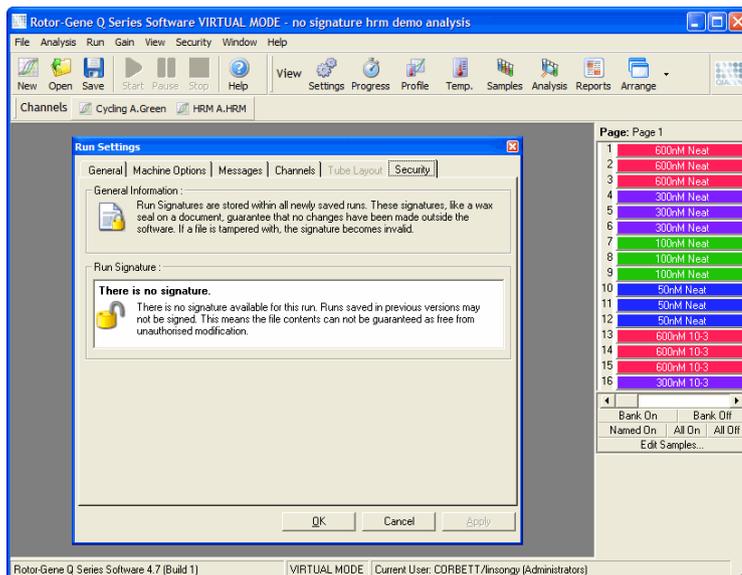
6.9.5 Assinaturas de execução

A pista de auditoria está armazenada no ficheiro de execução do Rotor-Gene Q. Para evitar modificações indesejadas nestes ficheiros, estes devem ser guardados num local seguro e estar acessíveis apenas a contas Windows designadas. Contudo, se os ficheiros forem guardados numa área comum, a execução de assinaturas fornece segurança adicional. A captura de ecrã mostra o separador Security (Segurança) em Run Settings (Definições de execução) de um ficheiro com uma Run Signature (Assinatura de execução).



A Run Signature (Assinatura de execução) consiste numa palavra longa gerada de cada vez que o ficheiro é guardado e associado aos conteúdos do ficheiro. Por exemplo, a assinatura para este ficheiro é 517587770f3e2172ef9cc9bd0c36c081. Se o ficheiro for aberto em Notepad e for feita uma edição (por exemplo, a data de execução é alterada para 3 dias antes), é apresentada a seguinte mensagem quando o ficheiro é novamente aberto.





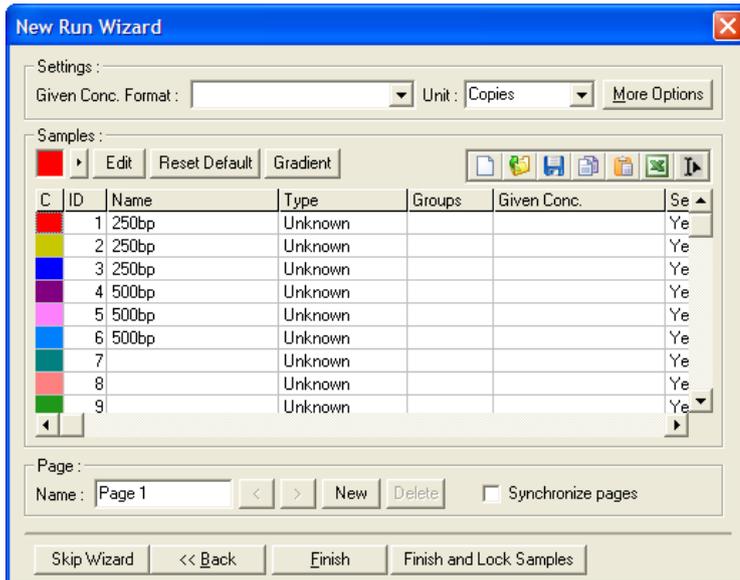
Nota: Se os ficheiros forem enviados por e-mail, o processo de encriptação pode invalidar a assinatura. Para evitar esta situação, comprima o ficheiro em zip antes de o enviar por e-mail.

6.9.6 Bloqueio das amostras

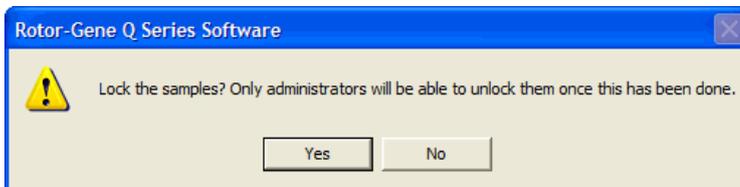
É importante certificar-se de que os nomes das amostras não são acidentalmente ou intencionalmente alterados quando o utilizador inicia uma execução. Por este motivo, o software Rotor-Gene Q dispõe de bloqueio das amostras. Os nomes das amostras podem ser bloqueados por qualquer utilizador, mas apenas podem ser desbloqueados por um administrador. Para utilizadores que utilizam os seus computadores em modo de administrador, esta opção tem um valor limitado. Para utilizar esta opção, o computador deve ser configurado de forma segura, conforme descrito nas secções anteriores.

Nota: Caso pretenda bloquear amostras, não execute o software como um administrador. Crie uma conta com os grupos de analista do RG e operador do RG e mantenha a palavra-passe de administrador em segredo. Os utilizadores irão necessitar da autorização do administrador para desbloquear ficheiros.

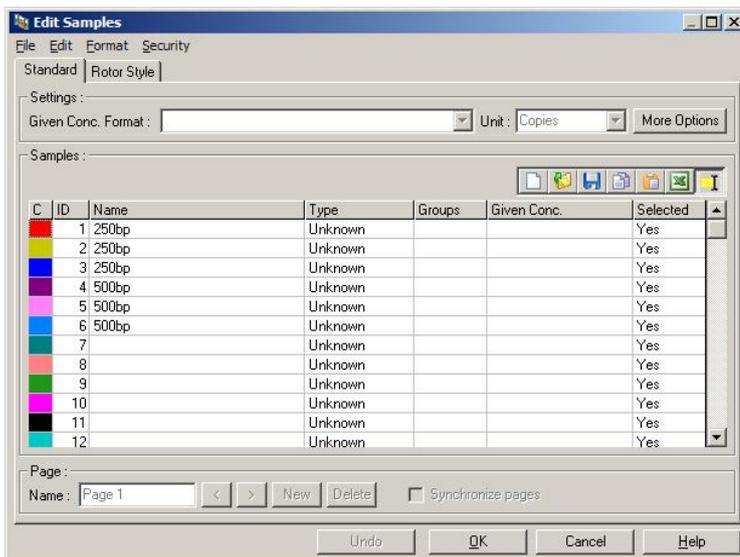
As amostras podem ser bloqueadas antes do início de uma execução com o assistente Advanced (Avançado), clicando em Finish and Lock Samples (Concluir e bloquear amostras).



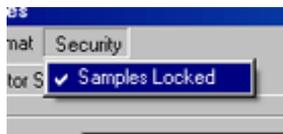
Será apresentado o seguinte aviso. Clique em Yes (Sim) para confirmar.



Quando as amostras estiverem bloqueadas, não será possível editar as amostras na janela Edit Samples (Editar amostras).



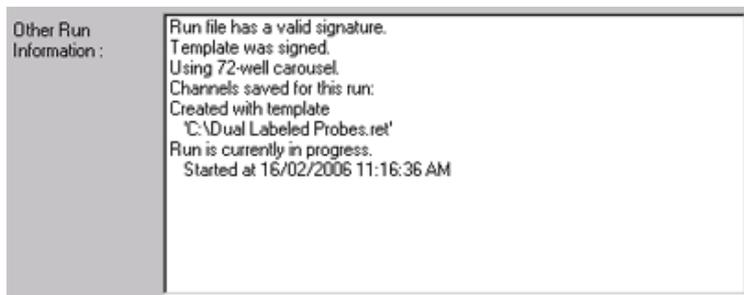
As amostras também podem ser bloqueadas e desbloqueadas na janela Edit Samples (Editar amostras). Contudo, apenas um administrador pode desbloquear amostras, depois de serem bloqueadas.



Qualquer alteração não autorizada ao ficheiro irá invalidar a execução de assinaturas.

6.9.7 Modelos bloqueados

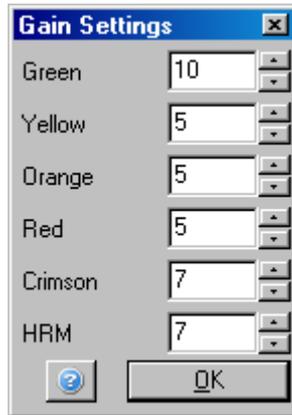
Atualmente não é possível o utilizador criar ficheiros de modelos só de leitura, utilizando o software Rotor-Gene Q. Contudo, se pretendido, pode ser especificado como requisito que todas as execuções sejam efetuadas utilizando um ficheiro de modelo específico. Para assegurar um acesso só de leitura a este modelo, é necessário que este seja guardado numa unidade de rede na qual os utilizadores não consigam modificar dados. Os utilizadores podem, ainda assim, modificar os seus próprios perfis, enquanto o modelo numa unidade de rede, como esta, estiver protegido. Para monitorizar que modelo foi utilizado, o software Rotor-Gene Q guarda o nome do ficheiro do modelo que foi executado. Esta informação pode ser acedida clicando no botão Settings (Definições) que, em seguida, apresenta a janela Run Settings (Definições de execução). As informações do modelo são guardadas em Other Run Information (Outras informações de execução).



6.10 Menu de ganho

Clique no menu Gain (Ganho) para visualizar as Gain Settings (Definições de ganho) para a execução atual. Isto determina o ganho para o canal especificado antes de uma execução. As definições de ganho são retidas da execução anterior. Estas podem ser modificadas se a execução ainda não tiver começado ou se estiver nos ciclos iniciais. Utilize as setas para cima/baixo junto de cada campo de texto para modificar os campos. Em seguida, clique em OK.

O ganho pode ser alterado durante os ciclos iniciais. Será desenhada uma linha vermelha no canal adequado, mostrando o local no qual o ganho foi alterado. Os ciclos antes da alteração do ganho serão excluídos da análise.



6.11 Menu de janelas

Este menu permite que as janelas sejam dispostas na vertical, horizontal ou em cascata. É possível aceder a mais opções clicando na seta no lado direito do botão Arrange (Dispor).

6.12 Função de ajuda

Quando utilizar o botão ou o menu Help (Ajuda), será aberto o menu pendente seguinte.

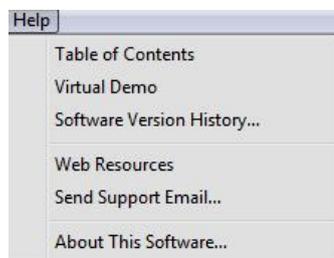


Table of Contents (Índice):	Dá acesso à função de ajuda.
Virtual Demo (Demonstração virtual):	Faz ligação a uma página do site da QIAGEN com uma demonstração interativa do software.
Software Version History... (Histórico da versão do software...):	Dá uma breve visão geral das novas funcionalidades adicionadas desde o lançamento do software previamente instalado.
Web Resources (Recursos da Web):	Abre uma página no site da QIAGEN numa nova janela do browser com as informações relevantes mais recentes sobre os instrumentos Rotor-Gene Q MDx e respetivos reagentes.
About This Software... (Sobre este software...):	Fornece informações sobre a máquina ligada, o número de série do Rotor-Gene Q MDx e a versão do software.

6.12.1 Enviar e-mail de assistência

A opção **Send Support Email** (Enviar e-mail de assistência) no menu **Help** (Ajuda) permite enviar um e-mail de assistência para a QIAGEN a incluir todas as informações relevantes de uma execução. A opção **Save As** (Guardar como) irá guardar todas as informações num ficheiro que pode copiar para um disco ou uma rede caso não tenha acesso ao e-mail no computador que estiver a executar o Rotor-Gene Q MDx.

Ao utilizar pela primeira vez a função de e-mail de assistência num portátil, fornecido opcionalmente com o Rotor-Gene Q MDx (dependendo do país), será necessário configurar as definições do e-mail.

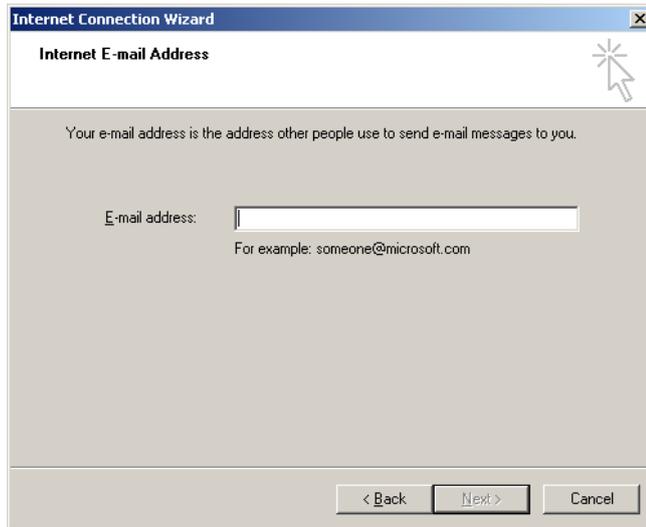
Nota: Pode efetuar as entradas do gestor de TI da sua empresa.

Configurar as definições do e-mail

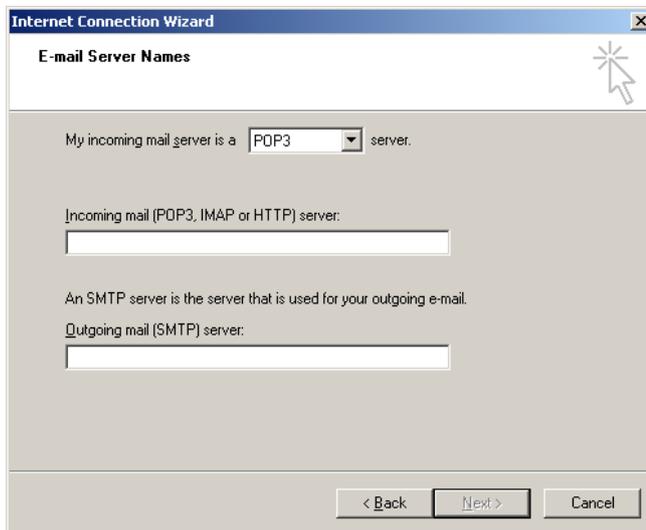
Clique na opção **Send Support Email...** (Enviar e-mail de assistência...). Será aberta a janela seguinte.



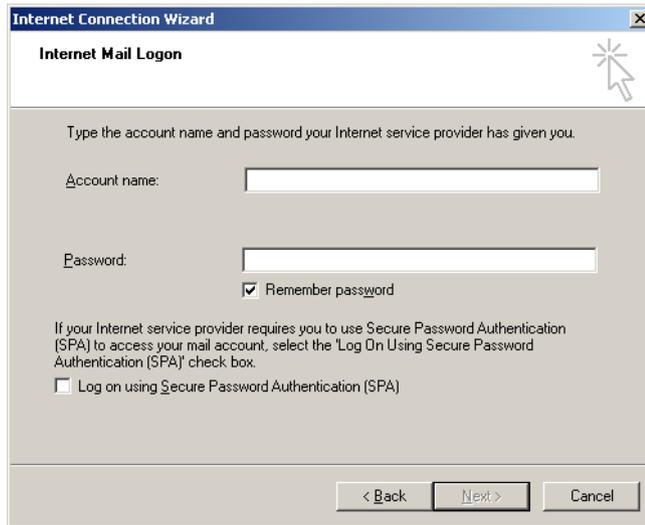
1. Introduza o seu nome e clique em **Next** (Seguinte). Será aberta a janela **Internet E-mail Address** (Endereço de e-mail da Internet).



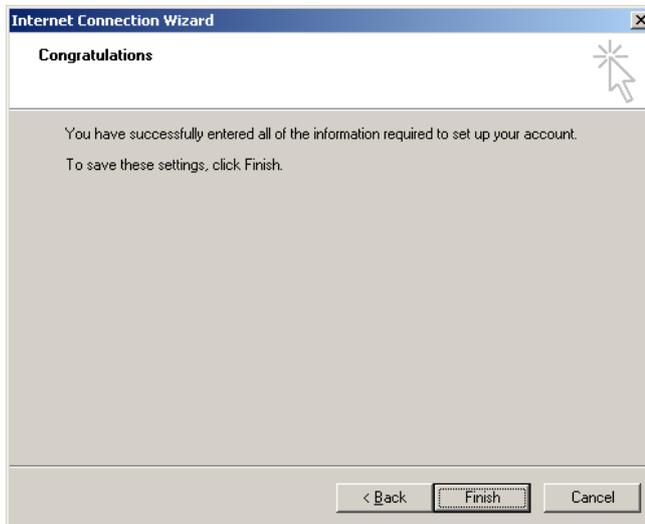
2. Introduza o seu endereço de e-mail e prima Next (Seguinte). Será aberta a janela E-mail Server Names (Nomes do servidor de e-mail).



3. Selecione o tipo de servidor de e-mail para a recepção de e-mails e especifique os nomes de servidor para a recepção e envio de e-mails. Em seguida, prima Next (Seguinte). Será aberta a janela Internet Mail Logon (Início de sessão no e-mail da Internet).



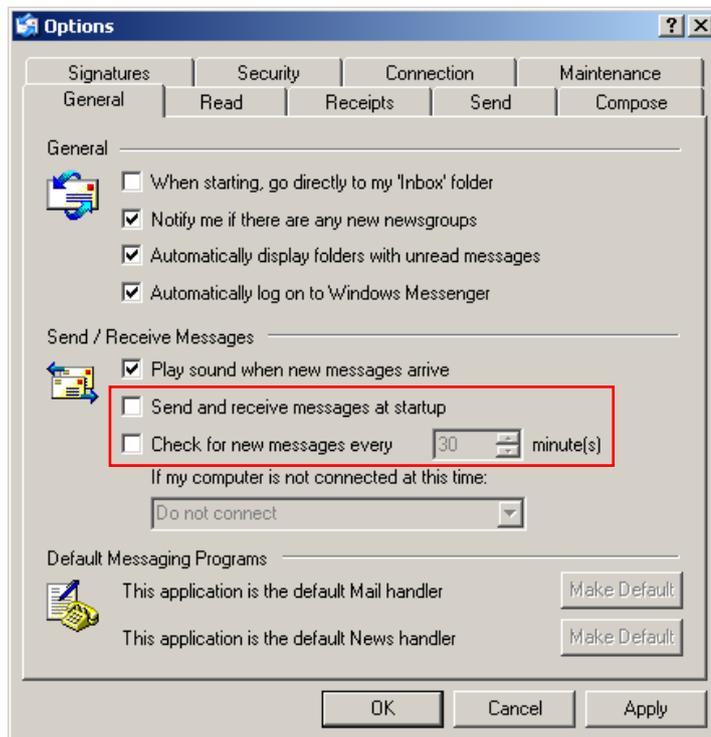
4. Introduza o nome e a palavra-passe da sua conta de e-mail, caso o servidor utilize uma autenticação por palavra-passe segura. Em seguida, clique em Next (Seguinte). Será aberta a janela Congratulations (Parabéns).



5. Confirme em Finish (Concluir) para terminar a configuração da conta de e-mail.

Configuração no Outlook

1. Abra o Outlook Express no menu Start (Iniciar) (Start [Iniciar] > All programs [Todos os programas] > Outlook Express).
2. Selecione Tools (Ferramentas) e, em seguida, Options (Opções). É apresentada a janela abaixo.



Importante: Para evitar a recuperação de e-mails durante as execuções de PCR, desative as entradas predefinidas no ecrã Send/Receive Messages (Enviar/receber mensagens).

3. Desative Send and receive messages at startup (Enviar e receber mensagens no arranque).
4. Desative Check for new messages every 30 minutes (Procurar novas mensagens a cada 30 minutos).
5. Confirme as alterações com OK.

7 Funções adicionais

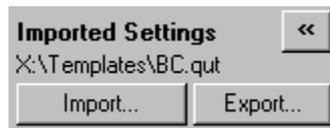
7.1 Modelos de análise

Algumas análises requerem que o utilizador determine limiares, definições de normalização e definições de genotipagem. Muitas vezes, estas definições são reutilizadas frequentemente em várias experiências.

Os modelos de análises permitem que o utilizador guarde e reutilize estas definições. Isto reduz o esforço de voltar a introduzir as definições e o risco de erro.

As análises dos gráficos de quantificação, de fusão, de discriminação alélica e de dispersão e a análise do ponto final suportam modelos de análise. Estas análises permitem ao utilizador exportar um modelo único para a análise (por exemplo, a análise de quantificação permite a exportação e importação de ficheiros *.qut com definições de quantificação).

Depois de um modelo de análise ter sido importado ou exportado, o nome do ficheiro do modelo é apresentado para referência futura.

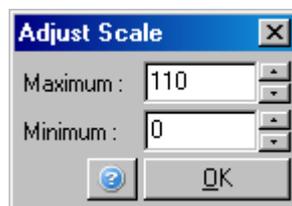


7.2 Abrir uma segunda execução

Enquanto efetua uma execução, é possível abrir e analisar execuções que foram efetuadas anteriormente. Várias funcionalidades, como os botões New (Novo) ou Start Run (Iniciar execução), não estão ativadas na segunda janela. Pode ser iniciada uma nova execução a partir da primeira janela quando a primeira execução estiver concluída.

7.3 Opções de escala

Para aceder a Adjust Scale (Ajustar escala), clique em Adjust Scale... (Ajustar escala...) na parte inferior da janela principal ou clique com o botão direito do rato no gráfico e selecione Adjust Scale... (Ajustar escala...) no menu apresentado. Uma escala pode ser introduzida manualmente na janela que é apresentada.



Para aceder a Auto-Scale (Escala automática), clique em Auto-Scale... (Escala automática...) na parte inferior da janela principal ou clique com o botão direito do rato no gráfico e selecione Auto-Scale... (Escala automática...) no menu apresentado. A opção Auto-Scale (Escala automática...) tenta ajustar a escala às leituras máxima e mínima nos dados.

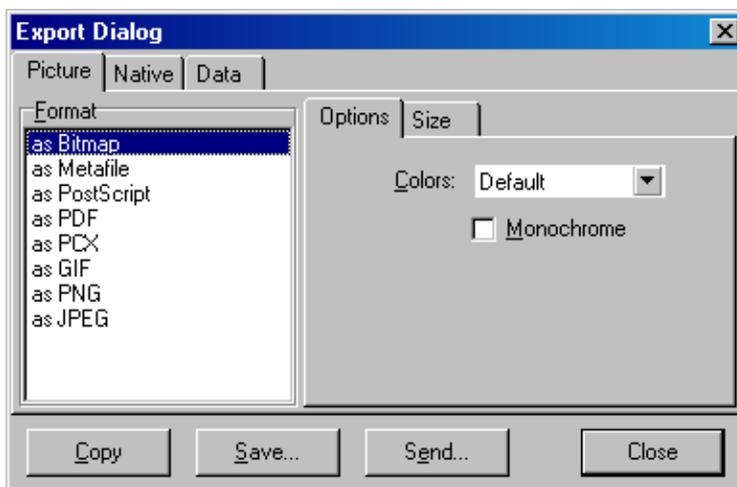
Para aceder a Default Scale (Escala predefinida), clique em Default Scale... (Escala predefinida...) na parte inferior da janela principal ou clique com o botão direito do rato no gráfico e selecione Default Scale... (Escala predefinida...) no menu apresentado. Default Scale (Escala predefinida) repõe a escala para apresentar de 0 até 100 unidades de fluorescência.

7.4 Exportar gráficos

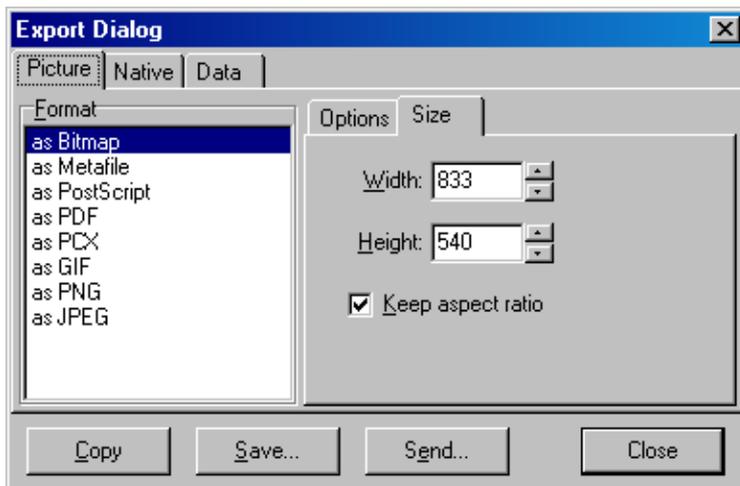
Exportação de imagens

Os passos seguintes descrevem como guardar uma imagem.

1. Clique com o botão direito do rato na imagem e selecione Export (Exportar) no menu apresentado.
2. A janela Export Dialog (Caixa de diálogo de exportação) é apresentada. Selecione o formato pretendido na lista Format (Formato).



3. Selecione o separador Size (Tamanho) e especifique o tamanho pretendido.



4. Marque a caixa de verificação Keep aspect ratio (Manter proporção) para manter a imagem na proporção correta ao ajustar o tamanho.
5. Clique em Save (Guardar) e selecione um nome de ficheiro e localização para o ficheiro na caixa de diálogo apresentada.

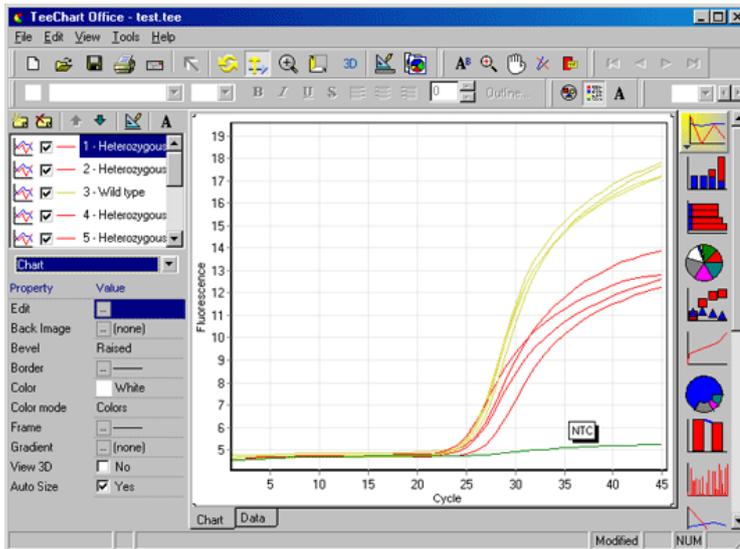
Se for necessária uma imagem com maior resolução, recomendamos que aumente o tamanho da imagem até estar de acordo com os seus requisitos ou que guarde o gráfico como um metaficheiro (*.emf, *.wmf). Este é um formato baseado em vetores que pode ser aberto num software como o Adobe® Illustrator®, permitindo que o utilizador crie uma imagem de qualquer resolução.

Exportação do formato nativo

Os gráficos no software Rotor-Gene Q utilizam o componente TeeChart® de terceiros, desenvolvido pelo software Steema. Para guardar um gráfico no formato nativo, selecione o separador Native (Nativo) na janela Export Dialog (Caixa de diálogo de exportação) (consulte a captura de ecrã anterior) e, em seguida, clique em Save (Guardar). O formato nativo é o formato-padrão de ficheiros TeeChart. Isto permite ao utilizador utilizar o TeeChart Office do software Steema. O TeeChart Office também está disponível como um freeware e está instalado como parte do pacote do software Rotor-Gene Q. Para aceder ao software, clique no ícone TeeChart no ambiente de trabalho.

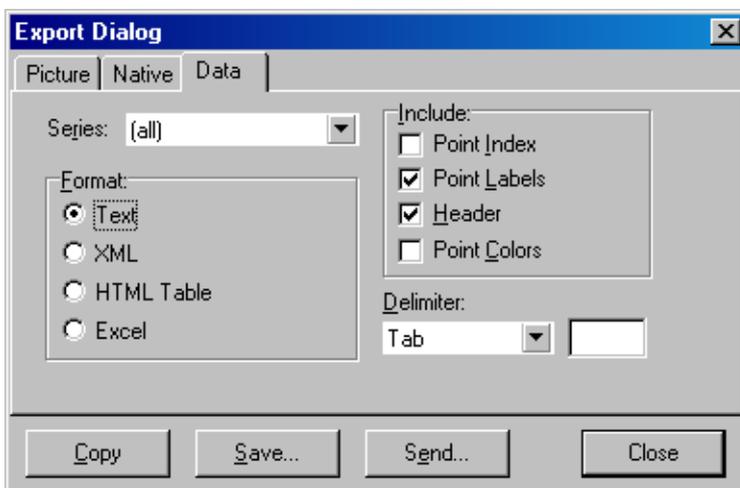


O TeeChart Office possibilita a manipulação de gráficos exportados, incluindo alterar as cores das curvas, adicionar anotações, alterar fontes e ajustar os pontos de dados.



Exportar dados

Para exportar dados em vários formatos, selecione o separador Data (Dados) na janela Export Dialog (Caixa de diálogo de exportação). O ficheiro exportado contém os pontos de dados não processados utilizados no gráfico.



Também é possível exportar dados não processados ou dados de análise selecionando Save As (Guardar como) no menu File (Ficheiro) (consulte a secção 6.5).

7.5 Ícone da chave inglesa



O ícone da chave inglesa encontra-se na parte inferior esquerda da janela principal. Clicar no ícone da chave inglesa possibilita várias opções. Estas opções também podem ser acedidas clicando com o botão direito do rato no gráfico.



Adjust Scale (Ajustar escala),
Autoscale (Escala automática),
Revert to Default Scale (Reverter
para escala predefinida):

Consulte a secção 7.3.

Export... (Exportar...):

Guarda o gráfico numa variedade de formatos (consulte a secção 6.4).

Copy Chart to Clipboard (Copiar
gráfico para a área de
transferência):

Copia a imagem do gráfico para a área de transferência.

Edit Chart in TeeChart Office...
(Editar gráfico no
TeeChart Office...):

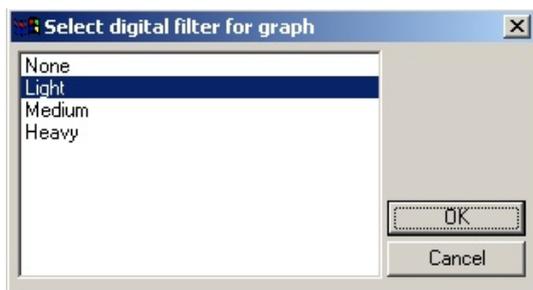
Abre o gráfico diretamente no TeeChart Office para edição (consulte a secção 6.4).

Print (Imprimir):

Imprime o gráfico.

Digital Filter... (Filtro digital...):

Modifica o filtro digital atualmente selecionado no gráfico. O filtro digital uniformiza os dados utilizando uma janela de pontos deslizante.



Show Pinpointer (Mostrar
localizador do ponteiro):

Abre uma janela que apresenta as coordenadas exatas da posição do ponteiro do rato.

Grouping (Agrupar):

Agrupa visualmente amostras que têm nomes idênticos. Isto pode ser útil em execuções completas do rotor. Selecionar esta opção não afeta os valores calculados.

7.6 Opções das áreas selecionadas

É possível selecionar uma área de um gráfico clicando e mantendo premido o botão esquerdo do rato e arrastando o ponteiro do rato. São apresentadas as seguintes opções.



Select Only These Samples (Selecionar apenas estas amostras):

É anulada a seleção das amostras que se encontram fora da área em questão.

Select Only These Samples (Selecionar apenas estas amostras):

É anulada a seleção das amostras que se encontram fora da área em questão.

Zoom (Ampliar):

Amplia a área selecionada do gráfico. Clique no botão Default Scale (Escala predefinida) para reduzir.

8 Manutenção

É fácil manter o desempenho de trabalho do Rotor-Gene Q MDx. O desempenho ótico é mantido assegurando que as lentes, localizadas em ambas as fontes de emissão e detecção, estão limpas. Para o efeito, utilize a ponta de uma cotonete humedecida com álcool ou isopropanol* para limpar as lentes.

Nota: Limpe as lentes pelo menos uma vez por mês, dependendo da utilização. Limpe a câmara do rotor ao mesmo tempo.

Mantenha a área da bancada de trabalho limpa e sem pó nem folhas de papel. A entrada de ar do Rotor-Gene Q MDx localiza-se na parte inferior e materiais soltos, como papéis ou poeira, podem comprometer o seu desempenho.



Para evitar a acumulação de poeira, mantenha a tampa do Rotor-Gene Q MDx fechada quando o instrumento não estiver a ser utilizado.

Nota: Utilize apenas peças fornecidos pela QIAGEN.

8.1 Limpar a superfície do Rotor-Gene Q MDx

As superfícies externas do Rotor-Gene Q podem ser limpas com produtos químicos de laboratório comumente disponíveis.

* Ao trabalhar com substâncias químicas, utilize sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) apropriadas, disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

8.2 Descontaminar a superfície do Rotor-Gene Q MDx

Se a câmara do rotor ficar contaminada, as superfícies podem ser limpas com um pano sem pelos humedecido (mas sem pingar) com uma solução de lixívia a 0,1% (v/v). * Limpe a câmara com um pano sem pelos humedecido com água de utilização em PCR para remover vestígios de lixívia.

8.3 Reparação do Rotor-Gene Q

Para reparação ou assistência do Rotor-Gene Q, contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN em <https://www.qiagen.com/service-and-support/technical-support/technical-support-form/>.

* Ao trabalhar com substâncias químicas, utilize sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) apropriadas, disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

9 Verificação ótica de temperatura

A verificação ótica de temperatura (Optical Temperature Verification, OTV) corresponde a um método que verifica a temperatura dentro do tubo no Rotor-Gene Q MDx. A validação da temperatura dentro do tubo pode ser um procedimento importante em laboratórios certificados. A OTV é efetuada utilizando o Rotor-Disc OTV Kit (consulte a secção 16). Em seguida, é fornecida uma pequena introdução ao princípio da OTV. A execução do procedimento de OTV é explicada no software Rotor-Gene Q MDx. Para uma descrição mais detalhada do procedimento de OTV, incluindo um guia de resolução de problemas, consulte o *Manual de OTV do Rotor-Disc*.

9.1 Princípio da OTV

A OTV utiliza as propriedades óticas de 3 cristais líquidos termocromáticos (Thermochromatic Liquid Crystals, TLC)* como referências de temperatura absolutas. Quando aquecidos, os TLC passam de opacos a transparentes a temperaturas muito específicas (50, 75 e 90 °C). Os TLC não têm fluorescência própria. Por isso, é necessário cobrir a fonte de excitação com um introdutor de fluorescência para que os pontos de transição dos TLC possam ser detetados pelo sistema ótico do Rotor-Gene Q MDx. Os TLC que estão abaixo da sua temperatura de transição são opacos e refletem luz. Alguma da luz refletida dispersa em direção ao detetor, aumentando a fluorescência. Quando a temperatura dentro do tubo atinge o ponto de transição dos TLC, estes tornam-se transparentes e a luz atravessa a amostra em vez de ser refletida na direção do detetor, o que resulta numa diminuição da fluorescência. A alteração na fluorescência é utilizada para determinar a temperatura de transição precisa de cada TLC. A temperatura de transição é comparada com a temperatura comunicada pelo ficheiro de calibração de fábrica para a OTV do Rotor-Disc verificar se o Rotor-Gene Q MDx está dentro das especificações de temperatura.

9.2 Componentes do Rotor-Disc OTV Kit

São necessários os seguintes componentes para executar uma OTV:

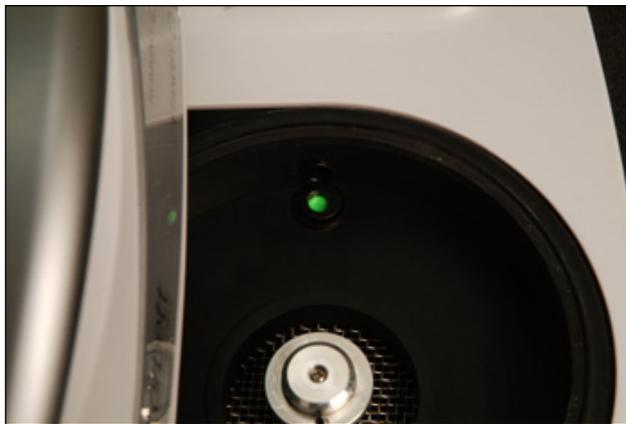
- Um Rotor-Disc OTV Kit, que inclui:
 - Um rotor de OTV Rotor-Disc 72 selado (contém TLC)
 - Um introdutor da placa de dispersão de fluorescência (instrumento Rotor-Gene 3000 ou Rotor-Gene Q/6000)

* Ao trabalhar com substâncias químicas, utilize sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) apropriadas, disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

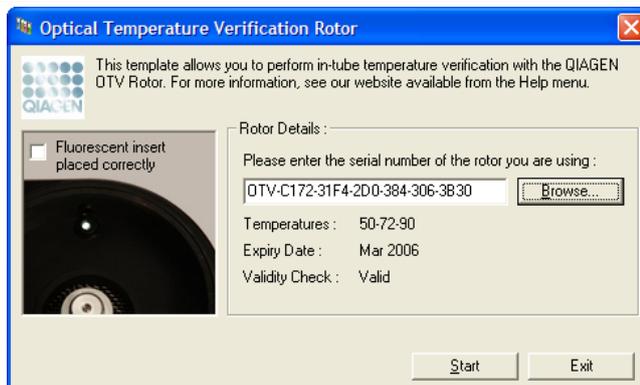
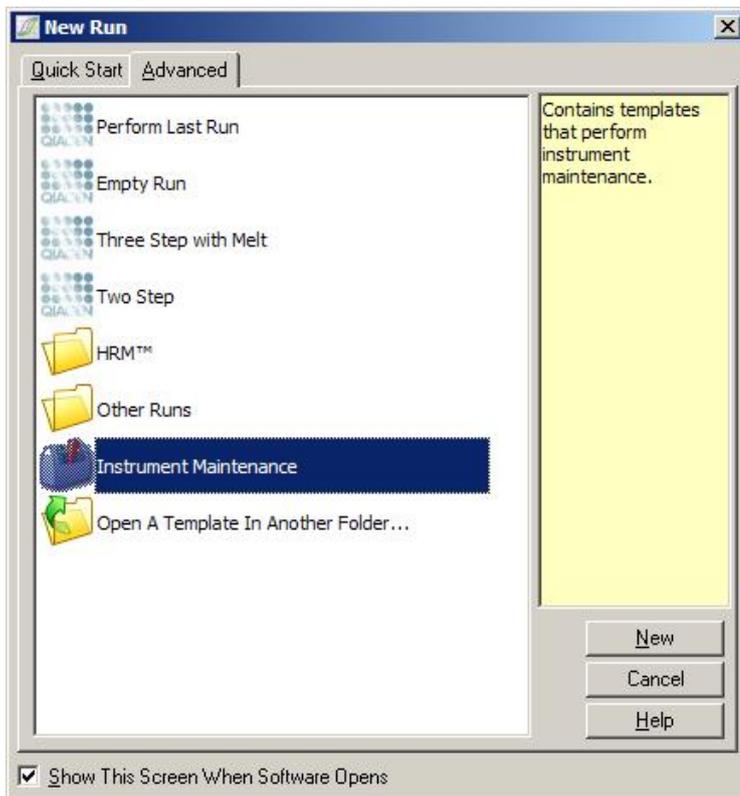
- Um suporte de dados amovível que contém os ficheiros seguintes: número de série do rotor de OTV e ficheiro com a data de validade (*.txt); ficheiro do modelo de teste de OTV (*.ret); folheto do produto (*.pdf); ficheiro de calibração de fábrica (*.rex)
- Folheto do produto
- Software da série Rotor-Gene, versão 1.7 ou superior, que contém o assistente de rotor de OTV de utilização fácil
- Rotor-Disc 72 Rotor
- Rotor-Disc 72 Locking Ring

9.3 Executar uma OTV

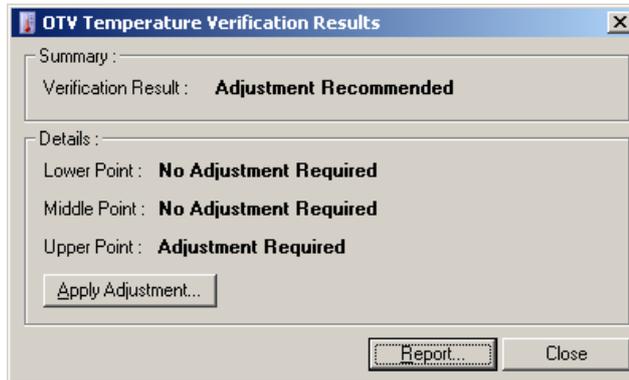
1. Coloque o introdutor de fluorescência sobre as lentes de emissão na parte inferior da câmara do Rotor-Gene Q MDx.
2. Coloque o Rotor-Disc da OTV num Rotor-Disc 72 Rotor. Prenda utilizando um Rotor-Disc 72 Locking Ring. Coloque o conjunto no Rotor-Gene Q MDx e encaixe-o. Feche a tampa do Rotor-Gene Q MDx.



3. Aceda ao assistente Advanced (Avançado) selecionando o separador Advanced (Avançado) na janela New Run (Nova execução). No assistente Advanced (Avançado), clique em Instrument maintenance (Manutenção do instrumento) e, em seguida, em OTV. O assistente solicita o número de série de OTV, que se encontra no anel de OTV. Em seguida, clique em Start (Iniciar).



4. O software solicita o nome do ficheiro para a execução. Em seguida, a execução inicia.
5. A execução efetua uma série de fusões que determinam as características térmicas do Rotor-Gene Q MDx.



6. Quando a execução é concluída, o software indica se o Rotor-Gene Q MDx está dentro da especificação.
7. Se for necessário um ajuste, o utilizador deve clicar em Apply Adjustment (Aplicar ajuste). Tal solicita ao utilizador que efetue uma execução de verificação. Quando a execução de verificação está concluída, não deve ser necessário nenhum ajuste. Se forem necessários mais ajustes, contacte o seu distribuidor.
8. Quando o Rotor-Gene Q MDx está dentro da especificação, pode ser revisto e impresso um relatório da execução.●

10 Análise de fusão de alta resolução

A análise de fusão de alta resolução (High Resolution Melt, HRM) é uma técnica inovadora baseada na análise de fusão do ADN. A HRM caracteriza as amostras de ADN de acordo com o seu comportamento de dissociação à medida que fazem a transição de ADN de cadeia dupla (double-stranded DNA, dsDNA) para ADN de cadeia simples (single-stranded DNA, ssDNA) com o aumento de temperatura (consulte a figura abaixo). Um instrumento de HRM recolhe os sinais de fluorescência com uma precisão térmica e ótica extremamente elevadas, criando várias possibilidades de aplicação.



Um gráfico de HRM comum. A curva de fusão traça a transição desde a fluorescência elevada da fase de pré-fusão inicial, passando pela diminuição na fluorescência da fase de fusão, até ao nível de fluorescência basal da fase de pós-fusão. A fluorescência diminui à medida que o corante intercalado de ADN é libertado do dsDNA e se funde em cadeias simples. O ponto médio da fase de fusão, no qual a taxa de variação da fluorescência é maior, define a temperatura de fusão (T_m) do ADN em análise.

Antes de efetuar a análise de HRM, a sequência-alvo deve ser amplificada para um número de cópias elevado. Normalmente, isto é efetuado por PCR na presença de um corante de fluorescência intercalado com dsDNA. O corante não interage com ssDNA, mas intercala-se ativamente com dsDNA e fluoresce intensamente quando é intercalado. A alteração na fluorescência pode ser utilizada para medir o aumento na concentração de ADN durante PCR e, em seguida, para medir diretamente a fusão de ADN induzida termicamente por HRM. Durante a HRM, a fluorescência é inicialmente elevada pois a amostra inicia como dsDNA. A fluorescência diminui à medida que a temperatura aumenta e o ADN dissocia-se em cadeias simples. O comportamento de fusão observado é característico de uma amostra de ADN específica.

Ao utilizar a HRM, o Rotor-Gene Q MDx pode caracterizar amostras com base no comprimento da sequência, conteúdo de GC e complementaridade da sequência de ADN. A HRM pode ser utilizada em aplicações de genotipagem, por exemplo, análises de inserções/eliminações ou polimorfismos de nucleótido único (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), ou para analisar mutações genéticas desconhecidas.

Também pode ser utilizado em aplicações epigenéticas para deteção e análise do estado de metilação do ADN. Também pode ser utilizado para detetar quantitativamente uma pequena proporção de ADN variável num fundo de sequências de tipo selvagem em sensibilidades a aproximar-se dos 5%. Isto pode ser utilizado, por exemplo, para estudar mutações adquiridas somaticamente ou alterações no estado de metilação das ilhas CpG.

A HRM no Rotor-Gene Q MDx facilita várias aplicações, incluindo:

- Identificação de genes candidatos de predisposição
- Estudos de associação (comparando casos e controlos, genótipos e fenótipos)
- Determinação da prevalência alélica dentro de uma população ou subgrupo
- Rastreio e validação do SNP
- Rastreio para perda de heterozigotia
- Impressões digitais de ADN
- Caracterização de blocos de haplótipos
- Análise de metilação de ADN
- Mapeamento de ADN
- Identificação de espécies
- Descoberta de mutação
- Determinação do rácio de mutações somáticas adquiridas
- Tipagem de HLA

A HRM é mais fácil e economicamente mais rentável do que os ensaios de genotipagem baseados em sondas e, ao contrário dos métodos convencionais, é um sistema de tubos fechados que evita a contaminação com produtos de PCR. Os resultados são comparáveis a métodos convencionais como SSCP, DHPLC, RFLP e sequenciação de ADN.

10.1 Instrumentação

O Rotor-Gene Q MDx fornece os seguintes recursos exigentes em tempo real e termo-óticos necessários para a HRM.

- Iluminação de alta intensidade
- Deteção ótica altamente sensível
- Rápida aquisição de dados
- Temperatura da amostra controlada de forma precisa
- Mínima variação ótica e térmica de amostra para amostra

10.2 Químicos

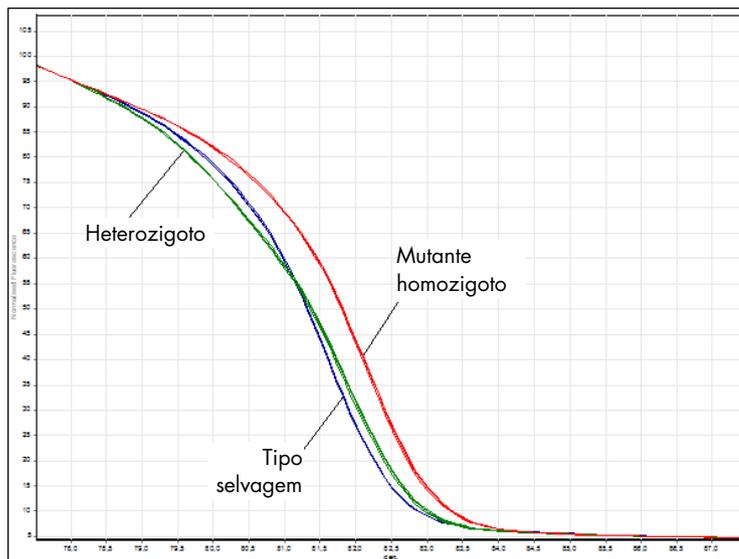
A QIAGEN disponibiliza o Type-it® HRM PCR Kit para análise de SNP e mutações utilizando a HRM e o EpiTect® HRM PCR Kit para análises de metilação. Ambos os kits contêm o corante fluorescente intercalado de terceira geração EvaGreen. Os kits combinam o tampão de HRM otimizado e HotStarTaq® Plus DNA Polymerase para evitar produtos de amplificação não específicos e fornecer resultados fiáveis.

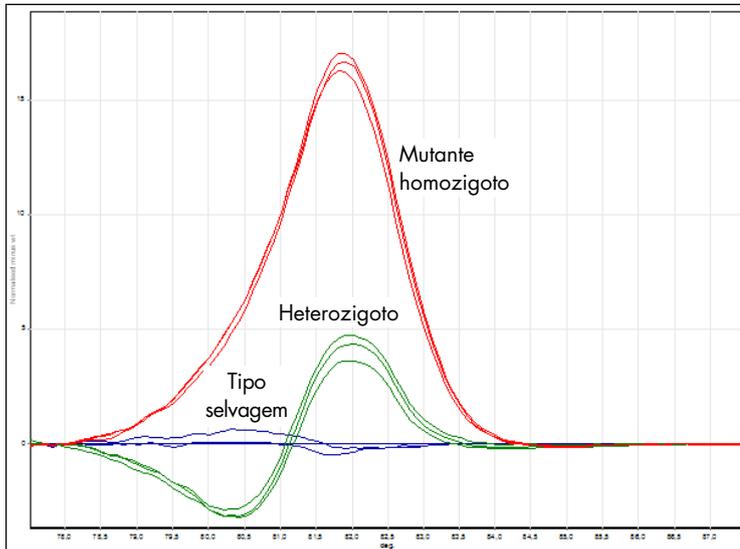
Nota: Todos os reagentes e kits de HRM da QIAGEN são indicados para utilização com instrumentos Rotor-Gene Q apenas para as aplicações descritas nos respetivos manuais dos kits da QIAGEN.

10.3 Exemplo de genotipagem de SNP

No exemplo apresentado, o Type-it HRM PCR Kit foi utilizado numa análise de HRM para diferenciar entre tipo selvagem homozigoto, mutante homozigoto e formas heterozigotas do SNP rs60031276 humano. Para obter detalhes técnicos, consulte o *Manual de Type-it HRM PCR*.

A



B**C**

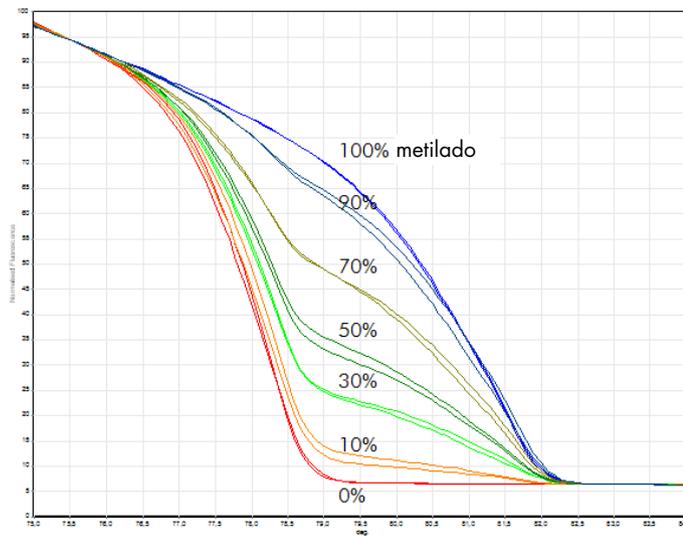
HRM Results - HRM A.HRM (Page 1)				
No.	C	Name	Genotype	Confidence %
22	AA	Human SNP rs60031276	homo AA	100,00
23	unknown		homo AA	99,49
24	unknown		homo AA	99,76
28	AG	Human SNP rs60031276	hetero AG	100,00
29	unknown		hetero AG	99,49
30	unknown		hetero AG	98,47
34	GG	Human SNP rs60031276	homo GG	100,00
35	unknown		homo GG	98,80
36	unknown		homo GG	99,53

Genotipagem de SNP através de HRM. O SNP rs60031276 humano (substituição de A a G) no gene PPP1R14B (proteína fosfatase 1, subunidade regulatória [inibidor] 14B) foi analisado no Rotor-Gene Q utilizando 10 ng de ADN genómico de diferentes genótipos e o Type-it HRM Kit. O tipo selvagem homocigoto (AA), o mutante homocigoto (GG) e as amostras heterocigotas (AG) são apresentadas em **A** uma curva de fusão padrão normalizada e **B** um gráfico de diferenças normalizado para amostras do tipo selvagem. **C** Os genótipos para as amostras desconhecidas foram atribuídos pelo software Rotor-Gene Q.

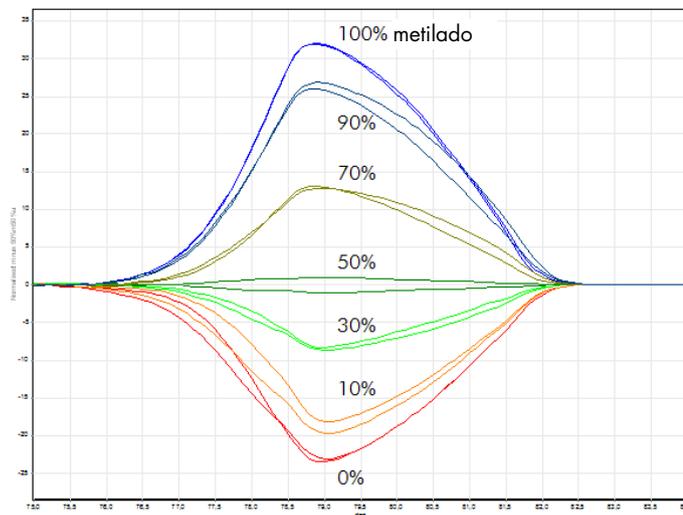
10.4 Exemplo de análise de metilação

No exemplo apresentado, o EpiTect HRM PCR Kit foi utilizado na análise de HRM para discriminar várias proporções de ADN metilado e não metilado. Para obter detalhes técnicos, consulte o *Manual de EpiTect HRM PCR*.

A



B



Análise de metilação quantitativa por HRM. Várias proporções de APC (polipose adenomatosa coli) do ADN metilado e não metilado foram analisadas e discriminadas pela análise de metilação de HRM no Rotor-Gene Q utilizando o EpiTect HRM Kit. São apresentados **A** uma curva de fusão padrão normalizada e **B** um gráfico de diferenças normalizado para a amostra 50% metilada.

10.5 Diretrizes para uma análise de HRM bem-sucedida

O sucesso da análise de HRM depende muito da sequência específica em investigação. Certos motivos de sequência, como estruturas em grampo e outras estruturas secundárias, regiões localizadas de conteúdo GC invulgarmente alto ou baixo ou sequências repetidas podem afetar os resultados. Para além disso, a utilização de kits padronizados e protocolos otimizados da QIAGEN podem superar muitos dos potenciais desafios listados. Algumas diretrizes simples para ajudar a assegurar o êxito encontram-se detalhadas abaixo.

Análise pequenos fragmentos de ADN

Análise fragmentos não superiores a cerca de 250 bp. Podem ser analisados produtos maiores com sucesso, mas normalmente apresentam uma resolução inferior. Isto porque, por exemplo, uma variação de base única tem um efeito maior no comportamento de fusão de um amplicon de 100 bp do que num amplicon de 500 bp.

Certifique-se de que a PCR contém apenas produtos específicos

As amostras contaminadas com artefactos pós-PCR, como dímeros de primer ou produtos não específicos podem tornar os resultados de HRM difíceis de interpretar. Os kits da QIAGEN para análise de HRM asseguram uma especificidade máxima sem necessidade de otimização.

Utilize um modelo de pré-amplificação suficiente

A análise de dados de real-time PCR pode ser muito útil na resolução de problemas em análises de HRM. Os gráficos de amplificação devem ter um C_T (ciclo de limiar) inferior ou igual a 30 ciclos. Os produtos que amplificam mais do que isto (devido a baixa quantidade inicial do modelo ou à degradação do modelo) normalmente produzem resultados de HRM variáveis devido a artefactos de PCR.

Normalize a concentração do modelo

A quantidade de modelo adicionado à reação deve ser consistente. Normalize as concentrações iniciais para que os gráficos de amplificação se encontrem a 3 valores de C_T entre si. Isto assegura que as concentrações de entrada se encontram dentro de um intervalo de 10 vezes.

Verifique se existem gráficos de amplificação anómalos

Antes de executar a HRM, examine cuidadosamente os dados do gráfico de amplificação para verificar se a forma do gráfico de amplificação é anormal. Gráficos com uma fase log-linear que não é acentuada, que é recortada ou que alcança um planalto de sinal baixo, comparados a outras reações, podem indicar uma fraca amplificação ou um sinal de fluorescência demasiado baixo (por exemplo, isto pode ocorrer se a concentração do primer for demasiado baixa).

As reações fracas podem ser causadas por inibidores de reação ou por uma configuração de reação incorreta. Os dados de HRM de tais amostras podem ser inconclusivos ou de baixa resolução. Para evitar resultados não fiáveis, recomendamos os kits da QIAGEN para preparação da amostra e análise de HRM.

Mantenha as concentrações pós-amplificação da amostra semelhantes

A concentração de um fragmento de ADN afeta a sua temperatura de fusão (T_m). Por este motivo, as concentrações de amostras de ADN devem ser mantidas o mais semelhante possível. Ao analisar produtos de PCR, certifique-se de que todas as reações foram amplificadas para a fase de planalto. No planalto, todas as reações terão amplificado para uma extensão semelhante independentemente da sua quantidade inicial. Contudo, tenha em atenção que as reações fracas podem não atingir o planalto com a mesma quantidade amplificada, devido, por exemplo, à configuração inconsistente do ensaio (por exemplo, a concentração do primer era demasiado baixa).

Assegure a uniformidade entre amostras

Todas as amostras devem possuir um volume semelhante e conter a mesma concentração de corante. O comportamento de fusão do ADN é influenciado por sais na mistura da reação, pelo que é importante que a concentração do tampão, Mg e outros sais sejam o mais uniforme possível em todas as amostras. Da mesma forma, utilize apenas tubos de reação idênticos do mesmo fabricante para evitar variações devido à espessura do plástico e às propriedades de autofluorescência.

Permita a recolha de dados suficientes para as fases de pré-fusão e pós-fusão

Capte pontos de dados de HRM num intervalo de aproximadamente 10 °C, centrado em torno do T_m observado (consulte a figura na página 10). Isto fornece pontos de dados da linha de base suficientes para a normalização eficaz da curva e irá resultar em réplicas mais reproduzíveis e na interpretação de dados mais fácil.

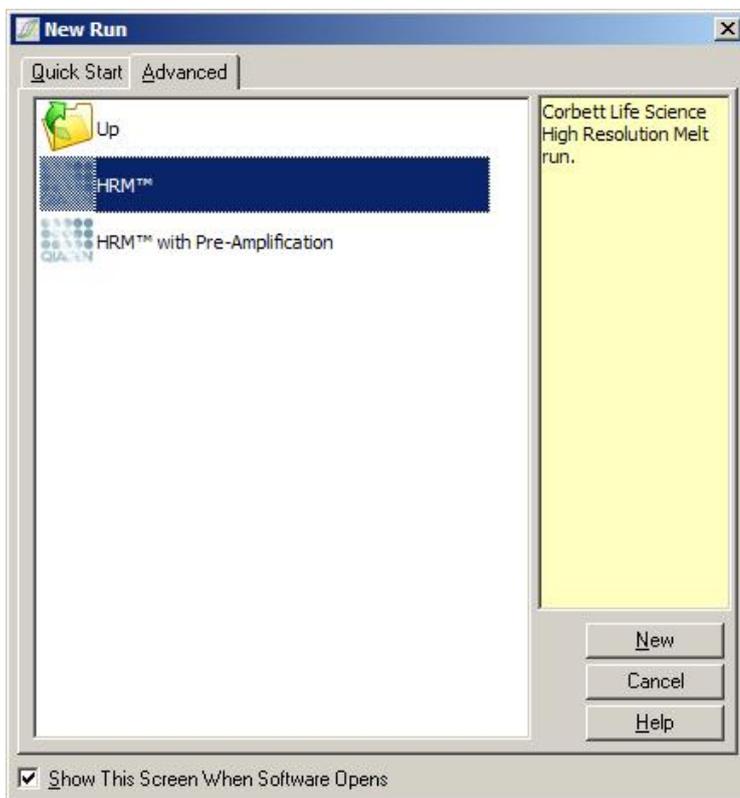
10.6 Preparação da amostra

Deve ser evitada a degradação da amostra durante a purificação e o armazenamento. Evite quantidades excessivas de inibidores, como por exemplo, da transferência de etanol. Para melhorar os resultados de HRM, recomendamos que mantenha a quantidade de modelo utilizado consistente entre amostras. É recomendada a análise espectrofotométrica para determinar a concentração de ADN e a pureza. Recomendamos os kits da QIAGEN para a preparação da amostra.

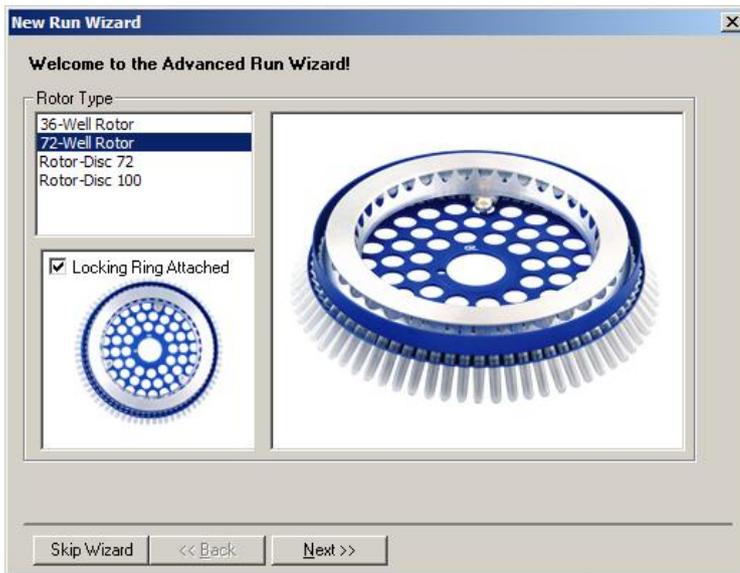
Nota: A 260 nm, uma unidade de absorvância é igual a 50 µg/ml de ADN. O ADN puro irá apresentar uma proporção de 1,8 de 260 a 280 nm.

10.7 Configuração do software

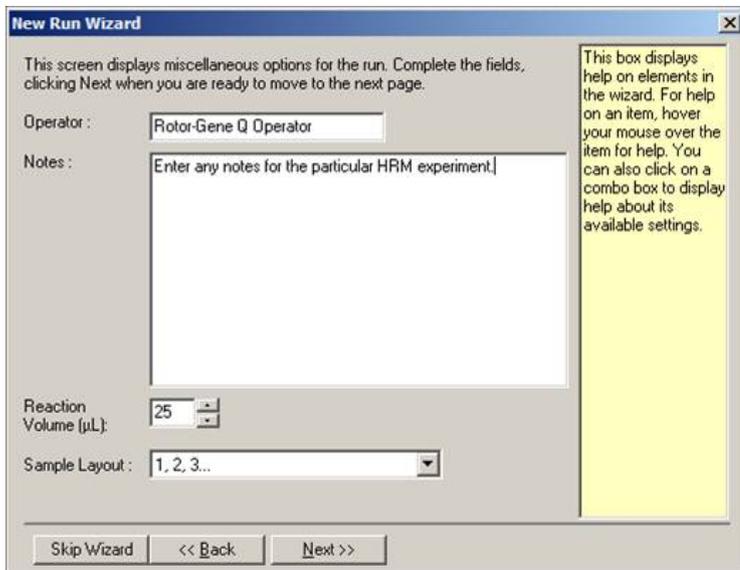
1. Abra um novo ficheiro de execução selecionando New... (Novo...) no menu File (Ficheiro). No assistente Advanced (Avançado), seleccione HRM.



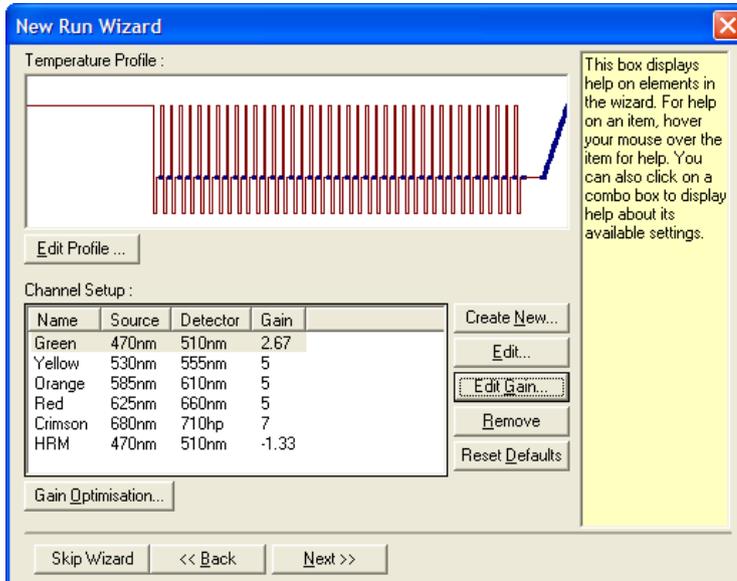
- Defina o tipo de rotor (neste exemplo, é utilizado o 72-Well Rotor). Certifique-se de que o anel de bloqueio está colocado e de que a caixa de verificação Locking Ring Attached (Anel de bloqueio fixado) está marcada antes de prosseguir para o passo seguinte.



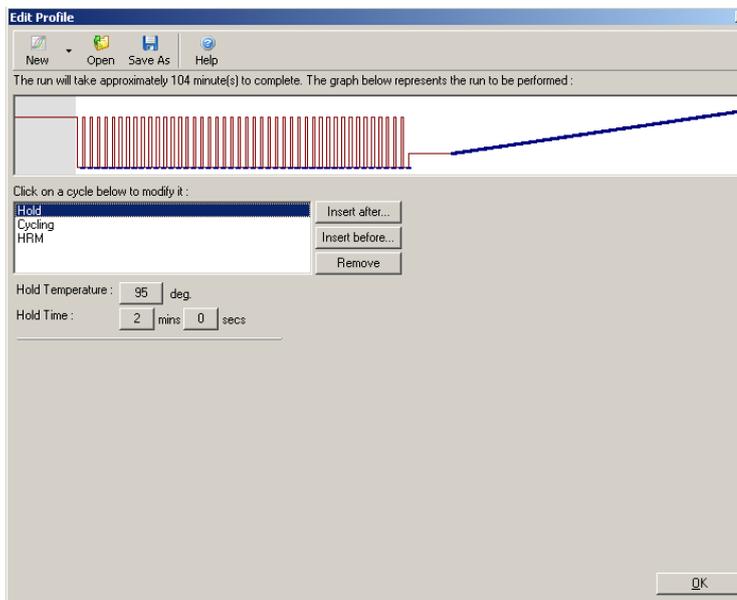
- Defina os detalhes de execução. Introduza o nome do operador (opcional) e adicione quaisquer notas sobre a experiência (opcional). Selecione o volume de reação (obrigatório) e disposição das amostras pretendidos.



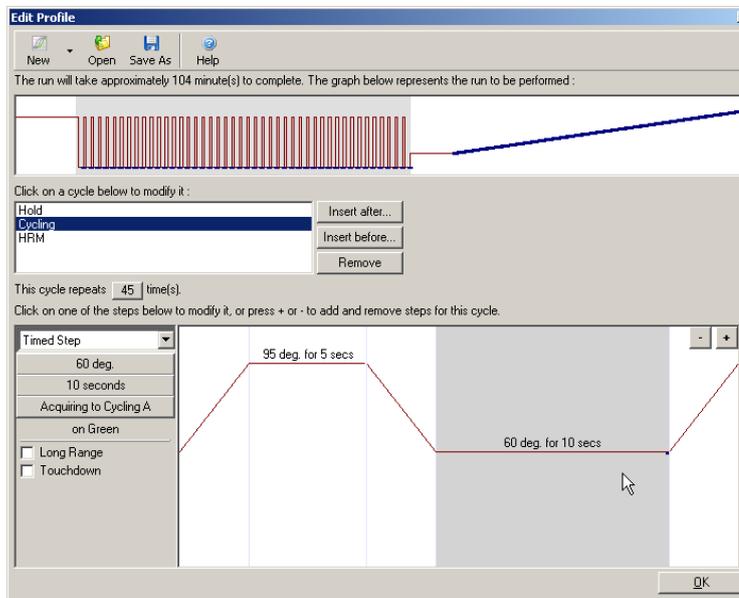
4. Clique no botão Edit Profile... (Editar perfil...) para modificar os tempos e as temperaturas da reação.



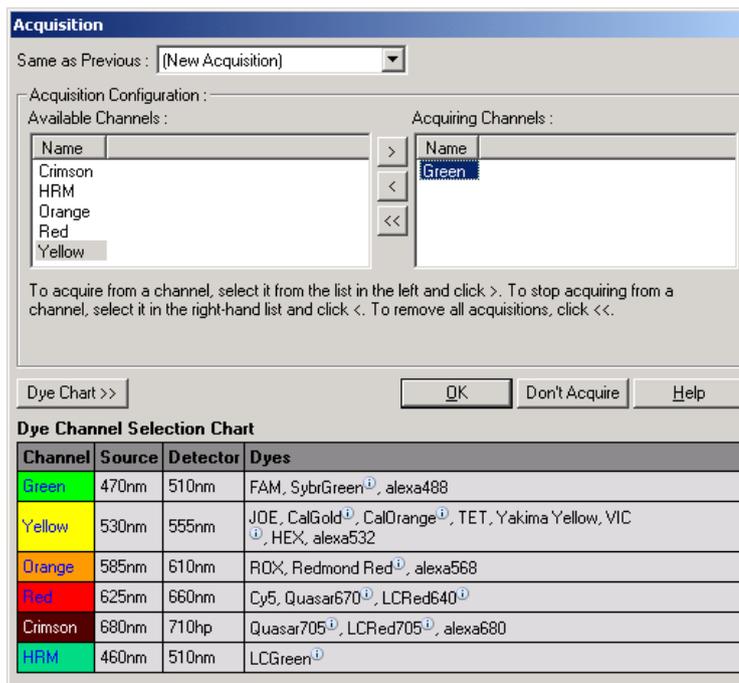
5. Defina um tempo de espera inicial adequado. Este tempo depende do tipo de polimerase de ADN utilizada. O Type-it HRM PCR Kit e o EpiTect HRM PCR Kit necessitam de 5 minutos de tempo de ativação. O tempo de ativação predefinido é de 10 minutos.



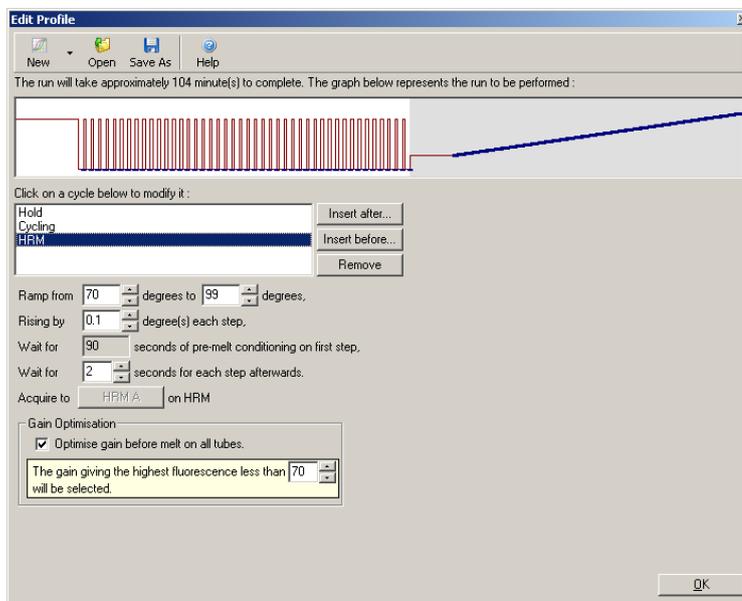
6. Modifique a ciclagem para adequação ao amplicon.



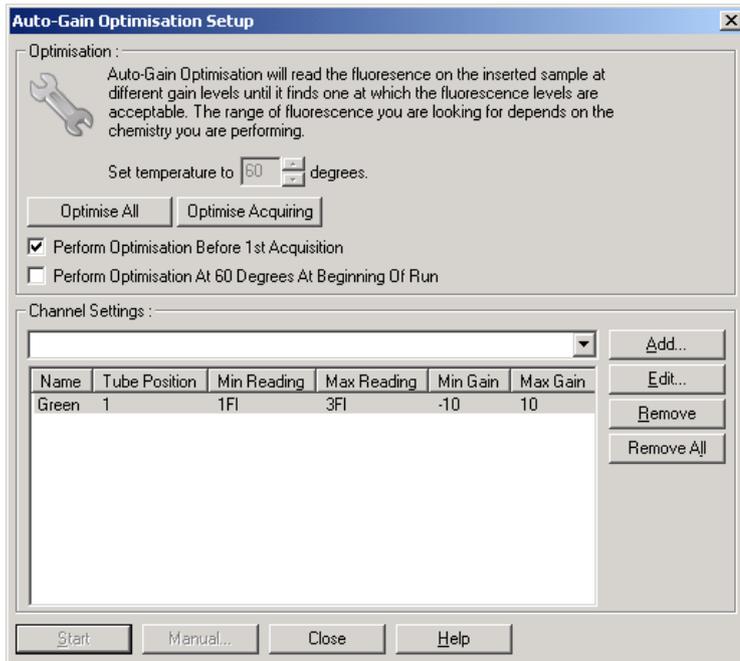
7. Certifique-se de que os dados de fluorescência são adquiridos. Adquira dados para o canal verde no final do passo de hibridização.



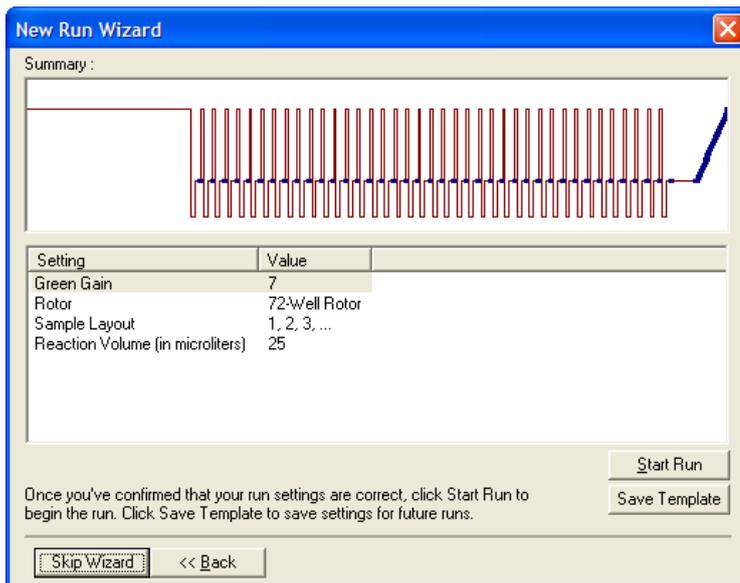
8. Defina as condições de execução de HRM. Modifique as condições para adequação ao amplicon. Para o primeiro conjunto de experiências permita um domínio de fusão amplo. Utilize o T_m como uma orientação para um intervalo adequado. Quando tiver determinado onde irá ocorrer a fusão do produto, reduza o domínio da fusão para não mais do que 10 °C. Certifique-se de que o início da fusão ocorre 5 °C antes da primeira transição de fusão. A rampa predefinida está definida para 0,1 °C com uma pausa de 2 s em cada etapa. A transição da rampa mínima é de 0,05 °C com um segundo de pausa em cada etapa. Os dados são automaticamente adquiridos para o canal de HRM. É efetuada a otimização do ganho automática por predefinição. O software irá procurar a definição do ganho ideal para que o valor de fluorescência mais elevado comunicado não seja superior a 70 unidades numa escala de 100. Tenha em atenção que isto pode ser aumentado até um máximo de 100.



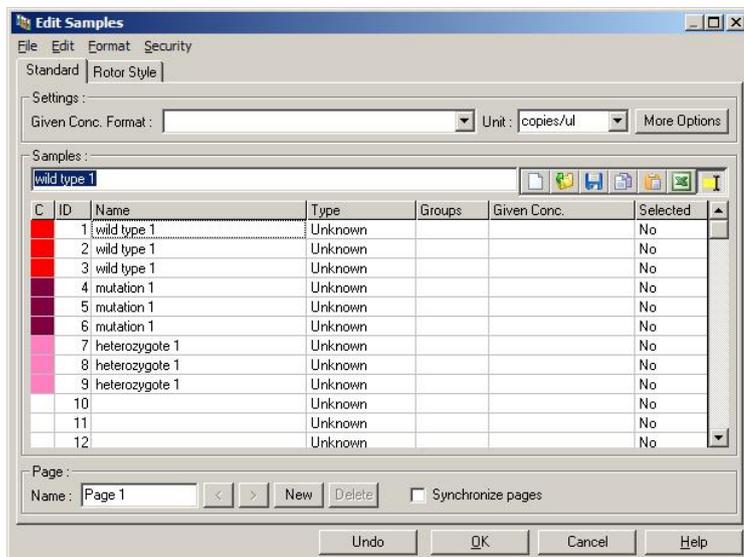
9. Opcional: Defina a otimização do ganho automática. Isto é aplicável apenas ao passo de amplificação em tempo real e está definida para o canal verde. Clique no botão **Optimize Acquiring** (Otimizar aquisição) (para otimizar apenas os canais utilizados por uma execução). A otimização é efetuada de melhor forma imediatamente antes do primeiro passo de aquisição, por isso, marque a caixa de verificação **Perform Optimization Before First Acquisition** (Efetuar otimização antes da primeira aquisição). O intervalo recomendado para a fluorescência de fundo para corantes intercalados é entre 1 e 3 unidades de fluorescência. Para alterar esta definição, clique no nome do canal para o selecionar na lista e, em seguida, clique no botão **Edit** (Editar).



10. Inicie a execução clicando em Start Run (Iniciar execução) e guarde o ficheiro de execução no computador.



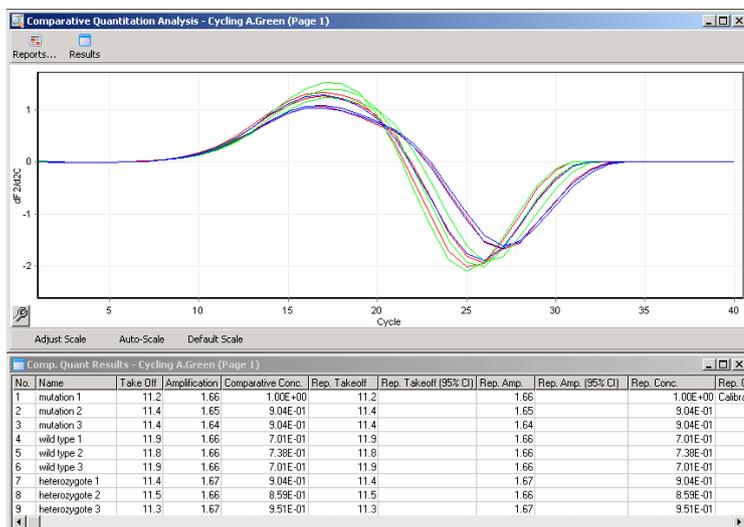
1. Edite os nomes das amostras (opcional). Os nomes das amostras podem ser editados durante ou após uma execução.



10.8 Análise de dados de real-time PCR

Analisar os dados de real-time PCR antes da análise dos dados de HRM é vantajoso. Os dados de real-time PCR podem realçar os ensaios com pior desempenho. Identificar estes valores atípicos e filtrá-los para a análise de HRM posterior irá melhorar bastante a eficácia geral da análise de HRM, visto que analisar produtos de PCR de baixa qualidade irá originar maus resultados de HRM. Recomendamos que analise dados quantitativos de real-time PCR da seguinte forma.

1. Analise os dados em tempo real utilizando a opção Quantitation (Quantificação) na janela Analysis (Análise). Se algum dos valores de C_T for 30 ou superior, considera-se que as reações correspondentes amplificaram demasiado tarde. Estas amostras devem ser analisadas como hipóteses ou removidas da análise como sendo um valor atípico. A amplificação tardia normalmente deve-se a uma quantidade demasiado pequena do modelo inicial e/ou a elevados níveis de degradação da amostra.
2. Avalie o nível de fluorescência do ponto final. Se a fluorescência do ponto final em qualquer um dos gráficos de amplificação for baixa comparativamente à maioria dos gráficos no conjunto de dados, omita essas amostras da análise mesmo que o seu valor de C_T seja inferior a 30. A fluorescência baixa do ponto final pode indicar uma quantidade incorreta de corante, níveis incorretos de componentes da reação (por exemplo, primers) ou a ação de inibidores.
3. Utilize a opção Comparative Quantitation (Quantificação comparativa) na janela Analysis (Análise) para obter a eficiência da reação de cada amostra. Se a eficiência não for semelhante a outras reações na experiência ou se for inferior a aproximadamente 1,4, omita a reação como um valor atípico.



Resultados de quantificação comparativa. A eficiência da reação é apresentada na coluna "Amplification" (Amplificação) como um resultado máximo de 2 (2 = 100% de eficiência).

Nota: Se suspeitar da presença de dímeros de primers ou produtos não específicos, avalie as reações ao elaborar um gráfico de derivadas com a opção Melt (Fusão) na janela Analysis (Análise). Certifique-se de que existe um pico único, indicativo de um único produto. Se possível, administre um gel para verificar se existe um produto de amplificação único. Se existir mais do que um produto, a reação deve ser repetida ou novamente otimizada.

10.9 Análise de dados de HRM

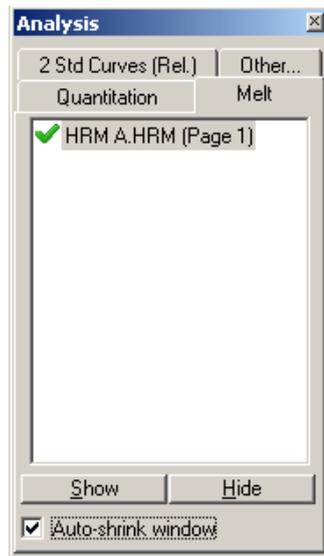
A análise de HRM possibilita a determinação visual ou automática de genótipos. Os resultados podem ser visualizados como um gráfico de fusão normalizado ou um gráfico de diferenças. As curvas normalizadas fornecem a representação básica dos diferentes genótipos com base na variação da curva (para homocigotos) e alteração na forma da curva (para heterocigotos).

Os gráficos de diferenças são uma ajuda para a interpretação visual. Traçam a diferença na fluorescência de uma amostra para um controlo selecionado em cada transição de temperatura. Os gráficos de diferenças fornecem uma visão alternativa das diferenças entre as transições das curvas de fusão.

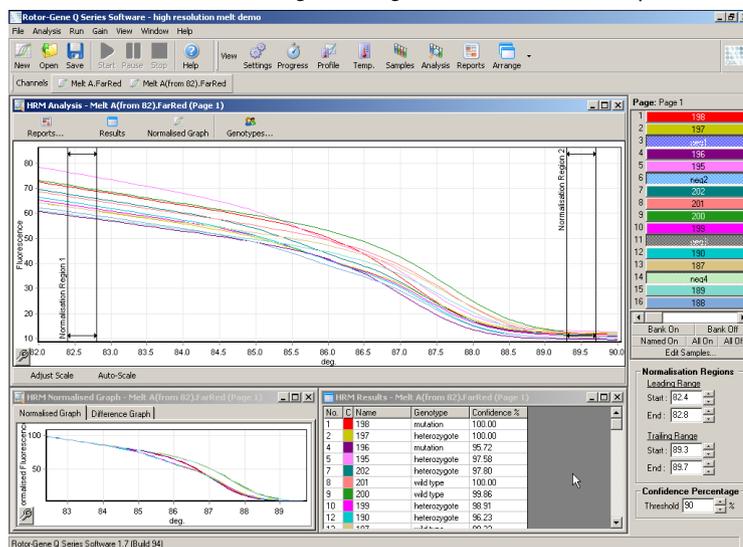
Nota: A primeira análise derivativa da curva de fusão (tal como utilizada pela opção Melt [Fusão] na janela **Analysis** [Análise]) é considerada inadequada para a análise de HRM. Tal ocorre porque qualquer derivação dos dados adiciona ruído artificial e torna a interpretação dos dados mais difícil.

Os passos seguintes descrevem a análise dos resultados de HRM utilizando o software Rotor-Gene Q.

1. Selecione a opção HRM na janela Analysis (Análise).

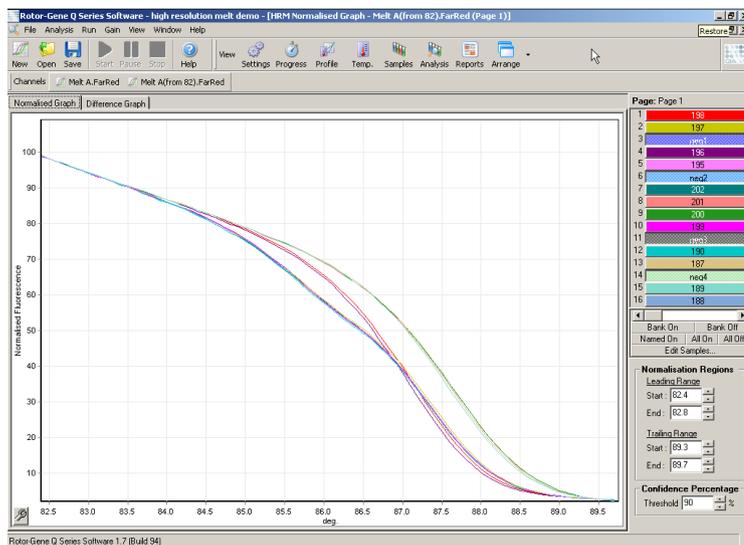


2. São apresentadas janelas que mostram os dados não processados, o gráfico normalizado e os resultados. A janela dos dados não processados permite o ajuste das regiões de normalização. A normalização permite que todas as curvas sejam comparadas com o mesmo nível de sinal de fluorescência inicial e final para ajudar na interpretação e análise. São fornecidos dois cursores por região, predefinidos para os finais da curva. Os pontos dos dados dentro das regiões são utilizados para normalizar a fluorescência (apenas o eixo y) para o início (Região 1) e o fim (Região 2) do gráfico de fusão. Os dados fora das regiões definidas são ignorados. Ajuste as regiões para abrangerem dados representativos da linha de base para as fases de pré-fusão e pós-fusão. Alargar as regiões (clcando e arrastando) permite que o software se ajuste ao declive da linha de base. Para se certificar de que as curvas foram normalizadas eficazmente, evite alargar as regiões de normalização para a fase de fusão.

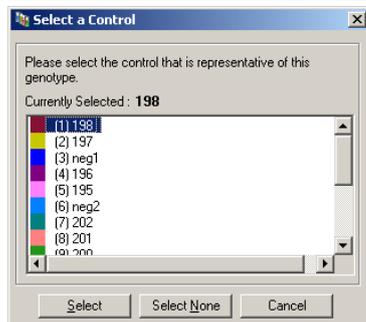
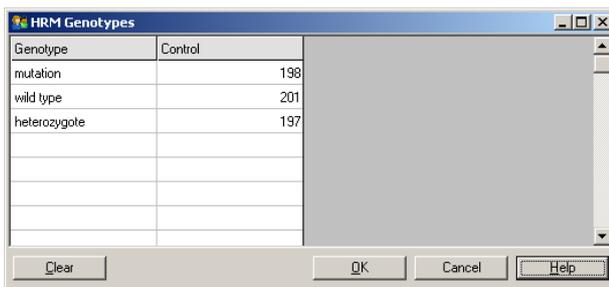


Nota: Recomendamos que os cursores apenas sejam movidos se pretender evitar áreas da curva de fusão. Movimentar os cursores em direção às transições da fase de fusão pode influenciar os gráficos de subtração e as percentagens de confiança.

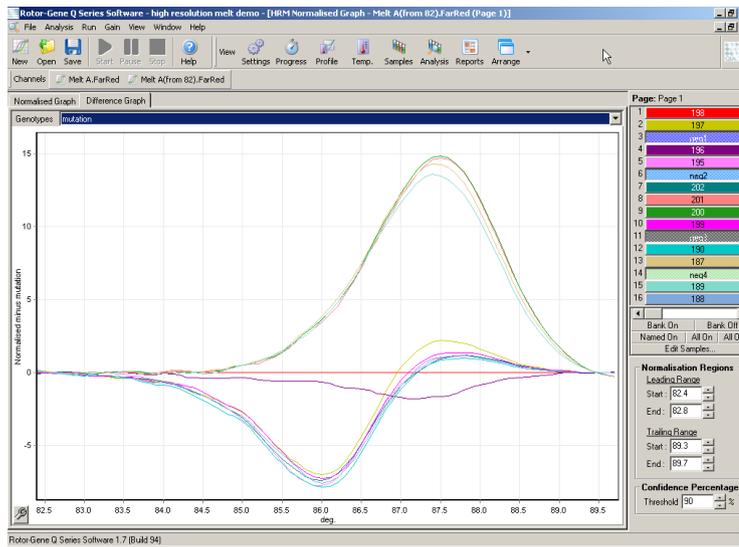
3. A janela Normalised Graph (Gráfico normalizado) apresenta as curvas de fusão normalizadas. As amostras também podem ser visualizadas como um gráfico de diferenças em relação a um dos controlos.



4. Clique no botão Genotypes... (Genótipos...) para definir os genótipos. Introduza o nome de cada categoria de genótipos e selecione uma amostra representativa para cada uma a partir da lista de amostras.



- Visualize o gráfico de diferenças selecionando o separador Difference Graph (Gráfico de diferenças). Em seguida, selecione o genótipo com o qual pretende comparar todas as outras amostras utilizando o menu pendente na parte superior da janela. No exemplo apresentado, todas as amostras são traçadas subtraídas de um gráfico de médias de todas as amostras etiquetadas como Mutation 1 (Mutação 1).



- Os genótipos serão automaticamente designados pelo software na janela Results (Resultados).   fornecido um valor de confiança como uma verifica o de integridade dos resultados designados automaticamente. O valor de limiar, acima do qual são feitas as designa es automáticas, pode ser editado. As amostras que estão abaixo do limiar definido serão marcadas como uma varia o para serem investigadas mais aprofundadamente ou para voltarem a ser testadas.

No.	C	Name	Genotype	Confidence %
1	198	mutation	mutation	100.00
2	197	heterozygote	heterozygote	100.00
4	196	mutation	mutation	95.72
5	195	heterozygote	heterozygote	97.58
7	202	heterozygote	heterozygote	97.80
8	201	wild type	wild type	100.00
9	200	wild type	wild type	99.86
10	199	heterozygote	heterozygote	98.91
12	190	heterozygote	heterozygote	96.23
13	187	wild type	wild type	99.23
15	189	wild type	wild type	97.59

Normalisation Regions

Leading Range
 Start: 82.4
 End: 82.8

Trailing Range
 Start: 89.3
 End: 89.7

Confidence Percentage
 Threshold: 90 %

11 Resolução de problemas

Esta secção fornece informações sobre o que fazer se ocorrerem erros durante a utilização do Rotor-Gene Q MDx System.

Caso necessite de obter mais assistência, contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN utilizando as informações de contacto abaixo:

Site: support.qiagen.com

Ao contactar os Serviços de Assistência da QIAGEN acerca de um erro com o Rotor-Gene Q MDx, anote os passos anteriores ao erro e quaisquer informações apresentadas nas caixas de diálogo. Essas informações irão ajudar os Serviços de Assistência da QIAGEN a solucionar o problema.

Quando contactar os Serviços de Assistência da QIAGEN acerca de um erro, tenha à mão as seguintes informações:

- Número de série, tipo e versão do Rotor-Gene Q MDx
- Versão do software (se aplicável)
- Dia e hora da primeira ocorrência do erro
- Frequência da ocorrência do erro (ou seja, erro intermitente ou persistente)
- Descrição detalhada da situação de erro
- Fotografia do erro, se possível
- Cópia dos ficheiros de registo

Estas informações irão ajudá-lo a si e ao especialista dos Serviços de Assistência da QIAGEN a lidar da forma mais eficiente com o problema.

Nota: As informações sobre as versões mais recentes do software e do protocolo podem ser encontradas em www.qiagen.com. Em alguns casos, podem estar disponíveis atualizações para resolver problemas específicos.

11.1 Arquivos de registo

O software mantém um registo não modificado de cada execução, juntamente com informações de diagnóstico, no seu repositório dos arquivos de registo. Ao utilizar a opção Help, Send Support Email (Ajuda, enviar e-mail de assistência), é possível enviar um e-mail juntamente com todas as informações de diagnóstico necessárias para os Serviços de Assistência da QIAGEN (consulte a secção 6.12.1).

Para poupar espaço do disco, apenas são armazenados arquivos de registo das 60 execuções mais recentes. Os arquivos de registo de execução mais antigos serão substituídos à medida que são criados novos.

11.2 Erros de hardware e software

11.2.1 Resolução de problemas de HRM

	Comentários e sugestões
Não é possível executar HRM	
O modelo de Rotor-Gene Q MDx não está equipado com HRM	Contacte o representante local da QIAGEN.
Não foram obtidos dados de HRM	
Configuração incorreta	Verifique as definições de filtro. Verifique se o tipo de rotor está correto. Verifique se foram utilizados os reagentes corretos. Verifique se a reação foi configurada corretamente. Execute uma experiência de controlo positivo (ou seja, um ensaio que se sabe que fornece resultados).
Os gráficos parecem recortados	
Amplificação fraca ou inexistente	Verifique se foram utilizados os reagentes e protocolos corretos. Recomendamos os kits da QIAGEN para a análise de HRM. Verifique se a reação foi configurada corretamente. Verifique as condições de ciclagem. Verifique a qualidade inicial e a quantidade do modelo. Recomendamos os kits da QIAGEN para a preparação da amostra.
Os gráficos de fusão ou de amplificação estão saturados	
Definição dos ganhos muito elevada	Utilize a Auto-Gain Optimisation (Otimização do ganho automático) (consulte a página 61).
As percentagens de confiança foram alteradas	
As regiões de normalização foram movidas ao clicar e arrastar	Apenas mova regiões de normalização se for necessário evitar partes da curva de fusão.
Estão presentes valores atípicos nos dados	
Configuração da reação inconsistente	Verifique se foram utilizados os reagentes corretos. Verifique se os tubos utilizados estão uniformes.
Inibidores presentes na amostra	Verifique se foi utilizada a mesma mistura principal para todas as amostras.
Modelo degradado ou em pequena quantidade	Verifique a qualidade inicial e a quantidade do modelo.

11.3 Mensagens de erro e de aviso

11.3.1 Erros gerais do instrumento

Mensagem de erro	Comentários e sugestões
Can't open the serial port <COMPORT> (Não é possível abrir a porta de série <COMPORT>)	<p>Este erro ocorre no arranque do software caso o software não consiga comunicar com o instrumento através da porta COM configurada. Normalmente isto é provocado por cabos defeituosos, cabos soltos, portas de série defeituosas, portas USB defeituosas, um problema com a unidade USB ou um problema com o controlador do conversor USB para série.</p> <p>Torne a ligar ou substitua o cabo. Reinstale os controladores adequados. Inicie o software no Virtual Mode (Modo virtual) e selecione o botão Setup/Auto-Detect (Configuração/Autodeteção) no menu File (Ficheiro) para repor a porta COM configurada.</p>
Chamber lid open (Tampa da câmara aberta) Could not continue run; the chamber lid was opened during a run. Please reset the machine, and restart the software. (Não foi possível continuar a execução; a tampa da câmara foi aberta durante a execução. Reponha a máquina e reinicie o software.)	<p>Este erro ocorre quando o software deteta que a tampa está aberta a meio de uma execução.</p> <p>Reponha a máquina e reinicie o software.</p>
Chamber lid open (Tampa da câmara aberta) The instrument chamber lid is open. Please close the lid and then click Continue. (A tampa da câmara do instrumento está aberta. Feche a tampa e, em seguida, clique em Continuar.)	<p>Este erro ocorre quando o utilizador tenta iniciar uma execução enquanto a tampa do instrumento está aberta.</p> <p>Feche a tampa da câmara do instrumento e, em seguida, clique em Continue (Continuar).</p>
Communication corrupted (Comunicação corrompida)	<p>Este erro ocorre quando os dados recebidos do instrumento não correspondem ao padrão esperado.</p> <p>São necessárias mais investigações por parte de um especialista de Assistência Local da QIAGEN para diagnosticar o problema do instrumento.</p> <p>Contacte o seu distribuidor ou os Serviços de Assistência da QIAGEN.</p>
Communication out of sequence (Comunicação fora da sequência) Instrument has received data from the machine that is out of sequence. (O instrumento recebeu dados da máquina que estão fora da sequência.)	<p>Este erro ocorre quando os dados recebidos do instrumento não se encontram na ordem correta.</p> <p>São necessárias mais investigações por parte de um especialista de Assistência Local da QIAGEN para diagnosticar o problema do instrumento.</p> <p>Contacte o seu distribuidor ou os Serviços de Assistência da QIAGEN.</p>
Communication protocol error (Erro de protocolo de comunicação) A communication protocol error occurred with this run. (Ocorreu um erro de protocolo de comunicação nesta execução.)	<p>Este erro ocorre quando o protocolo de comunicação configurado no firmware não é o mesmo que o protocolo esperado.</p> <p>São necessárias mais investigações por parte de um especialista de Assistência Local da QIAGEN para diagnosticar o problema do instrumento ou do protocolo de comunicação.</p>
Detector motor jam, stopped machine (O motor do detetor encravou e parou a máquina)	<p>Este erro pode ocorrer quando o Rotor-Gene Q MDx é iniciado imediatamente após a entrega em climas frios.</p> <p>Neste caso, deixe o instrumento aclimatizar-se à temperatura ambiente pelo menos durante uma hora antes de o ligar.</p> <p>Se o erro persistir, contacte o seu distribuidor ou os Serviços de Assistência da QIAGEN.</p>

Mensagem de erro

Comentários e sugestões

Fatal hardware malfunction (Avaria fatal do hardware)

The instrument detected that there was a fatal hardware malfunction. Do not attempt to re-use the machine until the machine has been serviced by your distributor. (O instrumento detetou que ocorreu uma avaria fatal do hardware. Não tente utilizar novamente a máquina até obter assistência por parte do seu distribuidor.)

Machine error (Erro da máquina)

This run was stopped as machine errors occurred that could not be recovered from. Please contact your distributor if this occurs again, attaching a support archive file. (Esta execução foi interrompida, pois ocorreram erros dos quais não foi possível recuperar. Contacte o seu distribuidor se isto ocorrer novamente, anexando um ficheiro de arquivo de apoio.)

Machine unplugged (Fonte de alimentação da máquina desligada)

The instrument is not responding and failed with the message <ERROR MESSAGE >. This is an unrecoverable failure, please reset the instrument and restart the software. (O instrumento não está a responder e falhou com a mensagem <MENSAGEM DE ERRO>. Trata-se de uma falha irreversível; reponha o instrumento e reinicie o software.)

Machine unplugged (Fonte de alimentação da máquina desligada)

The instrument is not connected to your computer on <PORT NAME>. Reconnect the serial cable to the back of the computer and then click Continue. (O instrumento não está ligado ao seu computador em <NOME DA PORTA>. Volte a ligar o cabo de série à parte traseira do computador e, em seguida, clique em Continuar.)

Object variable or with block variable not set (Variável de objeto ou com variável de bloco não definida)

Este erro ocorre quando o software tiver detetado uma avaria fatal do hardware e ativado um procedimento de proteção de segurança para desligar a máquina.

Desligue imediatamente o instrumento e contacte o seu distribuidor ou os Serviços de Assistência da QIAGEN.

Este erro ocorre quando o software deteta erros na máquina, dos quais não foi possível recuperar. O software parou a execução.

Tente outra execução. Se o problema persistir, contacte o seu distribuidor ou os Serviços de Assistência da QIAGEN e anexe um ficheiro de arquivo de apoio.

Este erro ocorre se o instrumento não comunicar com o software após um intervalo de tempo de espera definido. É frequentemente causado por uma falha no instrumento ou devido a atividade excessiva por parte do PC, o que provoca a perda de um pacote.

As causas comuns relacionadas com o software incluem tarefas exigentes para o processador, como proteção residente de antivírus ou análises agendadas do antivírus, placas sem fios ou placas de infravermelhos.

Desative ou desinstale o software/tarefa exigente para o processador.

Reponha o instrumento e reinicie o software.

Contacte o seu distribuidor ou os Serviços de Assistência da QIAGEN caso o problema persista.

Este erro ocorre quando a comunicação USB ou de série para o instrumento é perdida.

Volte a ligar o cabo de série ou USB à parte traseira do computador e, em seguida, clique no botão Continue (Continuar).

Este erro ocorre no arranque do software se o ficheiro do modelo da experiência predefinido tiver sido corrompido. Isto pode acontecer se o software/computador for encerrado sem fechar tudo corretamente, por exemplo, quando ocorre uma falha de energia.

Elimine o ficheiro C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\normal.ret e, em seguida, reinicie o software.

Mensagem de erro	Comentários e sugestões
<p>Rotor speed failure (Falha na velocidade do rotor)</p> <p>Time out while setting the rotor speed. (Tempo limite excedido para definir a velocidade do rotor.)</p>	<p>Este erro ocorre quando o software tiver tentado definir a velocidade do rotor e falhado a definição da velocidade-alvo dentro de um período de tempo limite.</p> <p>São necessárias mais investigações por parte de um especialista de Assistência Local da QIAGEN para diagnosticar o problema do instrumento.</p> <p>Contacte o seu distribuidor ou os Serviços de Assistência da QIAGEN.</p>
<p>Serial port in use (Porta de série em utilização)</p> <p>The serial port is currently being used by another application. Close any applications such as communications or synchronization software and then retry. (A porta de série está a ser atualmente utilizada por outra aplicação. Feche quaisquer aplicações, como comunicações ou software de sincronização e, em seguida, tente novamente.)</p>	<p>Este erro ocorre quando o software tenta ligar-se à máquina na porta COM configurada quando a porta está a ser utilizada por outro software.</p> <p>Feche quaisquer aplicações, como comunicações ou software de sincronização e, em seguida, tente novamente.</p>
<p>Shutdown timeout (Tempo limite para encerramento)</p> <p>The instrument has exceeded the expected time to shutdown. Please reset the machine, and reset the software. (O instrumento excedeu o tempo esperado para encerrar. Reponha a máquina e reinicie o software.)</p>	<p>Este erro ocorre quando o software emite o comando de encerramento para o instrumento e a máquina continua a enviar dados após o período de tempo de tolerância esperado.</p> <p>Reponha a máquina e reinicie o software.</p>
<p>Temperature protection activated (Proteção da temperatura ativada)</p> <p>The instrument detected that the chamber temperature increased above a safe level. It has therefore entered a self-protection mode. Please turn off the instrument and contact your distributor if the problem persists. (O instrumento detetou que a temperatura da câmara aumentou acima do nível seguro. Por este motivo, entrou em modo de autoproteção. Desligue o instrumento e contacte o seu distribuidor caso o problema persista.)</p>	<p>Este erro ocorre quando o software deteta que a temperatura da câmara aumentou acima do nível seguro e, por este motivo, ativa um procedimento de proteção de segurança.</p> <p>Desligue imediatamente o instrumento e contacte o seu distribuidor ou os Serviços de Assistência da QIAGEN.</p>
<p>Thermistor is open (O termistor está aberto)</p> <p>The instrument detected that the thermistor is open, and so to prevent damage to the machine, it has been turned off. Please contact your distributor if this occurs again. (O instrumento detetou que o termistor está aberto, por isso, para prevenir a ocorrência de danos na máquina, foi desligado. Contacte o seu distribuidor se isto ocorrer novamente.)</p>	<p>Este erro ocorre quando o software deteta que o termistor está aberto e, por isso, não é capaz de ler a temperatura; o software, em seguida, ativa um procedimento de proteção de segurança para desligar a máquina.</p> <p>Desligue imediatamente o instrumento e contacte o seu distribuidor ou os Serviços de Assistência da QIAGEN.</p>
<p>Unrecoverable errors occurred (Ocorrência de erros irrecuperáveis)</p> <p>This run was stopped as machine errors occurred that could not be recovered from. Please contact your distributor if this occurs again, attaching a support archive file. (Esta execução foi interrompida, pois ocorreram erros dos quais não foi possível recuperar. Contacte o seu distribuidor se isto ocorrer novamente, anexando um ficheiro de arquivo de apoio.)</p>	<p>Este erro ocorre a meio de uma execução, após o software ter feito todas as tentativas possíveis para recuperar e ter falhado.</p> <p>São necessárias mais investigações por parte de um especialista de Assistência Local da QIAGEN para diagnosticar o problema do instrumento.</p> <p>Contacte o seu distribuidor ou os Serviços de Assistência da QIAGEN.</p>

11.3.2 Mensagens do software Rotor-Gene Q

Segue-se uma lista de utilização, aviso e outras mensagens que podem ser apresentadas no software Rotor-Gene durante o funcionamento do software e hardware. Qualquer parte da mensagem que é variável, tais como as descrições de erros de características, é dada entre parênteses (por exemplo, <ERROR DESCRIPTION> [DESCRIÇÃO DO ERRO]).

Texto da mensagem

Mensagens gerais

- 1 A raw channel already exists for this page. If you would like to recreate this page, you must first delete the raw channel via the Options button and then try again. (Já existe um canal não processado para esta página. Se pretender recriar esta página, primeiro necessita de eliminar o canal não processado através do botão Options [Opções] e, em seguida, tente novamente.)
- 2 A serious problem has occurred which requires shutting down the software. After you click OK, your current work will be saved, and the machine will be turned off, if possible. If this problem persists, please contact your distributor. (Ocorreu um problema sério que requer que o software seja encerrado. Depois de clicar em OK, o seu trabalho será guardado e a máquina irá desligar-se, se possível. Se este problema persistir, contacte o seu distribuidor.)
- 3 Cannot delete this page. There must always be at least one sample page. (Não é possível eliminar esta página. É necessário haver sempre pelo menos uma página de amostras.)
- 4 Can't connect to instrument on serial port <COMPORT>. Check the machine is correctly plugged into the back of the computer, then retry (Não é possível ligar ao instrumento através da porta de série <COMPORT>. Verifique se a máquina está corretamente ligada à parte traseira do computador e, em seguida, tente novamente)
- 5 Can't open the serial port <COMPORT> to connect to the instrument. Check you do not have any communications software open, then retry. (Não é possível abrir a porta de série <COMPORT> para ligar ao instrumento. Verifique se não tem nenhum software de comunicações aberto e, em seguida, tente novamente.)
- 6 Could not save to run because some data on the form was invalid. Please check your entries then try again. (Não foi possível guardar para executar pois alguns dados no formulário são inválidos. Verifique as suas entradas e, em seguida, tente novamente.)
- 7 Couldn't save file. Confirm the disk has enough space and that it is free of errors. (Não foi possível guardar o ficheiro. Confirme se o disco tem espaço suficiente e que está livre de erros.)
- 8 E-mail application could not be started. Confirm that it has been correctly installed on your computer. (A aplicação de correio eletrónico não pode ser iniciada. Confirme se foi instalada corretamente no seu computador.)
- 9 Encountered an error during run: <ERROR DESCRIPTION>. The run will continue, and a message will be logged in the messages tab of Run Info. (Foi encontrado um erro durante a execução: <DESCRIÇÃO DO ERRO>. A execução irá continuar e uma mensagem será registada no separador das mensagens de informações de execução.)
- 10 Instrument was not detected. Please ensure you have correctly connected the instrument, and that the instrument is turned on. (O instrumento não foi detetado. Certifique-se de que ligou corretamente o instrumento e que este está ativo.)
- 11 Logging is currently disabled due to a previous error. Archived logs cannot be viewed until the software has been restarted. (Início de sessão atualmente desativado devido a um erro anterior. Os registos arquivados não podem ser visualizados até que o software tenha sido reiniciado.)
- 12 Not all samples could be normalised as the fluorescent level was too low. (Nem todas as amostras puderam ser normalizadas visto que o nível de fluorescência estava demasiado baixo.)
- 13 Only runs performed with the same rotor as the current run may be imported. (Apenas podem ser importadas execuções efetuadas com o mesmo rotor da execução atual.)
- 14 Please note that log files for the current run will not be available until it has completed. (Tenha em atenção que os ficheiros de registo para a execução atual não estarão disponíveis até que esta esteja concluída.)
- 15 Please type valid number of times to repeat. It should be more than 0. (Introduza um número válido de vezes para repetir. O número deve ser superior a 0.)

Texto da mensagem

- 16 Problem encountered while updating log data. Logging has been disabled, but will be reenabled on the next run. (Foi encontrado um problema ao atualizar dados de registo. O início de sessão foi desativado, mas será novamente ativado na próxima execução.)
- 17 Run file signing ensures the integrity of your run results. Information about a run's signature can be found in the Run Info window. (A assinatura do ficheiro de execução assegura a integridade dos seus resultados de execução. As informações acerca da assinatura de uma execução podem ser encontradas na janela Run Info [Informações de execução].)
- 18 Sample ID is locked. Cannot paste over locked samples. (A ID da amostra está bloqueada. Não é possível colar sobre amostras bloqueadas.)
- 19 TeeChart Office has not been installed on this computer. Please re-install the Rotor-Gene software. (O TeeChart Office não foi instalado neste computador. Instale novamente o software Rotor-Gene Q.)
- 20 The COM port configured for the instrument is not selected. You must select a COM port. (A porta COM configurada para o instrumento não está selecionada. Deve selecionar uma porta COM.)
- 21 The loaded run file contains a signature which does not match the file contents. This means the file has either been corrupted, or tampered with since it was written by the Rotor-Gene software. (O ficheiro de execução carregado contém uma assinatura que não corresponde aos conteúdos dos ficheiros. Isto significa que o ficheiro foi corrompido ou adulterado, pois foi escrito pelo software Rotor-Gene Q.)
- 22 The loaded run file has no signature. The contents of this file cannot be guaranteed. (O ficheiro de execução carregado não tem assinatura. Os conteúdos deste ficheiro não podem ser garantidos.)
- 23 The Machine serial number is not valid. Serial numbers must be at least 6 digits long. (O número de série da máquina não é válido. Os números de série devem conter pelo menos 6 dígitos.)
- 24 The machine will now be cooled to <TEMPERATURE> degrees. The chamber and surfaces will still be very hot when opening the machine. Please exercise due caution and wear protective gloves if touching any of the surfaces or tubes. (A máquina será agora arrefecida para <TEMPERATURA> graus. A câmara e as superfícies ainda estarão muito quentes quando abrir a máquina. Tenha cuidado e utilize luvas de proteção se tocar em qualquer uma das superfícies ou tubos.)
- 25 The regional settings for your computer are conflicting. Ensure your currency and numeric decimal placeholders are matching. (As definições regionais para o seu computador são contraditórias. Certifique-se de que a sua moeda e os marcadores de posição decimais numéricos são correspondentes.)
- 26 The serial number entered in the welcome screen <SERIAL NUMBER1> does not match the serial number stored in the attached machine <SERIAL NUMBER2>. The computer's serial number has now been updated to match the connected machine. (O número de série introduzido no ecrã de boas-vindas <NÚMERO DE SÉRIE 1> não corresponde ao número de série armazenado na máquina anexada <NÚMERO DE SÉRIE 2>. O número de série do computador foi agora atualizado para corresponder à máquina ligada.)
- 27 There was a problem communicating with the communication board. You should reboot the computer and then retry. (Houve um problema ao comunicar com o quadro de comunicação. Deve reiniciar o computador e, em seguida, tentar novamente.)
- 28 There was a timeout attempting to talk to the instrument. Check it is correctly plugged in. (Havia um tempo limite a tentar comunicar com o instrumento. Verifique se está ligado corretamente à fonte de alimentação.)
- 29 This feature cannot be used in virtual mode. (Esta funcionalidade não pode ser utilizada no modo virtual.)
- 30 This profile file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects may not load correctly. (Este ficheiro de perfil foi criado numa versão mais recente do software Rotor-Gene. Certos aspetos podem não carregar corretamente.)
- 31 This run file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects of the run may not load correctly. (Este ficheiro de execução foi criado numa versão mais recente do software Rotor-Gene. Certos aspetos da execução podem não carregar corretamente.)
- 32 This sample file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects may not load correctly. (Este ficheiro de amostras foi criado numa versão mais recente do software Rotor-Gene. Certos aspetos podem não carregar corretamente.)
- 33 This software will perform basic simulation of a machine for training and demonstration purposes. You can disable this setting via the Setup screen, accessible from the File menu. (Este software irá efetuar uma simulação básica de uma máquina para efeitos de formação e demonstração. Pode desativar esta definição no ecrã Setup [Configuração], acessível a partir do menu File [Ficheiro].)
- 34 This template was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects of the template may not load correctly. (Este modelo foi criado numa versão mais recente do software Rotor-Gene. Certos aspetos do modelo podem não carregar corretamente.)

Texto da mensagem

- 35 Unable to load this sample file as tube layouts do not match. Load these samples before starting the run. (Não foi possível carregar este ficheiro de amostras pois a configuração dos tubos não corresponde. Carregue estas amostras antes de iniciar a execução.)
- 36 Unable to open communications with the machine because another application is already using <COMPORT>. Check you do not have any applications running that use the same serial port, then retry. (Não foi possível abrir comunicações com a máquina pois outra aplicação já está a utilizar <COMPORT>. Verifique se não tem aplicações em execução que utilizem a mesma porta de série e, em seguida, tente novamente.)
- 37 Unrecoverable errors were encountered while attempting to load the file. The file was not loaded. (Foram encontrados erros irrecuperáveis ao tentar carregar o ficheiro. O ficheiro não foi carregado.)
- 38 You cannot stop the program while the run is in progress. (Não pode parar o programa enquanto está a decorrer a execução.)
- 39 You have insufficient rights to use the software. Please contact the domain administrator to set up groups. (Não tem direitos suficientes para utilizar o software. Contacte o administrador do domínio para configurar grupos.)
- 40 You must have performed a quantitation analysis to export samples. (Deve ter efetuado uma análise de quantificação para exportar amostras.)
- 41 You must select a COM port before continuing. (Deve selecionar uma porta COM antes de prosseguir.)
- 42 Your run could not be saved to its default location. On the following window, select an alternative location to save your run. (A sua execução não pode ser guardada na sua localização predefinida. Na janela seguinte, seleccione uma localização alternativa para guardar a sua execução.)
- 43 Your settings have been saved. Click OK to close the software. (As suas definições foram guardadas. Clique em OK para fechar o software.)
- 44 You must select a rotor before continuing. (Deve selecionar um rotor antes de prosseguir.)
- 45 You cannot start the run until you tick the checkbox to confirm that the locking ring has been attached. (Não pode iniciar a execução até marcar a caixa de verificação para confirmar que o anel de bloqueio foi fixado.)

Mensagens de ajuste automático do ganho

- 46 Manual gain adjustment uses the channels you have defined in your profile. As you have not defined any acquisition points in your profile, you cannot perform manual gain adjustment. (O ajuste manual do ganho utiliza os canais que definiu no seu perfil. Como não definiu qualquer ponto de aquisição no seu perfil, não pode efetuar o ajuste manual do ganho.)
- 47 The temperature you entered was not saved because it was outside the range of the machine. Enter a valid temperature. (A temperatura que introduziu não foi guardada pois estava fora do intervalo da máquina. Introduza uma temperatura válida.)

Mensagens do editor

- 48 Please enter a valid group code. Group codes must be a maximum of 5 characters, and contain no spaces or commas. (Introduza um código de grupo válido. Os códigos de grupo devem ter um máximo de 5 caracteres e não podem conter espaços ou vírgulas.)
- 49 Please enter a valid group name. Group names cannot contain commas or be empty. (Introduza um nome de grupo válido. Os nomes do grupo não podem conter vírgulas ou estar vazios.)

Mensagens de calibração da desnaturação ótica

- 50 Unable to set as optical denature point due to calibration failure. Please enter a valid number of seconds to hold. It should be a positive value. (Não foi possível definir como ponto de desnaturação ótica devido a falha na calibração. Introduza um número válido de segundos para suspender. Deve ser um valor positivo.)
- 51 A melt peak could not be detected during Optical Denature Calibration. This may be because the incorrect tube was selected for calibration, or that an inappropriate chemistry was used for this sample. A timed step profile was run instead. (Não foi detetado um pico de fusão durante a calibração de desnaturação ótica. Isto pode ser devido ao facto de ter sido selecionado o tubo incorreto para calibração ou de ter sido utilizado um químico incorreto para esta amostra. No seu lugar foi executado um perfil de passos agendados.)

Mensagens da OTV

- 52 You must enter a valid OTV serial number to perform the run. (Deve introduzir um número de série de OTV válido para efetuar a execução.)
- 53 This temperature verification file has been corrupted. Please uninstall and re-install the Rotor-Gene software to correct this error. (Este ficheiro de verificação de temperatura foi corrompido. Desinstale e instale novamente o software Rotor-Gene para corrigir este erro.)

Texto da mensagem

- 54 This run file is not correctly signed. Results cannot be displayed. (O ficheiro de execução não está assinado corretamente. Os resultados não podem ser apresentados.)
- 55 You cannot start until you tick the checkbox to confirm that the fluorescent insert has been placed correctly. (Não pode iniciar a execução até marcar a caixa de verificação para confirmar que o introdutor de fluorescência foi colocado corretamente.)
- 56 This rotor has expired. Please contact your distributor to obtain a replacement. (Este rotor expirou. Contacte o seu distribuidor para obter um substituto.)

Mensagens do menu de segurança

- 57 Could not open the Windows user/group manager. (Não foi possível abrir o utilizador/gestor do grupo do Windows.)
- 58 Could not create groups. (Não foi possível criar grupos.)
- 59 Cannot modify access of inbuilt accounts. (Não foi possível modificar o acesso às contas incorporadas.)

Menu de análise

- 60 You have only selected one channel for analysis. To select multiple channels, drag a rectangle around the channels you wish to display in the analysis selection window. (Selecionou apenas um canal para análise. Para selecionar vários canais, desloque um retângulo para circundar os canais que pretende apresentar na janela de seleção da análise.)
- 61 You have selected multiple channels for analysis. This analysis technique only allows single channels to be analysed. (Selecionou vários canais para análise. Esta técnica de análise apenas permite que sejam analisados canais únicos.)

Mensagens de medição da concentração

- 62 Concentration Measurement performs auto-gain optimisation on the first rotor position. Ensure you have your highest concentration standard in the first rotor position. (A medição da concentração efetua a otimização automática do ganho na primeira posição do rotor. Certifique-se de que tem o padrão de concentração mais elevado na primeira posição do rotor.)

Mensagens de análise do ponto final

- 63 To use end-point analysis you must have positive and negative controls in each channel. To define these controls click OK. (Para utilizar a análise do ponto final deve ter controlos positivos e negativos em cada canal. Para definir estes controlos, clique em OK.)
- 64 You have not defined any positive controls. You must define positive controls for each channel you are analysing. (Não definiu nenhum controlo positivo. Deve definir controlos positivos para cada canal que está a analisar.)
- 65 You have not defined any negative controls. You must define negative controls for each channel you are analysing. (Não definiu nenhum controlo negativo. Deve definir controlos negativos para cada canal que está a analisar.)
- 66 You have not defined any NTC controls. You must define NTC controls for each group. (Não definiu nenhum controlo NTC. Deve definir controlos NTC para cada grupo.)

Mensagens de análise de HRM

- 67 Genotype <GENOTYPE NAME> does not have a control defined. (O genótipo <NOME DO GENÓTIPO> não tem um controlo definido.)
- 68 Duplicate genotype combinations are not allowed. (Não são permitidas combinações de genótipos duplicadas.)
- 69 High resolution melts are not supported on this instrument. Please contact your distributor for more information. (Não são suportadas fusões de alta resolução neste instrumento. Contacte o seu distribuidor para obter mais informações.)

Mensagens de análise de fusão

- 70 The genotypes can not be defined until bins have been placed. Please define all bins and then try again. (Os genótipos não podem ser definidos até que tenham sido colocados os recipientes. Defina todos os recipientes e, em seguida, tente novamente.)
- 71 You must enter an abbreviation for <GENOTYPE NAME> genotype. (Deve introduzir uma abreviatura para o genótipo <NOME DO GENÓTIPO>.)

Mensagens de análise do gráfico de dispersão

Texto da mensagem

- 72 Scatter plot analysis requires exactly 2 channels to be selected. To select multiple channels, drag a rectangle around the channels you wish to display in the analysis selection window, or click while holding the SHIFT key on each channel. (A análise do gráfico de dispersão requer que sejam selecionados exatamente 2 canais. Para selecionar vários canais, arraste um retângulo junto aos canais que pretende apresentar na janela de seleção da análise ou clique na tecla SHIFT, mantendo-a premida, sobre cada canal.)

Mensagens de análise de quantificação

- 73 The auto-find threshold feature requires that you have defined at least 2 selected standards. To set this up, right-click on the sample list and select "Edit Samples..." (A funcionalidade de localização automática do limiar requer que tenha definido pelo menos 2 padrões selecionados. Para configurar isto, clique com o botão direito do rato na lista de amostras e selecione "Edit Samples..." [Editar amostras...])

12 Glossário

Termo	Descrição
Aquisição	A aquisição é a recolha de dados de fluorescência. Cada aquisição (conjunto de dados de fluorescência) de um canal é apresentada no software como dados não analisados na janela "Raw channel" (Canal não processado). Estes dados podem ser analisados utilizando as opções no menu "Analysis" (Análise).
Recipientes	Numa análise de fusão, os recipientes são determinados para definir uma região na qual se espera que o pico de fusão ocorra. Os genótipos podem ser definidos com base na presença de picos em certos recipientes ou combinações de recipientes.
CE-IVD	Em conformidade com a Diretiva Europeia 98/79/CE para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.
Canal	Um canal consiste num diodo emissor de luz (Light Emitting Diode, LED) com um filtro de excitação emparelhado com um filtro de emissão. O LED e o filtro de excitação excitam as amostras, atribuindo-lhes um determinado comprimento de onda. A fluorescência emitida pelas amostras atravessa o filtro de emissão, antes de ser detetada por um fotomultiplicador.
Ganho	O Rotor-Gene Q MDx utiliza um fotomultiplicador para recolher fotões de fluorescência e convertê-los em sinais eletrónicos. O ganho é uma definição que determina a sensibilidade do fotomultiplicador. Se o ganho estiver definido com um valor demasiado elevado, o sinal fica sobressaturado. Se o ganho estiver definido com um valor demasiado baixo, não é possível diferenciar o sinal do ruído de fundo.
Otimização do ganho	A otimização do ganho é um processo que ajusta a definição do ganho de forma dinâmica, permitindo que seja selecionada uma definição adequada, o que resulta na deteção ideal do sinal.
Bloco de carregamento	Os blocos de carregamento são blocos de alumínio disponíveis em diferentes formatos, que são utilizados para conter os tubos ou Rotor-Discs durante a configuração da reação. Os Rotor-Disc Loading Blocks também são utilizados com o Rotor-Disc Heat Sealer para selar a quente os Rotor-Discs.
Anel de bloqueio	Os anéis de bloqueio são anéis metálicos que se ajustam ao rotor para impedir que os tubos e as tampas se soltem durante o funcionamento do Rotor-Gene Q MDx. As tampas e tubos soltos podem causar danos no instrumento.
Rotor	O rotor de metal contém os tubos ou Rotor-Discs no Rotor-Gene Q MDx. Permite que as amostras girem na câmara do instrumento e assegura que as amostras são alinhadas corretamente com o sistema ótico. O rotor é fixado por um anel de bloqueio.
Rotor-Disc	Os Rotor-Discs são placas circulares de poços de reação orientados verticalmente. Estão disponíveis formatos de Rotor-Discs de 72 e 100 reações. Os Rotor-Discs são selados utilizando Rotor-Disc Heat Sealing Film e o Rotor-Disc Heat Sealer.

13 Especificações técnicas

A QIAGEN reserva-se o direito de alterar as especificações em qualquer altura.

13.1 Condições ambientais – Condições de funcionamento

Potência	100–240 V CA, 50–60 Hz, 520 VA (pico) Consumo de energia 60 VA (em suspensão) As flutuações de tensão da rede de alimentação elétrica não devem ultrapassar 10% das tensões de alimentação nominais.
Fusíveis	Fusível F5A 250 V
Dissipação de calor/carga térmica	Média: 0,183 kW (632 BTU/hora) Pico: 0,458 kW (1578 BTU/hora)
Categoria de sobretensão	II
Temperatura do ar	18 a 30 °C
Humidade relativa	10–75% (sem condensação)
Altitude	Até 2000 m
Local de funcionamento	Apenas para utilização em interiores
Nível de poluição	2
Classe ambiental	3K2 (IEC 60721-3-3) 3M2 (IEC 60721-3-3)

13.2 Condições de transporte

Temperatura do ar	-25 °C a 60 °C na embalagem do fabricante
Humidade relativa	Máx. 75% (sem condensação)
Classe ambiental	2K2 (IEC 60721-3-2)

13.3 Condições de armazenamento

Temperatura do ar	15 °C a 30 °C na embalagem do fabricante
Humidade relativa	Máx. 75% (sem condensação)
Classe ambiental	1K2 (IEC 60721-3-1)

13.4 Dados mecânicos e características do hardware

Dimensões	Largura: 370 mm Altura: 286 mm Profundidade (sem os cabos): 420 mm Profundidade (porta aberta): 538 mm
Peso	12,5 kg configuração padrão
Capacidade	Até 100 amostras por execução utilizando um Rotor-Disc 100
Software	Software Rotor-Gene Q versão 2.3.x (em que x é ≥0)

13.5 Especificações (hardware e software)

13.5.1 Especificações térmicas

Descrição	Especificação
Intervalo de temperatura	35 °C a 99 °C (50 °C a 99 °C para aplicações de ciclagem)
Exatidão da temperatura	±0,5 °C (calibrada utilizando o procedimento de OTV do Rotor-Disc)
Resolução da temperatura	±0,02 °C (menor incremento programável)
Uniformidade da temperatura	±0,02 °C

13.5.2 Especificações óticas

Descrição	Especificação
Fontes de excitação	Díodos emissores de luz de energia elevada
Detetor	Fotomultiplicador
Tempo de aquisição	4 s

14 Apêndice A – Aspectos legais

14.1 Declaração FCC

A "United States Federal Communications Commission" (USFCC) (em 47 CRF 15. 105) declarou que os utilizadores deste produto devem ser informados dos factos e circunstâncias seguintes.

"Este dispositivo está em conformidade com a parte 15 da FCC: A sua utilização está sujeita às duas condições seguintes: (1) Este dispositivo pode não causar interferências nocivas e (2) este dispositivo deve aceitar quaisquer interferências recebidas, incluindo interferências que possam causar um funcionamento indesejado."

"Este aparelho digital de classe B cumpre o regulamento canadiano ICES-003."

A seguinte declaração aplica-se aos produtos cobertos pelo presente manual, salvo indicação em contrário aqui especificada. A declaração para outros produtos aparecerá na documentação fornecida com os mesmos.

Nota: Este equipamento foi testado e cumpre os limites para os dispositivos digitais de classe B, em conformidade com a parte 15 das Regras FCC e cumpre todos os requisitos da norma canadiana ICES-003 sobre equipamentos causadores de interferências aplicável a aparelhos digitais. Estes limites destinam-se a proporcionar uma proteção razoável contra interferências prejudiciais numa instalação residencial. Este equipamento gera, utiliza e pode irradiar energia de radiofrequência e, se não for instalado e utilizado em conformidade com as instruções, pode causar interferências nocivas em comunicações via rádio. No entanto, não existe garantia de que não ocorrerá interferência numa determinada instalação. Se este equipamento causar interferências prejudiciais à receção de rádio ou televisão, o que pode ser determinado desligando e ligando o equipamento, recomenda-se que o utilizador tente corrigir a interferência, tomando uma ou mais das seguintes medidas:

- Reorientar ou relocalizar a antena de receção
- Aumentar o espaço entre o equipamento e o recetor
- Ligar o equipamento a uma tomada de um circuito elétrico diferente do circuito ao qual o recetor está ligado

Para obter ajuda, consulte o seu revendedor ou um técnico qualificado de TV/rádio.

14.2 Conformidade com a norma IEC EN 61326

O Rotor Gene-Q MDx cumpre os requisitos relativos a emissões de interferências e à imunidade a interferências descritos nas normas IEC 61326-1 e IEC 61326-2-6.

A QIAGEN GmbH Alemanha não se responsabiliza por interferências de rádio ou televisão causadas por modificações não autorizadas deste equipamento ou pela substituição ou ligação de outros cabos de ligação e equipamento que não os especificados pela QIAGEN GmbH, Alemanha. A correção das interferências causadas por tais modificações não autorizadas, substituições ou ligações será da responsabilidade do utilizador.

14.3 Declaração de conformidade

Nome e morada do fabricante legal

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
Alemanha

É possível solicitar uma declaração de conformidade atualizada aos Serviços de Assistência da QIAGEN.

14.4 Resíduos de equipamentos elétricos e eletrônicos (REEE)

Esta secção fornece informações sobre a eliminação de resíduos de equipamentos elétricos e eletrônicos pelos utilizadores.

O símbolo do contentor de lixo com rodas barrado com uma cruz (consultar abaixo) indica que este produto não deve ser eliminado com outros resíduos, devendo ser levado para uma instalação de tratamento aprovada ou para um ponto de recolha para reciclagem, de acordo com as leis e os regulamentos locais.

A recolha e reciclagem seletivas de resíduos de equipamentos eletrónicos no momento da eliminação contribuem para a preservação dos recursos naturais e garantem que o produto é reciclado de forma a proteger a saúde pública e o ambiente.



Mediante pedido, a reciclagem pode ser providenciada pela QIAGEN com um custo adicional. Na União Europeia, em conformidade com os requisitos específicos de reciclagem da diretiva REEE e nos casos em que um produto de substituição esteja a ser fornecido pela QIAGEN, é assegurada a reciclagem gratuita dos equipamentos eletrónicos com marcação REEE.

Para reciclar equipamento eletrónico, contacte o escritório de vendas da QIAGEN local para obter o formulário de devolução necessário. Uma vez recebido o formulário, o utilizador será contactado pela QIAGEN, que solicitará informações adicionais para agendar a recolha do resíduo eletrónico ou para facultar um orçamento individual.

14.5 Cláusula de responsabilidade

A QIAGEN estará isenta de quaisquer obrigações ao abrigo desta garantia no caso de reparações ou modificações realizadas por indivíduos que não pertençam à sua equipa, exceto nos casos em que a Empresa tenha dado o seu consentimento por escrito para realizar tais reparações ou modificações.

Todos os materiais substituídos ao abrigo desta garantia terão cobertura apenas durante o período da garantia original e nunca para além do prazo de validade original da garantia original, exceto se autorizado por escrito por um executivo da Empresa. Os dispositivos de leitura, de interface e software associado terão garantia apenas durante o período oferecido pelo fabricante original destes produtos. As representações e garantias feitas por qualquer pessoa, incluindo representantes da QIAGEN, que sejam inconsistentes ou que entrem em conflito com as condições desta garantia não serão vinculativas para a Empresa, exceto se produzidas por escrito e aprovadas por um executivo da QIAGEN.

14.6 Contrato de licença do software

1. Doravante, "Qiagen" refere-se à Qiagen GmbH e às suas empresas afiliadas, e "Software" significa os programas e os dados fornecidos neste suporte de dados físico (por exemplo, CD-ROM) ou pela Internet com estas condições. (Se tiver dúvidas sobre qualquer aspeto do presente contrato ou outras questões, envie um e-mail para support@qiagen.com.) O Software e a documentação que o acompanha foram inteiramente desenvolvidos com fundos privados. São fornecidos e licenciados como "software informático comercial".

2. Licença

A licença não confere nenhuma titularidade ou propriedade do Software e não constitui a venda de nenhum direito relativamente ao Software. A Qiagen concede-lhe uma licença não transferível e não exclusiva de acordo com as seguintes disposições:

2.1 Pode utilizar qualquer número de cópias do Software na sua organização, desde que o Software seja acessível para utilização apenas por funcionários na organização e desde que esta seja o proprietário atual de um instrumento Rotor-Gene Q. Disponibilizar este Software para utilização fora da sua organização constitui uma violação do presente contrato.

2.2 Apenas poderá efetuar cópias do Software conforme necessário para fins de cópia de segurança ou quando a cópia for um passo essencial na utilização autorizada do Software. Deve reproduzir em todas as cópias todos os avisos de direitos de autor do Software original. Em nenhuma circunstância poderá copiar o Software para qualquer painel de avisos, site da Internet ou sistema de distribuição público ou privado semelhante.

2.3 Não poderá disponibilizar o Software a terceiros sob a forma de presente, empréstimo ou aluguer.

2.4 Não poderá incorporar o Software ou qualquer parte do mesmo em programas ou sistemas informáticos desenvolvidos ou utilizados por si.

2.5 Não poderá utilizar ou criar ficheiros de dados ou outros ficheiros processados pelo Software (exceto se isso ocorrer durante o funcionamento normal do Software).

2.6 Não poderá desmontar, proceder a engenharia inversa, efetuar compilação inversa, desbloquear ou traduzir nenhuma parte do Software, ou tentar descobrir o código-fonte ou os algoritmos subjacentes do Software. Não poderá alterar nenhum dos ficheiros de dados ou outros ficheiros que compõem o Software (exceto se isso ocorrer durante o funcionamento normal do Software).

2.7 Caso se trate de uma versão de demonstração ou de teste do Software, está apenas autorizado a utilizá-lo para fins de avaliação e com as restrições descritas (como um limite de tempo, execuções limitadas ou outros limites). O Software poderá ou não tentar impor essas restrições, e, caso não o consiga fazer, isso não constitui uma licença para que vá além dessas restrições.

2.8 Concorde em obter qualquer chave de registo/licença necessária apenas junto da Qiagen ou de um distribuidor autorizado e em manter essa chave estritamente confidencial relativamente a terceiros.

3. Rescisão

3.1 Caso não cumpra os termos e as condições da presente licença, sem prejuízo de outros direitos, a Qiagen poderá cessar a presente licença.

3.2 No prazo de 7 dias após a rescisão da presente licença, terá de enviar para a Qiagen uma carta a atestar a destruição do original e de quaisquer cópias do Software, assim como a destruição de todas as cópias de qualquer chave de registo/licença. Poderá rescindir a presente licença em qualquer altura ao fornecer essa confirmação.

4. Garantia/responsabilidade limitada

4.1 A Qiagen oferece-lhe a garantia de que:

a) Se o Software for fornecido em CD-ROM, este estará isento de defeitos de material e de fabrico em condições de utilização normais durante um período de noventa dias após a data de compra. (Substituiremos gratuitamente qualquer CD-ROM defeituoso.)

b) Se utilizado corretamente, o Software estará substancialmente em conformidade com a documentação fornecida com o mesmo ou com outras especificações publicadas pela Qiagen durante um período de noventa dias após a data de compra.

4.2 A responsabilidade total da Qiagen e o recurso exclusivo do adquirente serão, segundo critério da Qiagen, uma compensação no valor de duzentos e cinquenta dólares americanos (250 \$) ou a substituição do Software que não cumprir a garantia limitada.

4.3 COM EXCEÇÃO DAS GARANTIAS FORNECIDAS NA SECÇÃO 4.1 ACIMA E NA MEDIDA DO PERMITIDO POR LEI, A QIAGEN NÃO FORNECE OUTRAS GARANTIAS RELATIVAMENTE AO SOFTWARE.

4.4 NA MEDIDA DO PERMITIDO POR LEI E SOB NENHUMA CIRCUNSTÂNCIA, TEORIA JURÍDICA, ATO ILÍCITO, CONTRATO OU OUTROS, A QIAGEN SERÁ RESPONSÁVEL PERANTE SI OU QUALQUER OUTRA PESSOA POR DANOS INDIRETOS, ESPECIAIS, ACIDENTAIS OU CONSEQUENTES DE QUALQUER TIPO, INCLUINDO, ENTRE OUTROS, DANOS POR PERDA DE REPUTAÇÃO, INTERRUPÇÃO LABORAL, FALHA OU AVARIA INFORMÁTICA, OU OUTROS DANOS OU PERDAS COMERCIAIS, MESMO QUE A QIAGEN TENHA SIDO INFORMADA DA POSSIBILIDADE DESSES DANOS. EM QUALQUER CASO, A RESPONSABILIDADE TOTAL DA QIAGEN AO ABRIGO DO PRESENTE CONTRATO ESTARÁ LIMITADA À TAXA DE LICENÇA PAGA POR SI PELO SOFTWARE. ESTA LIMITAÇÃO DE RESPONSABILIDADE NÃO SE APLICA À RESPONSABILIDADE POR MORTE OU LESÕES PESSOAIS, ATÉ AO LIMITE EM QUE A LEGISLAÇÃO APLICÁVEL PROÍBE ESSA LIMITAÇÃO.

15 Apêndice B – Técnicas matemáticas

Este apêndice descreve com mais detalhe as técnicas matemáticas utilizadas.

15.1 Quantificação

As concentrações calculadas são obtidas a partir de um modelo de regressão linear simples, com os valores conhecidos das concentrações logarítmicas (x) e os valores experimentais dos valores de CT (y).

As concentrações logarítmicas e os valores de CT dos padrões são utilizados para construir um modelo com a fórmula:

$$y = Mx + B$$

15.1.1 Intervalos de confiança para as concentrações calculadas

Utilizamos o intervalo de confiança seguinte $100(1 - \alpha)\%$ para uma estimativa de uma nova observação x_0 proveniente da curva-padrão.

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

Este é o intervalo de confiança para a concentração de um único desconhecido.

Imagine que agora temos observações posteriores em $x = x_0$ e representamos as suas médias por \bar{Y}_0 . Então,

$$\bar{Y}_0 \sim N(\beta_0 + \beta_1 x_0, \frac{\sigma^2}{k})$$

e raciocínios semelhantes ao anterior resultam em

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(\frac{1}{k} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

Esta fórmula mostra de que forma são determinados os intervalos de confiança para concentrações de réplicas de desconhecidos.

Para estimativas de padrões, pode ser obtido um intervalo de confiança menor:

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(\frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

A implicação desta fórmula é que a adição de réplicas a uma concentração individual padrão reduz a largura do intervalo para todas as estimativas, à medida que n aumenta. Adicionar um grande número de réplicas a um desconhecido reduz a sua incerteza até um único padrão. As réplicas adicionais reduzem a incerteza pois o desconhecido não faz parte do modelo linear.

15.1.2 Intervalos de confiança para os valores de CT

Supomos que o erro nos valores de CT replicados é linear e distribuído normalmente.

Por este motivo, utilizamos o intervalo de confiança t de uma amostra. Considere que μ representa o valor médio para valores de CT de uma réplica $(x_0 \dots x_{n-1})$. Assim, um intervalo de confiança de $100(1 - \alpha)\%$ para um μ do valor de CT é:

$$\left(\bar{x} - t_{\alpha/2, n-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}, \bar{x} + t_{\alpha/2, n-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

Gostaríamos de agradecer a Peter Cook do Departamento de Matemática da Universidade de Nova Gales do Sul (NSW), Sydney, Austrália, cuja ajuda foi preciosa para verificar as abordagens matemáticas utilizadas.

16 Informações de encomenda

16.1 Produtos, acessórios e consumíveis do Rotor-Gene Q MDx

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
Rotor-Gene Q MDx 5plex	Ciclador de real-time PCR com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim), computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia das peças e mão de obra	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Ciclador de real-time PCR e analisador de fusão de alta resolução com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim) e canal de HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia das peças e mão de obra	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex	Ciclador de real-time PCR com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmesim), incluindo computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia das peças e mão de obra	9002042
Acessórios		
Rotor-Disc 100 Starter Kit	O kit inclui: 2 packs Rotor-Disc 100, Rotor-Disc Heat Sealer, Rotor-Disc Heat Sealing Film, Rotor-Disc 100 Rotor e Locking Ring, Rotor-Disc 100 Loading Block, Rotor-Disc Pipetting Aid	Verificar
Rotor-Disc 100 (30)	30 discos embalados individualmente para 3000 reações	981311
Rotor-Disc 100 (300)	10 x 30 discos embalados individualmente para 30 000 reações	981313
Rotor-Disc 100 Rotor	Para conter os discos do Rotor-Disc 100 no Rotor-Gene Q MDx; é necessário o Rotor-Disc 100 Locking Ring	9018895
Rotor-Disc 100 Locking Ring	Para bloquear um Rotor-Disc 100 no Rotor-Disc 100 Rotor	9018896
Rotor-Disc 100 Loading Block	Bloco de alumínio para a configuração manual e automática da reação nos discos do Rotor-Disc 100	9018909

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
Rotor-Disc Pipetting Aid	Auxílio para a marcação correta na configuração manual da reação num Rotor-Disc Loading Block	9018897
Rotor-Disc Heat Sealer	Instrumento de selagem a quente para utilização com Rotor-Discs; é necessário Rotor-Disc 72 ou 100 Loading Block	9018898
Rotor-Disc Heat Sealing Film (60)	60 películas para selar os discos do Rotor-Disc 100 ou Rotor-Disc 72	981601
Rotor-Disc Heat Sealing Film (600)	10 x 60 películas para selar os discos do Rotor-Disc 100 ou Rotor-Disc 72	981604
Rotor-Disc 72 Starter Kit	O kit inclui: 3 packs Rotor-Disc 72, Rotor-Disc Heat Sealer, Rotor-Disc Heat Sealing Film, Rotor-Disc 72 Rotor e Locking Ring, Rotor-Disc 72 Loading Block, Rotor-Disc Pipetting Aid	Verificar
Rotor-Disc 72 (24)	24 discos embalados individualmente para 1728 reações	981301
Rotor-Disc 72 (240)	10 x 24 discos embalados individualmente para 17 280 reações	981303
Rotor-Disc 72 Rotor	Para conter os discos do Rotor-Disc 72 no Rotor-Gene Q MDx; é necessário o Rotor-Disc 72 Locking Ring	9018899
Rotor-Disc 72 Locking Ring	Para bloquear um Rotor-Disc 72 no Rotor-Disc 72 Rotor	9018900
Rotor-Disc 72 Loading Block	Bloco de alumínio para a configuração manual e automática da reação nos discos do Rotor-Disc 72	9018910
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 tiras de 4 tubos e tampas para 1000 reações	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos e tampas para 10 000 reações	981106
72-Well Rotor	Para conter Strip Tubes and Caps, 0.1 ml; é necessário um Locking Ring 72-Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Para bloquear Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, no 72-Well Rotor	9018904

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloco de alumínio para a preparação manual da reação com uma pipeta de canal único em 72 tubos de 0,1 ml	9018901
Loading Block 72 x 0.1 ml Multi-channel	Bloco de alumínio para a configuração da reação com uma pipeta multicanal de 72 tubos de 0,1 ml	9018902
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 tubos de paredes finas para 1000 reações	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 tubos de paredes finas para 10 000 reações	981008
36-Well Rotor	Para conter PCR Tubes, 0.2 ml; é necessário um 36-Well Rotor Locking Ring	9018907
36-Well Rotor Locking Ring	Para bloquear PCR Tubes, 0.2 ml, no 36-Well Rotor	9018906
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Bloco de alumínio para a configuração manual da reação num conjunto 8 x 12 padrão utilizando 96 tubos de 0,2 ml	9018905
Rotor-Disc OTV Kit	Kit para verificação ótica de temperatura dos sistemas Rotor-Gene, inclui um Rotor-Disc pré-carregado com cristais líquidos termocromáticos, introdutores de fluorescência; é necessário um Rotor-Disc 72 Rotor e Locking Ring ou Rotor-Disc 72 Starter Kit	981400
Rotor Holder	Suporte autónomo de metal para montar tubos e Rotor-Discs nos rotores	9018908

Para obter informações de licenciamento atualizadas e renúncias de responsabilidade específicas do produto, consulte o respetivo manual do utilizador ou manual do kit QIAGEN. Os manuais do utilizador e os manuais do kit QIAGEN estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados aos Serviços de Assistência da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

17 Histórico de revisões do documento

Data	Alterações
R1, fevereiro de 2022	Primeira edição

Contrato de Licença Limitada para o Rotor-Gene Q MDx

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto:

1. O produto deverá ser utilizado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com as presentes instruções de utilização e recorrendo à utilização exclusiva de componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede qualquer licença para utilizar ou incluir os componentes englobados neste kit com quaisquer componentes não incluídos neste kit, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, nas presentes instruções de utilização e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns dos referidos protocolos adicionais foram fornecidos por utilizadores QIAGEN para utilizadores QIAGEN. Os referidos protocolos não foram testados de forma exaustiva ou otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não assegura nem garante que os referidos protocolos não infringem os direitos de terceiros.
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este kit e respetivos componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, recondicionados ou objeto de revenda.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e o utilizador do kit concordam em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas judiciais e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de Licença Limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite www.qiagen.com

Marcas comerciais: QIAGEN®, Sample to Insight®, EpiTect®, HotStarTaq®, Rotor-Disc®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager®, Type-it® (Grupo QIAGEN); Adobe®, Illustrator® (Adobe Systems, Inc.); Alexa Fluor®, HEX™, JOE™, Marina Blue®, ROX™, SYBR®, SYTO®, TET™, Texas Red®, VIC® (Thermo Fisher Scientific ou as respetivas subsidiárias); CAL Fluor®, Quasar® (Biosearch Technologies, Inc.); Core™, Intel® (Intel Corporation); Cy® (GE Healthcare); EvaGreen® (Biotium, Inc.); Excel®, Microsoft®, Windows® (Microsoft Corporation); LC Green® (Idaho Technology, Inc.); LightCycler® (Roche Group); Symantec® (Symantec Corporation); TeeChart® (Steele Software SL); Yakima Yellow® (Nanogen, Inc.). Os nomes registados, as marcas comerciais etc. utilizados neste documento, mesmo quando não assinalados especificamente como tal, não devem ser considerados como não protegidos por lei. Os nomes registados, as marcas comerciais etc. utilizados neste documento, mesmo quando não assinalados especificamente como tal, não devem ser considerados como não protegidos por lei.

TeeChartOffice: Copyright 2001-2013 por David Berneda. Todos os direitos reservados.

Para os países aplicáveis:

Este termociclador em tempo real está licenciado nos termos dos direitos de patente dos EUA para aparelhos ou sistemas que abrangem os termocicladores automáticos com detetores de fluorescência e solicitando prioridade para o n.º de série 07/695.201 dos EUA e respetivas reivindicações em qualquer patente equivalente estrangeira propriedade da Applied Biosystems LLC, em todas as áreas, incluindo pesquisa e desenvolvimento, todas as áreas aplicadas e diagnóstico in vitro de animais e humanos. Nenhum direito é veiculado, explícito, implícito ou de preclusão, para qualquer patente sobre métodos em tempo real, incluindo, entre outros, os ensaios de nuclease 5', ou qualquer patente que reivindique um reagente ou kit. Para obter mais informações sobre direitos de compra adicionais, contacte o Diretor de Licenciamento através da morada Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, Califórnia, 94404, EUA.

Para os países aplicáveis:

A compra deste produto inclui uma licença limitada e intransferível para uma ou mais patentes dos EUA n.º 6.787.338; 7.238.321; 7.081.226; 6.174.670; 6.245.514; 6.569.627; 6.303.305; 6.503.720; 5.871.908; 6.691.041; 7.387.887; 7.273.749; 7.160.998; pedidos de patente dos EUA n.º 2003-0224434 e 2006-0019253, e pedido de patente PCT n.º WO 2007/035806, assim como todas as continuações e divisões e respetivas reivindicações de patentes e pedidos de patente fora dos Estados Unidos, propriedade da University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., Evotec Biosystems GmbH e/ou Roche Diagnostics GmbH exclusivamente para diagnóstico in vitro de animais ou humanos. Nenhum direito é veiculado, explícito, implícito ou de preclusão, para qualquer kit ou reagente, ou ao abrigo de qualquer outra patente ou reivindicação de patentes, propriedade da University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., Roche Diagnostics GmbH ou por qualquer outra Parte. Este produto deve ser utilizado apenas com reagentes autorizados, como os ensaios e kits da QIAGEN totalmente autorizados. Para obter informações sobre a compra de licenças para aplicações de diagnóstico in vitro ou reagentes, contacte Roche Molecular Systems, 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, CA 94588, EUA.

HB-3090-001 02/2022 © 2022 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Encomendas www.qiagen.com/contact | Assistência técnica support.qiagen.com | Site www.qiagen.com