Září 2016

artus® Mycobac. diff. LC PCR Kit Uživatelská příručka

Verze 1

Kvantitativní in vitro diagnostika

Pro použití s přístroji LightCycler® 1.1/1.2/1.5 a LightCycler 2.0

IVD

CE

REF 4556063 (24 reakcí)
4556065 (96 reakcí)

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
GERMANY

R4 MAT 1046963CS

Obsah

Souhrn a vysvětlení 4

Princip 4

Dodávané materiály 6

Obsah soupravy 6

Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky 7

Varování a bezpečnostní upozornění 8

Upozornění 8

Skladování a manipulace s činidly 8

Postup 9

Důležité body před zahájením 9

Izolace DNA 10

Interní kontrola 12

Kvantifikace 12

Příprava PCR 13

Programování přístroje LightCycler 16

Programování přístroje LightCycler 1.1/1.2/1.5 16

Programování přístroje LightCycler 2.0 19

Interpretace výsledků 22

Analýza PCR dat ze stroje LightCycler 1.1/1.2/1.5 22

Analýza PCR dat ze stroje LightCycler 2.0 25

Řešení problémů 30

Kontrola kvality 33

Omezení 33

Funkční charakteristiky 34

Analytická senzitivita 34

Specifita 35

Přesnost 38

Robustnost 40

Reprodukovatelnost 40

Reference 41
Symboly 41

Souhrn a vysvětlení

Tuberkulóza (TB) je stále jednou z nejvíce infekčních chorob na světě. Asi dvě miliardy lidí, tedy jedna třetina světové populace, je infikována bakterií *Mycobacterium tuberculosis*, původcem TB. Celosvětová incidence TB je kolem osmi miliónů a téměř tři miliony lidí na ni zemře každý rok. I přesto, že jsou postiženy zejména rozvojové země, nemoc TB se opakovaně objevuje i v industrializovaných zemích, zejména z důvodu imigrace infikovaných lidí a vzniku rezistence TB na léky. Menšiny, jako jsou bezdomovci, uživatelé drog a osoby s oslabenou imunitou jsou postiženi více.

TB je chronické, cyklické onemocnění, postihující zejména plíce a spádové lymfatické uzliny. Zda může bakterie *M. tuberculosis* kolonizovat ostatní orgány, záleží zejména na stavu imunitního systému pacienta. TB je primárně přenášena z osoby na osobu pomocí kapénkové infekce. Pouze lidé s otevřenou formou jsou infekční. Zejména u lidí s imunosupresí může být bakterie *M. tuberculosis* reaktivována , dokonce několik let po primární infekci.

Mycobacterium avium a *Mycobacterium intracellulare* jsou environmentální bakterie, které lze nalézt ve vodě a v půdě. Na rozdíl od infekce *M. tuberculosis*, lidé mohou být infikováni *M. avium* a *M. intracellulare* pomocí kontaminované pitné vody, nebo jídla. Přenos z člověka na člověka je velice nepravděpodobný. U imunitně kompetentních lidí bývá infekce *M. avium* a *M. intracellulare* obvykle asymptomatická, zatímco u osob s oslabenou imunitou, zejména u pacientů infikovaných HIV, může nastat masivní šíření bakterie po celém těle. Tento stav je obvykle fatální.

Princip

Diagnóza patogenu pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) je založena na amplifikaci specifické oblasti genomu patogenu. Při PCR v reálném čase, je amplifikovaný produkt detekován fluorescenčními barvivy. Ty jsou obvykle spojeny s oligonukleotidovými sondami, které se specificky váží k amplifikovanému produktu. Sledováním intenzity fluorescence v průběhu běhu PCR (v reálném čase) umožní detekci a kvantifikaci akumulujícího se produktu bez toho, aby bylo nutné znovu otevřít reakční zkumavku po proběhlém PCR běhu (1).

artus Mycobac. diff. LC PCR Kit představuje okamžitě použitelný systém pro detekci DNA všech zástupců komplexu *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. pinnipedii*) stejně tak zástupců komplexu *M. avium* (*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *hominissuis* and *M. intracellulare*) při použití polymerázové řetězové reakce (PCR) na přístroji LightCycler. Mycobac. diff. LC Master obsahuje reagencie a anzymy pro specifickou amplifikaci 163 bp velké oblasti

mycobacteriálního genomu a přímou detekci specifických amplikonů přístroji LightCycler 1.1/1.2/1.5 nebo LightCycler 2.0. *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit, navíc obsahuje druhý heterologní amplifikační systém, sloužící k detekci možné inhibice PCR.

	Výběr fluorescenčních kanálů	
PCR product	**Přístroj LightCycler 1.1/1.2/1.5**	**Přístroj LightCycler 2.0**
komplex *M. tuberculosis*/*M. avium*	**F2/Back-F1**	**640/Back 530**
Mycobac. diff LC IC	**F3/Back-F1**	**705/Back 530**

Amplifikace a detekce této interní kontroly (IC) nesnižuje detekční limit PCR, analyzovaného komplexu *M. tuberculosis*/ *M. avium* (viz “Analytická senzitivita” strana 34).

Pro rozlišení komplexu *M. tuberculosis* od odlišných poddruhů *M. avium* a od *M. intracellulare*, systém využívá specifické teploty tání sond V kroku tání křivky je detekován signál, ve flourescenčním kalále **F2** nebo **640,** pro zástupce komplexu *M. tuberculosis* při 60°C, pro všechny *M. avium* poddruhy při 63.5°C a pro *M. intracellulare* při 55°C. Rozdíly mezi přístroji LightCycler mohou způsobovat odchylku v bodu tánív rozmezí 1–2°C. Nicméně tato odchylka je stejná pro všechny 3 body tání. Odlišné podmínky extrakce a činidla mohou způsobit nepatrné odchylky v bodu tání vzorku a kontrol dodávaných v soupravě. PCR by měla být opakována, jestliže odchylka mezi bodem tání analyzovaného vzorku a kontroly je vetší 1°C.

Externí pozitivní kontroly (M. avium LC Control, M. intracellulare LC Control) jsou dodávány za účelem detekce všech poddruhů *M. avium* *M. intracellulare*. Souprava obsahuje kvantifikační standardy M. tuberculosis (M. tuberculosis LC QS 1–4), které umožní určit patogenní nálož komplexu *M. tuberculosis.* Pro další informace nalistujte oddíl “**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**Kvantifikace ” strana 12.

Dodávané materiály

Obsah soupravy

***artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit** **Katalogové číslo** **Počet reakcí**			**4556063** **24**	**4556065** **96**
Barva uzávěru	**Název činidla**	**Symbol**	**Množství**	**Množství**
Modrá	Mycobac. diff. LC Master		2 x 12 reakcí	8 x 12 reakcí
Žlutá	Mycobac. diff. LC Mg-Sol*	Mg-Sol	1 x 400 µl	1 x 400 µl
Červená	M. tuberculosis LC QS† 1 (5×10^4 kopií/µl)	QS	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	M. tuberculosis LC QS 2 (5×10^3 kopií/µl)	QS	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	M. tuberculosis LC QS 3 (5×10^2 kopií/µl)	QS	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	M. tuberculosis LC QS 4 (5×10^1 kopií/µl)	QS	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	M. avium LC Kontrola		1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	M. intracellulare LC Control		1 x 200 µl	1 x 200 µl
Zelená	Mycobac. diff LC IC‡	IC	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl
Bílá	Voda („PCR grade“)		1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

* Mg-Sol: Roztok hořčíku.

† QS: Kvantifikační standard

‡: IC: Interní kontrola

Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

Důležité: Ujistěte se, zda použité přístroje byly zkontrolovány a zkalibrovány v souladu se všemi doporučeními výrobce.

- Jednorázové rukavice bez pudru
- DNA izolační souprava (viz “izolace Izolace DNA ,” strana 10)
- Lysozyme mix (viz “izolace Izolace DNA ,” strana 10)
- Nastavitelné pipety
- Sterilní špičky s filtrem
- Vortex
- Nastavitelný termoblok, schopný nastavovat teplotu od 37°C do 95°C
- Stolní centrifuga s rotorem na 2 ml reakční zkumavky
- Color Compensation Set (Roche Life Science, kat. č. 12 158 850 001) na instalaci souboru Crosstalk Color Compensation přístroje LightCycler 1.1/1.2/1.5 nebo přístroje LightCycler 2.0
- LightCycler Multicolor Demo Set (Roche Life Science, kat. č. 03 624 854 001) pro přístroj LightCycler 2.0
- LightCycler Capillaries (20 µl)
- LightCycler Cooling Block
- LightCycler 1.1/1.2/1.5 (verze sofwaru 3.5) nebo LightCycler 2.0 (verze sofwaru 4.0) Instrument
- LightCycler Capping Tool

Varování a bezpečnostní upozornění

Uživatel by měl vždy dbát na následující:

- Používat sterilní špičky s filtrem.
- Skladovat a extrahovat pozitivní materiál (vzorky, kontroly a amplikony) od všech ostatních činidel other reagents and a přidávat je do reakčního mixu v prostorově odděleném zařízení.
- Důkladně rozmrazit veškeré komponenty soupravy při pokojové teplotě
- Po rozmrazení veškeré komponenty důkladně promícha a zcentrifugovat
- Pracovat s komponenty rychle, umístěncýh na ledu nebo na LightCycler Cooling Block.

Upozornění

Informace, týkající se bezpečnosti *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit, najdete v příslušném bezpečnostním listu (SDSs). Bezpečnostní listy (SDSs) jsou dostupné online v PDF formátu na **www.qiagen.com/safety**.

Skladování a manipulace s činidly

Skladujte všechny součásti soupravy *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit při teplotách v rozmezí –15 až –30°C. Všechny součásti soupravy jsou stabilní do data expirace, uvedeného na štítku. Nerozmrazujte a opětovně nezamrazujte více než dvakrát, neboť by to mohlo snížit spolehlivost testu. Jestliže mají být činidla soupravy použita opakovaně, rozalikvotujte je a zamrazte. Nenechávejte složky soupravy ve 4 °C déle než 5 hodin.

Postup

Důležité body před zahájením

- Použití carrier RNA je nezbytné pro účinnou extrakci, což ovlivňuje výtěžek DNA/RNA. Jestliže použitá izolační souprava neobsahuje carrier RNA, doporučujeme přidání carrier (RNA Homopolymer Poly[rA]) do nebuněčných tělních tekutin a do materiálů s nízkým obsahem DNA/RNA (např. CSF).
- Rozsuspendujte lyofilizovanou carrier RNA použitím elučního pufru (nepoužívejte lyzační pufr) z izolační soupracy (např. Buffer AE ze soupravy QIAamp® DNA Mini Kit) a připravte ředění o koncentraci 1 µg/µl. Rozdělte roztok carrier RNA do do vhodného počtu alikvotů a zamrazte je a skladujte při –20°C. Vyhněte se opakovanému rozmrazování (> 2x) alikvotů carrier RNA.
- Použijte 1 µg carrier RNA na 100 µl lyzačního pufru. Například, jestliže extrakční protokol navrhuje 200 µl lyzačního pufru, přidejte 2 µl carrier RNA (1 µg/µl) přímo do lyzačního pufru. Před začátkem každé extrakce, smíchejte lyzační pufr, carrier RNA a interní kontrolu (viz “Interní kontrola” strana 12). Tato směs by měla být připravena čerstvá, podle následujícího schématu:

	Počet vzorků	
Činidlo	**1**	**12**
Lysis buffer	např., 200 µl	např., 2400 µl
Carrier RNA (1µg/µl)	2 µl	24 µl
Mycobac. diff. LC IC	10 µl	120 µl
Celková objem	**212 µl**	**2544 µl**
Extrakční objem	**200 µl**	**each 200 µl**

- Použijte **okamžitě** čerstvě připravenou směs lyzačního pufru a carrier RNA k extrakci. Skladování směsi není možné.
- Jestliže používáte izolační protokol, který zahrnuje promývací pufry s ethanolem, proveďte ještě dodatečnou centrifugaci (3 minuty, 13,000 rpm) před krokem eluce, aby jste odstranily zbytek ethanolu. To zabrání možné inhibici PCR.
- Souprava *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit by neměla být používána s izolací založenou na ethanolu.

- **Důležité**: Interní kontrola *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit se používá přímo během procesu izolace (viz “Interní kontrola” strana 12**Fehler! Textmarke nicht definiert.**).

Izolace DNA

Před izolací DNA, vzorky s vellkým objemem nebo silně kyselé vzorky, musejí být nejprve zakoncentrovány nebo zneutralizovány. Pro analýzu sputa doporučujeme dekontaminaci NALC-NaOH; žaludeční šťávy by měly být neutralizovány fosfátovým pufrem. Po závěrečné centrifugaci může být sedlina bakterií použita pro následnou izolaci DNA.

Různí výrobci nabízejí DNA izolační soupravy. Množství vzorku, použité v izolačním procesu závisí na příslušném protokolu. Proveďte izolaci DNA podle podle doporučení výrobce. QIAGEN doporučuje následující izolační soupravy:

Materiál vzorku	Izolační souprava nukleových kyselin	Katalogové číslo	Výrobce	Carrier RNA
Hlen, BAL, bronchiální sekret, CSF, žaludeční šťáva, punktát peritonea	QIAamp® DNA Mini Kit (50)	51304	QIAGEN	není zahrnuta

Důležité: Následujte instrukce v “Příloze D: Protokoly pro bakterie” popsáno v příručce soupravy *QIAamp DNA Mini and Blood Mini.* Zajistěte efektivní a nekontaminovanou lýzy mycobacterií, doporučujeme tyto pozměňující kroky u QIAamp DNA Mini Kit v dodatkového protokolu.

Vždy dávejte pozor na následující, aby bylo zabráněno křížové kontaminaci během lýzy bakterií.:

- Je nezbytné použití zkumavek se šroubovacím uzávěrem.
- Šroubovací uzávěr zkumavky musí být vždy důkladně uzavřen.
- Po každém kroku inkubace, krátce zcentrifugujte zkumavky, aby došlo k odstranění kapek z uzávěru.
- Nedotýkejte se vnitřní strany uzávěru. Jestliže se dotknete, okamžitě si vyměňte potenciálně kontaminované rukavice.
- Není doporučeno používat vodní lázeň.

- Ujistěte se, že vzorky zchladly na pokojovou teplotu po kroku zahřívání na 95°C. V opačném případě hrozí vysoké riziko kontaminace aerosolem po otevření .

Vždy dávejte pozor na následující, aby bylo zabráněno křížové kontaminaci během procesu izolace DNA:

Ujistěte se zda není vlhký okraj okolo kolonky QIAamp spin column.

- Nedotýkejte se vnitřní strany uzávěru kolonky QIAamp spin column. Jestliže se dotknete, okamžitě si vyměňte potenciálně kontaminované rukavice.
- Nepoužívejte jednu špičku pipety u různých vzorků ani tehdy, kdy aplikujete promývací pufry AW1 a AW2 nebo eluční pufr AE. To zabraňuje křížové kontaminaci mezi vzorky a kontaminaci pufrů.
- Používejte jednotlivé sběrné 2 ml mikrozkumavky pouze jednou. Jestliže vám tyto zkumavky dojdou, můžete použít 2 ml mikrocentrifugační zkumavky, přičemž uzávěry musejí být předtím odstraněny.

Důležité: Všechny pipetovací kroky před inkubací na 95°C musejí být prováděny v bezpečnostním boxu třídy II, protože vzorky jsou potenciálně infekční.

1. Přeneste zhruba 250 µl až 500 µl NALC-NaOH–dekontaminovaného vzorku do 1.5 ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem.
2. Centrifugujte ve stolní centrifuze po dobu 10 minut při 17,000 x *g* (13,000 rpm).
3. Pipetováním opatrně odstraňte supernatant.
4. Přidejte 180 µl směs lysozymu (20 mg/ml lysozym; 20 mM Tris-HCl (pH 8.0); 2 mM EDTA; 1.2% Triton™) a pipetováním rozsuspendujte pelet..
5. Inkubujte po dobu nejméně 1 hodiny při 37°C v topném bloku.
6. Krátce zcentrifugujte aby jste odstranily kapky z uzávěru zkumavky.
7. Přidejte 20 µl Proteinase K a 200 µl AL buffer s přidaným carrier RNA (2 µg RNA Homopolymer Poly[rA], není součástí soupravy QIAamp DNA Mini Kit, na 200 µl AL buffer) a 10 µl interní kontroly (viz “Interní kontrola“ strana 12).
8. Důkladně zvortexujte.
9. Inkubujte po dobu 30 minutes při 56°C v topném bloku.
10. Krátce zcentrifugujte aby jste odstranily kapky z uzávěru zkumavky.
11. Inkubujte 15 minut při 95°C.
    Důležité: Nepřesahujte inkubační dobu, může to způsobit degradaci DNA .
12. **Poznáka**: Po ukončení inkubace vzorků při 95°C, nejsou již tyto vzorky infekční .Nechte vzorky zchladnout na pokojovou teplotu.
13. Krátce zcentrifugujte aby jste odstranily kapky z uzávěru zkumavky.

14. Přejděte na “Protokol: DNA Purification from Tissues” v příručce *QIAamp DNA Mini and Blood Mini* (Třetí vydání, Červen 2012) začínající přidáním ethanolu v kroku 6 a proveďte finální eluci při použití 100 µl Buffer AE.

Interní kontrola

Interní kontrola (Mycobac. diff. LC IC) je dodávána. To umažňuje uživateli kontrolovat jak proces izolace DNA, tak i kontrolu možné inhibice PCR (viz Obrázek 1). Za tímto účelempřidejte interní kontrolu do izolace v poměru 0.1 µl na 1 µl elučního objemu. Například, při použití QIAamp DNA Mini Kit, DNA je elulována do 100 µl Buffer AE. Na začátku tedy přidejte 10 µl interní kontroly. Objem interní kontroly je závislý na elučním objemu. Použití 10 µl je validní pro eluční objem 100 µl (0.1 µl na 1 µl elučního objemu). Interní kontrola a carrier RNA (viz “izolace Izolace DNA ,” strana 10) by měla být přidána do směsi lyzačního pufru a materiálu vzorku nebo přímo do lyzačníhi pufru.

Interní kontrola nesmí být přidána přímo do materiálu vzorku. V případě, že je přidána do lyzačního pufru, vězte že směs interní kontroly a lyzčního pufru/carrier RNA by měla být připrvena čerstvě a ihned použita. Skladování směsi při pokojové teplotě, nebo při 4°C i jen několik hodin, může vést k selhání interní kontroly a snížení účinnosti extrakce. Nepřidávejte přímo interní kontrolu a carrier RNA do materiálu vzorku.

Kvantifikace

Přiložené kvantifikační standardy (M. tuberculosis LC QS 1–4) jsou zpracovány stejně jako předchozí purifikované vzorky a používá se stejný objem (5 µl). Pro vytvoření standardní křivky na přístroji LightCycler, by měly být všechny čtyři kvantifikační standardy použity následujícím způsobem:

- Přístroj LightCycler 1.1/1.2/1.5

  Definujte M. tuberculosis LC QS 1–4 na obrazovce **Sample Loading** jako standardy se the specifickou concentrací (viz *LightCycler Uživatelský manuál*, Veze 3.5, Kapitola B, 2.4. “Data vstupního vzorku”).

- Přístroj LightCycler 2.0

  Pro definici standardů, aktivujte funkci **Analysis Type** v menu okna **Samples** a zvolte **Absolute Quantification**. Nyní můžete definovat the M. tuberculosis LC QS 1–4 jako standardy a zadat odpovídající koncentrace pro každý standard (viz *LightCycler Uživatelský manuál*, Verze 4.0, Kapitola 2.2, “Zadávání informací o vzorku”). Ujistěte se zda funkce **Enable Controls** není aktivována. V opačném případě výběr možností analýzy pro analýzu dat je značně omezena. (viz “Analýza PCR dat ze stroje LightCycler 2.0 ,” strana 25).

Generování standardní křivky, jak je popsáno v postupu výše, může být použito i v následujících bězích, za předpokladu, že za předpokladu, že alespoň 1 standard 1 koncentraci byl použit v současném běhu. Pro tyto účely je nutné importovat, v předchozím běhu vygenerovanou standardní křivku (viz *LightCycler Uživatelský manuál*, Verze 3.5, Kapitola B, 4.2.5. “Kvantifikace s externí standardní křivkou”; nebo Verze 4.0, Kapitola 4.2.2, “Ukládání standrdní křivky”). Nicméně tato kvantifikační metoda může vést k odchylce ve výsledcích, díky variabilitě mezi PCR běhy.

Kvantifikační standardy jsou definovány jako počet kopií/µl. Následující rovnice musí být použita k převodu hodnot stanovených standrdní křivkou, na počet kopií/ml materiálu vzorku:

$$\text{Výsledky (kopie/ml)} = \frac{\text{Výsledek (kopie/µl) x Eluční objem (µl)}}{\text{Objem vzorku (ml)}}$$

Ve skutečnosti by měl být počáteční objem vzorku zapsán do výše uvedené rovnice. Je nutné zvážit změny objemu vzorku před zahájením izolace (např. zmenšení objemu centrifugací, nebo zvýšení objemu vzorku na požadované množství).

Důležité: Příručka pro kvantitativní analýzu artus systémů na přístrojích LightCycler 1.1 / 1.2 / 1.5 nebo LightCycler 2.0 jsou uvedeny v následujících:

Technická poznámka: Kvantifikace počtu kopií patogena při použití přístroje LightCycler 1.1/1.2/1.5.

www.qiagen.com/gb/resources/resourceLC1

Kvantifikace počtu kopií patogena při použití CE-IVD artus *LC PCR Kits a přístroje LightCycler 2.0.*

www.qiagen.com/gb/resources/resourceLC2

Příprava PCR

Ujistěte se že chladící blok a stejně tak adaptéry kapilár (příslušenství přístroje LightCycler) jsou předchlazeny na 4°C. Vložte požadovaný počet LightCycler kapilár do adaptérů chladícího bloku. Ujistěte se, že alespoň jeden kvantifikační standard a/nebo pozitivní kontrola (M. avium LC Control, M. intracellulare LC Control), stejně tak negativní kontrola (voda, PCR „grade“) je zahrnuta v každém PCR běhu. Pro tvorbu standardní křivky, použijte všechny dodávané kvantifikační standardys (M. tuberculosis LC QS 1–4pro každý PCR běh. Před každým použitím, je nutné všechny činidla kompletně rozmrazit a důkladně promíchat (opakovaným pipetováním nebo rychlým vortexováním) a následně rychle centrifugovat.

Ke sledování izolační procedury DNA a kontrolování možní inhibice PCR, slouží interní kontrola , která byla přidána do izolace (viz “**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**Interní kontrola ” strana 12).

Použijte následující pipetovací schéma (schamtické znázornění, viz Obrázek 1):

		Počet vzorků	
		1	**12**
Příprava Master Mixu	Mycobac diff. LC Master	13 µl	156 µl
	Mycobac. diff. LC Mg-Sol	2 µl	24 µl
	Celkový objem	**15 µl**	**180 µl**
Příprava PCR assaye	Master Mix	15 µl	15 µl každý
	Vzorek	5 µl	5 µl každý
	Celkový objem	**20 µl**	**20 µl each**

1. Napipetujte 15 Master Mixu do plastového rezervoáru každé kapiláry.
2. Přidejte 5 µl elulovaného vzorku DNA. Odpovídajícím způsobem přidejte 5 µl, alespoň jednoho kvantifikačního standardu (M. tuberculosis LC QS 1–4) nebo pozitivní kontroly (M. avium LC Control, M. intracellulare LC Control) musí být použity jako pozitivní kontrola a 5 µl vody voda, PCR „grade“) jako negativní kontrola.
3. Zavřete kapiláry.
4. Pro přenos směsi z plastového rezervoárudo kapiláry, centrifugujte adaptéry obsahující kapiláry ve stolní centrifuze po dobu 10 sekund a při maximálních otáčkách 400 x *g* (2,000 rpm).

Obrázek 1. Schematické znázornění pro kontrolu purifickační procedury a PCR inhibice.

* Ujistěte se, zda veškeré komponenty byly rozmraženy, důkladně promíchejte a krátce centrifugujte.

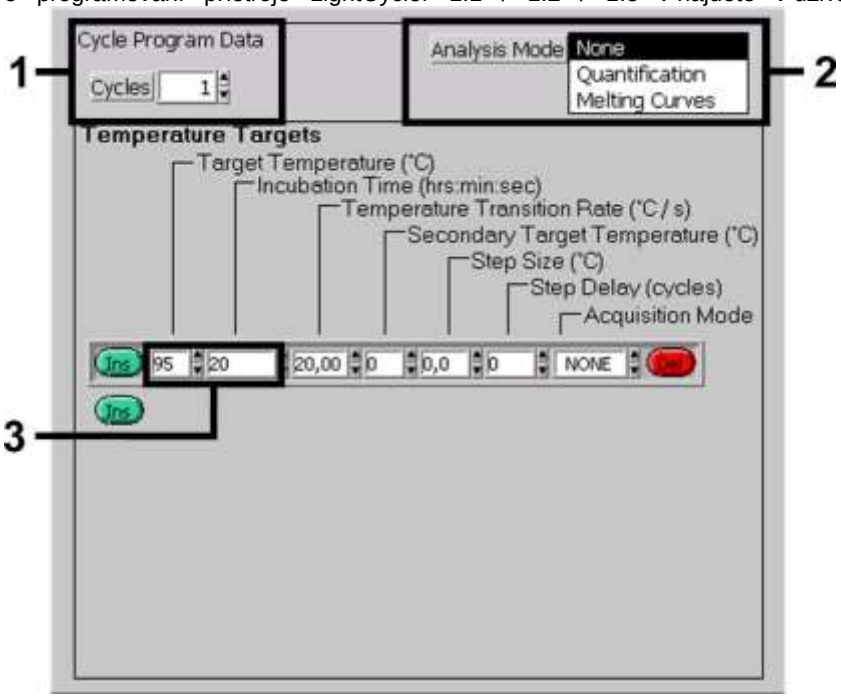
Programování přístroje LightCycler

Programování přístroje LightCycler 1.1/1.2/1.5

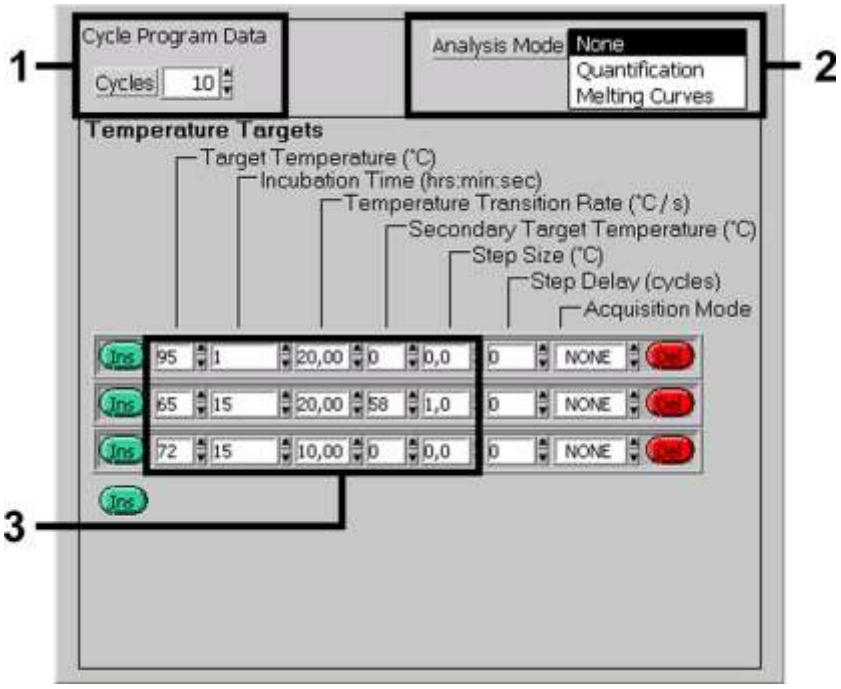
Pro detekci DNA zástupců komplexu *M. tuberculosis* a komplexu *M. avium,* vytvořte teplotní profil na vašem stroji LightCycler 1.1/1.2/1.5 podle následujících 5 kroků (viz Obrázky 2–6).

Počáteční aktivace Hot Start enzymu	**Obrázek 2**
„Touch down“ krok	**Obrázek 3**
Amplifikace DNA	**Obrázek 4**
Křivka tání	**Obrázek 5**
Chlazení	**Obrázek 6**

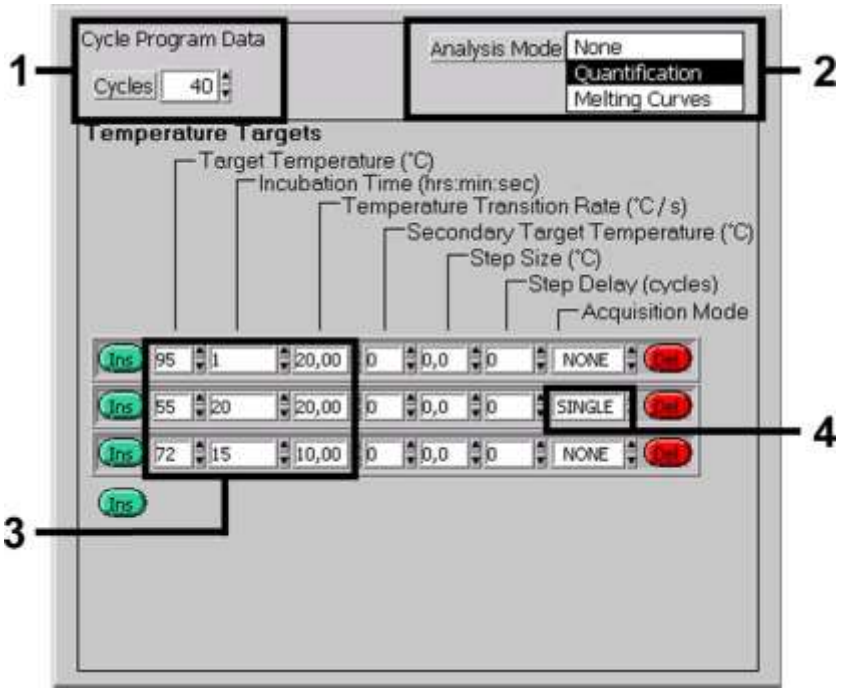
Věnujte zvláštní pozornost nastavování **Analysis Mode**, **Cycle Program Data** a **Temperature Targets**. Na obrázcích jsou tato nastavení zarámované tučným černým písmem. Bližší informace o programování přístroje LightCycler 1.1 / 1.2 / 1.5 v najdete v uživatelské příručce.



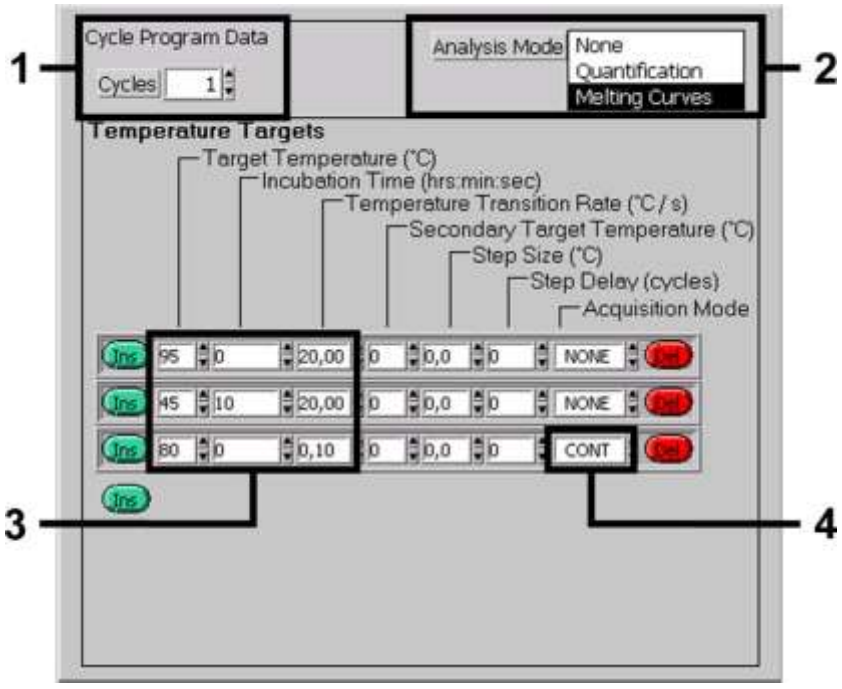
Obrázek 2. Počáteční aktivace Hot Start enzymu.



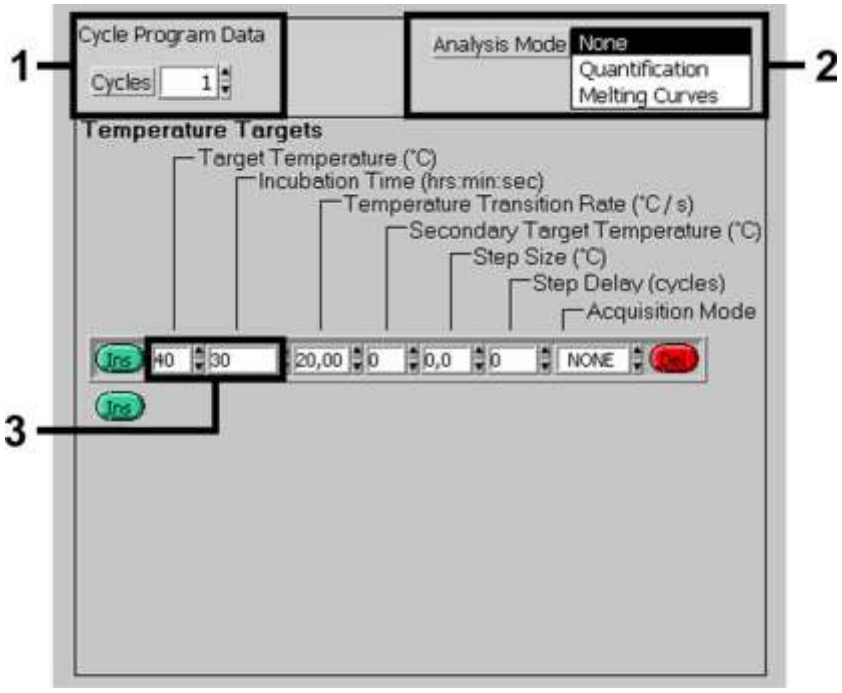
Obrázek 3. „Touch down“ krok.



Obrázek 4. Amplifikace DNA.



Obrázek 5. Křivka tání



Obrázek 6. Chlazení

Programování přístroje LightCycler 2.0

1. Pro programování PCR běhu na stroji LightCycler 2.0, aktivujte volbu **New...** v hlavním menu a vyberte **LightCycler Experiment**.
2. **Důležité**: Nejprve zadejte počet připravenýchkapilár pro tento PCR běh (**Max. Seek Pos.**, viz [1] na Obrázek 7).
3. Pro detekci DNA členů komplexu *M. tuberculosis* a komplexu *M. avium,* vytvořte teplotní profil na vašem stroji LightCycler 2.0 podle 5 kroků, uvedených v následující tabulce.

Program	Cíl [°C]	„Hold“ [hh:mm:ss]	rychlost snižování [°C/s]	Sek.cíl	Velikost kroku [°C]	Zpoždění kroku [cykly]	Režim snímání	Cykly	Mód analýzy
Aktivace	95	00:00:20	20	0	0	0	None	1	None
„Touch down“	95	00:00:01	20	0	0	0	None	10	None
	65	00:00:15	20	58	1	0	None		
	72	00:00:15	10	0	0	0	None		
Amplifikace DNA	95	00:00:01	20	0	0		None	40	Kvantifikace
	55	00:00:20	20	0	0		Single		
	72	00:00:15	10	0	0		None		
Křivka tání	95	00:00:00	20	0	0		None	1	Křivky tání
	45	00:00:10	20	0	0		None		
	80	00:00:00	0.1	0	0		Cont.		
Chlazení	40	00:00:30	20	0	0	0	None	1	None

4. Pro zadání specifikací vzorku, aktivujte tlačítko **Samples**.
5. V okně **Capillary View**, zdejte nejprve počet plánovaných PCR preparátů v PCR běhu (**Sample Count**).
6. Pojmenujte vzorky v nabídce **Sample Name**.

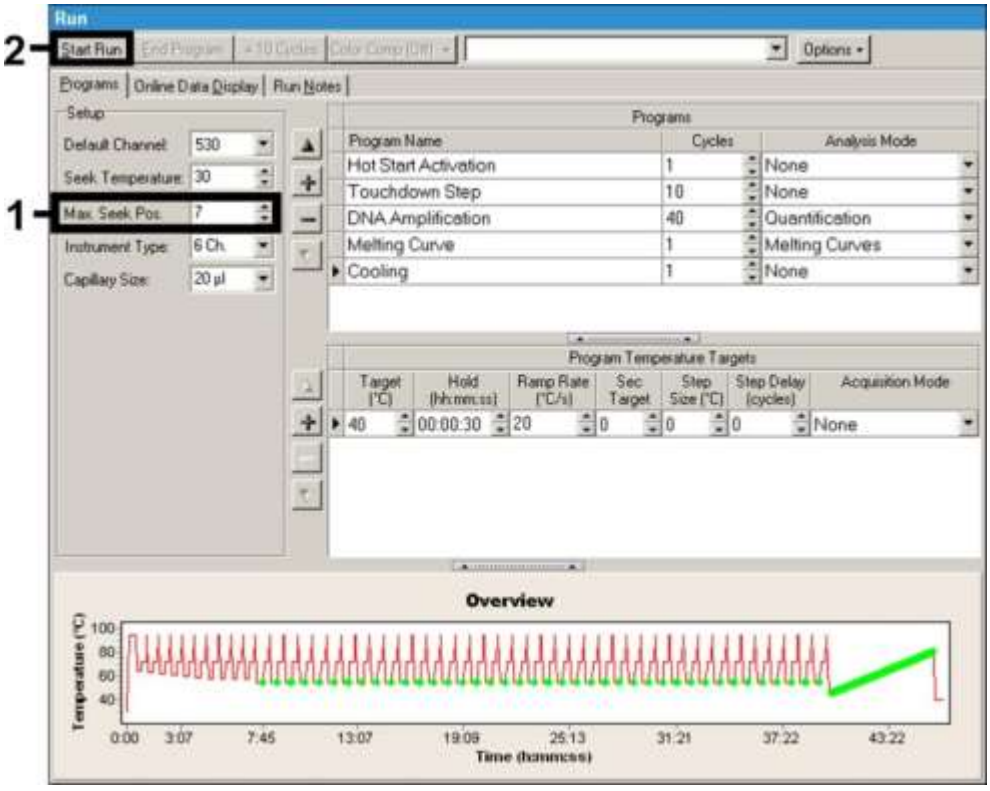
7. V nabídce **Selected Channels,** vyberte fluorescenční kanál **640** pro detekci analyzovaného PCR komplexu *M. tuberculosis*/*M. avium*.
8. V nabídce **Selected Channels,** vyberte fluorescenční kanál **705** pro detekci interní kontroly PCR
9. Pro definici standardů a přiřazení příslušných koncentrací, vyberte volbu **Absolute Quantification** v nabídce **Analysis Type** (viz “Kvantifikace“ strana 12**Fehler! Textmarke nicht definiert.**).

   Ujistěte se, že funkce **Enable Controls** není aktivována. V opačném případě je omezen výběr možností analýzy pro analýzu dat. (Režim **Fit Points** není dostupný; viz “Analýza PCR dat ze stroje LightCycler 2.0 ,” strana 24).
10. V nabídce **Target Name**, přiřadte cílovou sekvenci, která má být detekována (komplex *M. tuberculosis*/*M. avium*) ve zvoleném fluorescenčním kanále **640**.
11. V nabídce **Target Name**, přiřadte přiřadte cílovou sekvenci, která má být detekována (interní kontrola) ve zvoleném fluorescenčním kanále **705**.
12. Dokončení sloupce **Target Name** může být usnadněno funkcí **Auto Copy...**.

    Chcete-li definovat **Target Name** pomůže Vám to získat lepší přehled, nicmémě není to striktně vyžadováno pro analýzu dat.
13. K vytvoření standardní křivky analýzy dat, definujte kvantifikační standardy s příslušnými koncentracemi. Vyberte **Standard** v nabídce **Sample Type** a zadejte odpovídající koncentrace pro každý standard v nabídce**Concentration**.
14. Naprogramovaný teplotní profil může být uložen v počítači na pevném disku, pro znovupožití při následných běžích. Za tímto účelem aktivujte funkci **Save As...** v nabídce **File**. Potom se utevře nové okno.
15. Vyberte v nabídce **Templates** and **Macros**, podnabídku **Run Templates** a uložete data s příslušným názvem.

16. Pro zahájení PCR běhu, překlikněte do pole **Run** a aktivujte funkci **Start Run** (viz [2] na obrázku 7).

    PCR program započne poté, co je zadáno umístění, kam mají být data uložena.



Obrázek 7. Zahájení PCR běhu.

Interpretace výsledků

Analýza PCR dat ze stroje LightCycler 1.1/1.2/1.5

Pro analýzu PCR dat, pořízených strojem LightCycler 1.1/1.2/1.5, doporučujeme používat LightCycler Software Version 3.5.

Ve vícebarevných analýzách, dochází k rušení mezi kanýly fluorimetru. Program LightCycler 1.1/1.2/1.5 instrument's software, obsahuje soubor, nazvaný **Color Compensation File**, který kompenzuje toto rušení.

1. Otevřete **Color Compensation File** před, během, nebo po PCR běhu aktivací příslušného tlačítka **Choose CCC File** nebo **Select CC Data** button.
2. Jestliže není nainstalován soubor **Color Compensation File**, vygenerujte tento soubor podle instrukcí uvedených v uživatelské příručce *LightCycler Operator's Manual*.

   Potom co je aktivován **Color Compensation File**, samostatné signály se objeví v kanálech fluorimetru **F1**, **F2** a **F3**.
3. Pro analýzu PCR výsledků s *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit, vyberte možnost zobrazení fluoresce **F2/Back-F1** pro analyzovaný PCR komplex *M. tuberculosis*/*M. avium* PCR a **F3/Back-F1** pro příslušnou interní PCR kontrolu.

   Pro analýzu kvantitativních běhů, následujte instrukce v kapitole "Kvantifikace" strana 12**Fehler! Textmarke nicht definiert.**.

Možné jsou nálsedující výsledky:

- Signál detekováný v kanále fluorimetru **F2/Back-F1**.

  Výsledek analýzy je pozitivní. Vzorek obsahuje DNA jednoho nebo více členů komplexu *M. tuberculosis* a/nebo komplexu the *M. avium*.

  V tomto případě detekce signálu v kanále **F3/Back-F1** je postradatelná, neboť vysoké počáteční koncentrace DNA komplexu *M. tuberculosis* (pozitivní signál v kanále **F2/Back-F1**) může vést ke snížení, nebo absenci fluorescenčního signálu interní kontroly v kanále **F3/Back-F1** (kompetice).

  Je třeba rozlišovat mezi komplexem *M. tuberculosis*, poddruhy *M. avium* a *M. intracellulare* na bázi bodu tání (kanál **F2/Back-F1**, program **Melting Curve**). Bod tání pro zástupce komplexu *M. tuberculosis* by měl být v 60°C, pro poddruhy *M. avium* v 63.5°C a pro *M. intracellulare* v 55°C. Rozlišení mezi komplexy *M. tuberculosis* a *M. avium* jsou zobrazeny na Obrázek 8.

Odlišnosti mezi jednotlivými stroji LightCycler mohou způsobit odchylku v bodech tání o 1–2°C. Nicméně tato odchylka bude stejná pro všechny 3 body tání. Odlišné podmínky extrakce a činidla, mohou vyústit v nepatrné odlišnosti v bodech tání vzorků od dodávaných kontrol. PCR by měla být opakována jestliže odchylka bodu tání analyzovaného a kontroly je větší jak 1°C. Pro některé druhy mycobacteria, můžou být pozorovány body tání které se odchylují od výše uvedeného. V tomto případě se obraťe na kapitolu (viz “Řešení problémů” strana 30**Fehler! Textmarke nicht definiert.**).

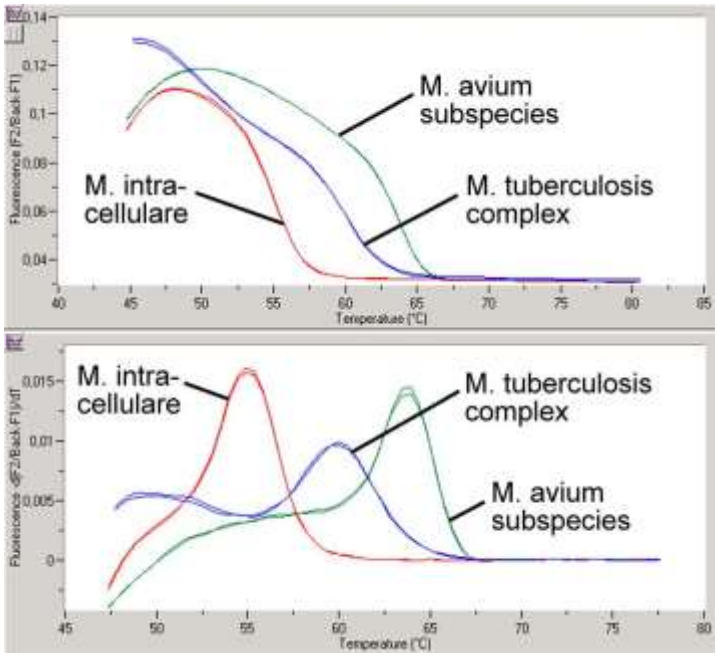
- Nedetekován žádný signál v kanále fluorimetru **F2/Back-F1**. Ve stejném čase se však objevuje signál v kanále pro interní kontrolu **F3/Back-F1**.

  Ve vzorku není žádná DNA komplexu *M. tuberculosis* nebo komplexu *M. avium.*V tomto příadě lze považovat vzorek za negativní .

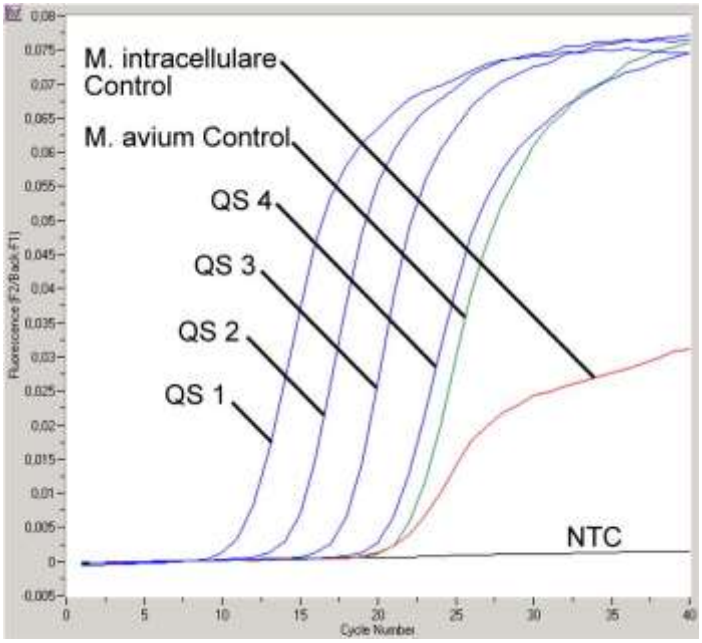
  V případě negativity komplexu *M. tuberculosis*/*M. avium* complex PCR, detekovaný signál interní kontroly vylučuje možnost inhibice PCR.

- Jestliže není detekován žádný signál v kanále **F2/Back-F1** nebo v kanále **F3/Back-F1**, nemůže být uzavřená diagnóza.

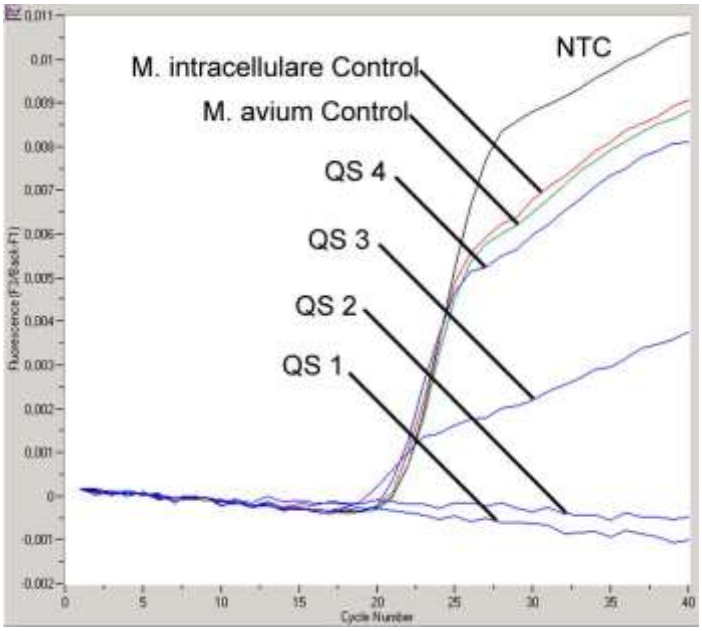
  Příklady pozitivních a negativních PCR jsou zobrazeny na Obrázku 9 a Obrázku 10. Informace týkající se zdrojů chyb a jejich řešení lze nalézt v kapitole “Řešení problémů” strana 30.



Obrázek 8. Rozlišování mezi komplexem *M. tuberculosis* a komplexem *M. avium* v kanálech fluorimetru F2/Back-F1 stroje LightCycler 1.1/1.2/1.5 (Program: Křivka tání).



Obrázek 9. Detekce kvantifikačních standardů (M. tuberculosis LC QS 1 – 4) a pozitivních kontrol (M. avium LC Control, M. intracellulare LC Control) v kanále fluorimetru F2/Back F1 na stroji LightCycler 1.1/1.2/1.5. NTC: non-template control (negativní kontrola).



Obrázek 10. Detekce interní kontroly v kanále fluorimetru F3/Back F1 na stroji LightCycler 1.1/1.2/1.5 Stroj se simultální amplifikací kvantifikačních standardů (M. tuberculosis LC QS 1–4) a pozitivních kontrol (M. avium LC Control, M. intracellulare LC Control). NTC: non-template control (negativní kontrola).

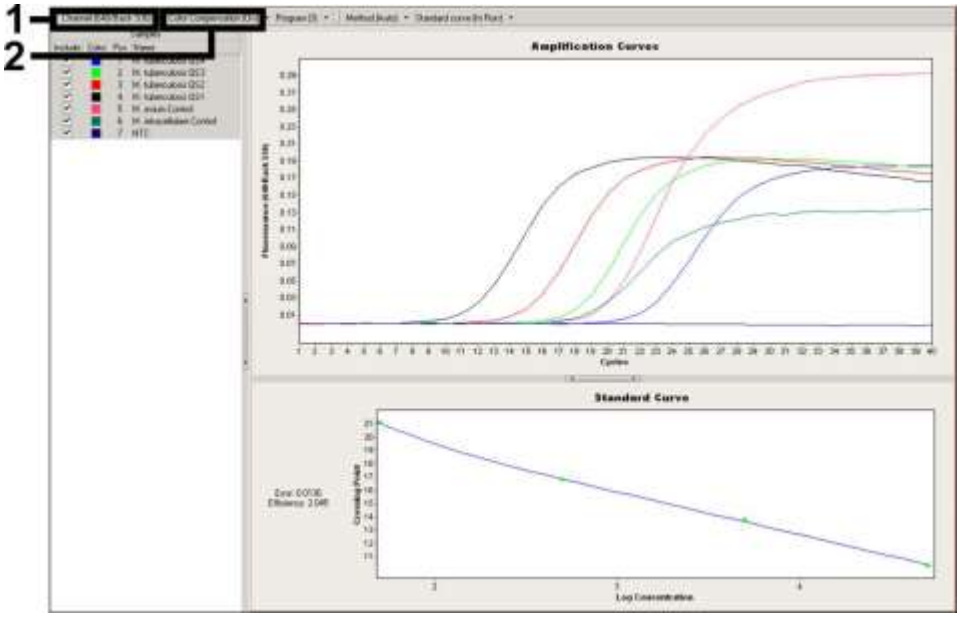
Analýza PCR dat ze stroje LightCycler 2.0

Pro analýzu PCR dat, pořízených strojem LightCycler 2.0, používejte LightCycler Software Version 4.0. Řiďte se pokyny uvedenými v *LightCycler 2.0 Instrument Operator's Manual*, Version 4.0.

Pro analýzu PCR dat postupujte následovně (viz Obrázek 11):

1. Aktivujte funkci **Analysis** v pruhu nabídky a zvolte volbu **Absolute Quantification**.
2. V zásadě všechna data amplifikace, generována s Artus Mycobac. diff. LC PCR Kit, by měla být analyzována pomocí této funkce.
3. Program LightCycler Software Version 4.0 obsahuje soubor s názvem **Color Compensation File**, který kompenzuje interferenci vícebarevných analýz ve fluorescenčních kanálech. Otevřete tento soubor v průběhu, nebo po ukončení PCR běhu aktivací **Color Comp (On/Off)** a následně aktivací tlačítka **Select Color Compensation** (viz Obrázek 11).
4. Jestliže není nainstalován **Color Compensation File**, vygenerujte tento soubor podle instrukcí uvedených v příručce *LightCycler Operator's Manual*.

   Potom, co je aktivivaná funkce **Color Compensation File**, samostatné signály se objeví ve fluorescenčních kanálech.
5. Pro analýzu PCR výsledků získaných se soupravou *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit, vyberte možnost zobrazení fluorescence v kanále **640/Back 530** pro analyzovaný PCR komplex M. *tuberculosis*/*M. avium* a kanál **705/Back 530** pro příslušnou interní PCR kontrolu.



Obrázek 11. Aktivace souboru Color Compensation a výběr fluorescenčního kanálu.

Pro analýzu kvantitativních běhů, následujte instrukce v kapitole “Kvantifikace” strana 12.

Po skončení analýzy jsou možné nálsedující výsledky:

- Detekovaný signál ve fluorescenčním kanále **640/Back 530**.

  Výsledek analýzy je pozitivní. Vzorek obsahuje DNA jednoho nebo více zástupců komplexu *M. tuberculosis* a/nebo komplexu *M. avium*.

  V tomto případě detekce signálu v kanále **705/Back 530** je postradatelnáneboť vysoké počáteční koncentrace DNA komplexu *M. tuberculosis* (pozitivní signál v kanále **640/Back 530**) může způsobit redukci, nebo absenci fluorescenčního signálu interní kontroly v kanále **705/Back 530** (kompetice).

  Je třeba rozlišovat mezi komplexem *M. tuberculosis*, poddruhy *M. avium* a *M. intracellulare* na základě bodu tání (kanál **640/Back 530**, program: **Melting Curve**). Bod tání pro zástupce komplexu *M. tuberculosis* je očekáván v 60°C, pro poddruhy *M. avium* v 63.5°C a pro *M. intracellulare* v 55°C. Rozlišení mezi komplexem *M. tuberculosis* a komplexem *M. avium* ve fluorescenčním kanále **640/Back 530** stroje LightCycler 2.0 je zobrazeno na obrázku Obrázek 12.

  Odlišnosti mezi jednotlivými stroji LightCycler mohou způsobit odchylku v bodech tání o 1–2°C. Nicméně tato odchylka bude stejná pro všechny 3 body tání. Odlišné podmínky extrakce a činidla, mohou vyústit v nepatrné odlišnosti v bodech tání vzorků od dodávaných kontrol. PCR by měla být opakována jestliže odchylka bodu tání analyzovaného a kontroly je větší jak 1°C. Pro některé druhy mycobacteria, můžou být pozorovány body tání které se

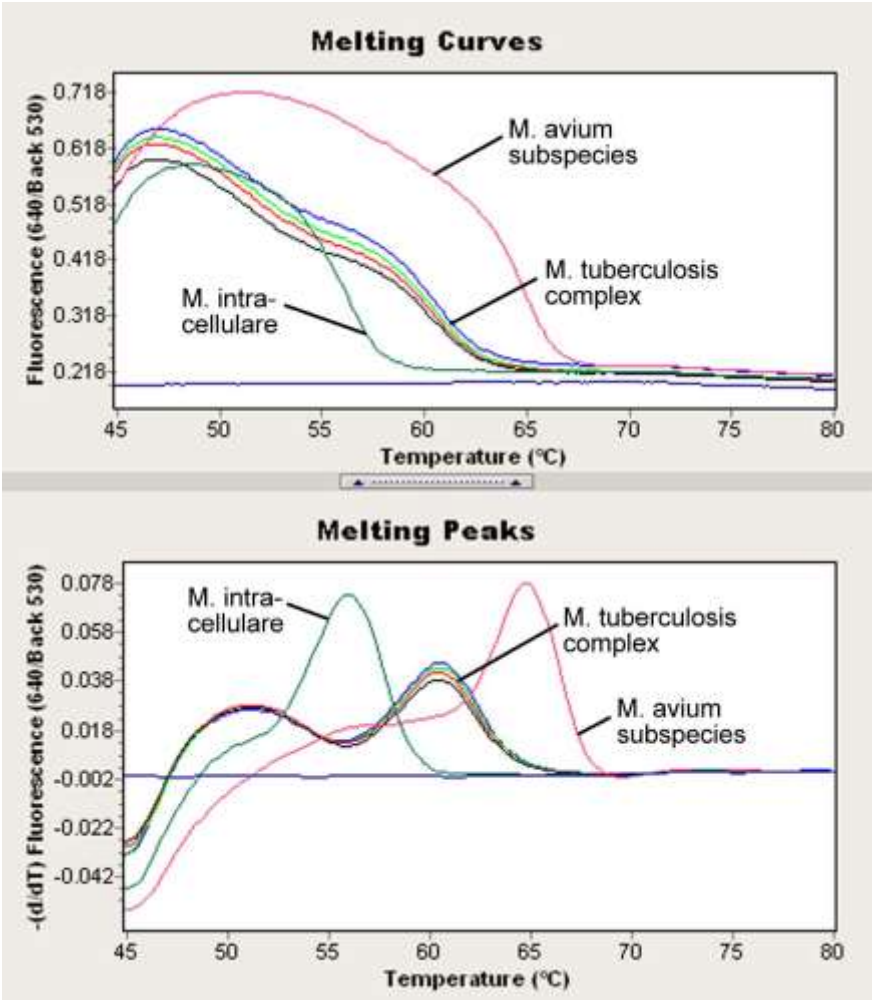
odchylují od výše uvedeného. V tomto případě se obraťe na kapitolu (viz “Řešení problémů” strana 30.).

- Jestliže není detekován žádný signál v kanále fluorimetru **640/Back 530** a v stejném čase se však objevuje signál v kanále pro interní kontrolu**705/Back 530**, pak Ve vzorku není žádná DNA komplexu *M. tuberculosis,* nebo komplexu *M. avium.*V tomto příadě lze považovat vzorek za negativní .

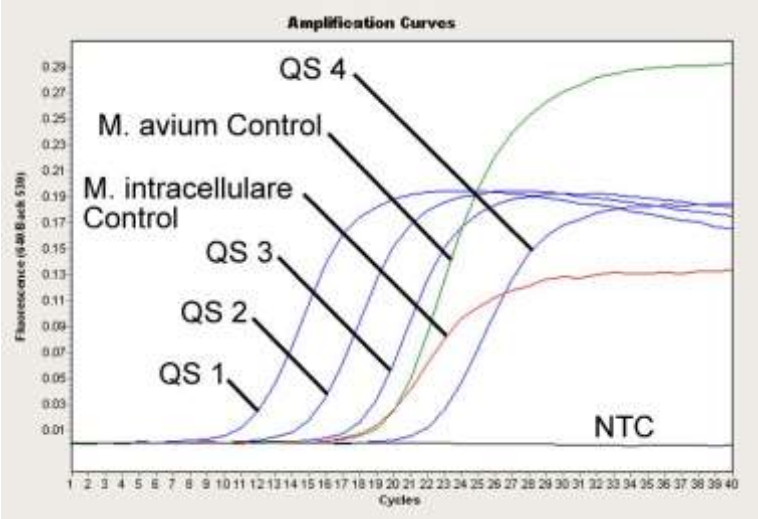
  V případě negativity komplexu *M. tuberculosis*/*M. avium* complex PCR, detekovaný signál interní kontroly vylučuje možnost inhibice PCR.

- Jestliže není detekován signál v kanále **640/Back 530**, nebo v kanále **705/Back 530**, nemůže být uzavřena dignóza.

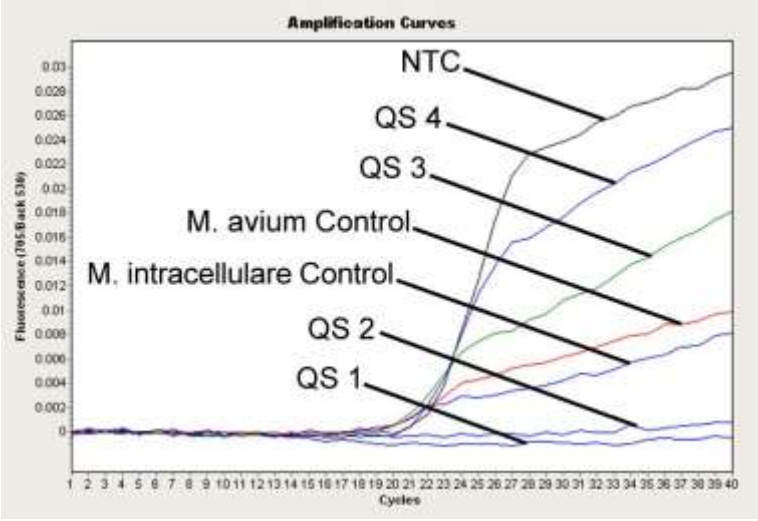
  Příklady pozitivní a negativních PCR reakcí jsou uvedeny na Obrázku 13 a Obrázku 14. Informace týkající se zdrojů chyb a jejich řešení lze nalézt v kapitole “Řešení problémů“ strana 30.



Obrázek 12. Rozlišení mezi komplexem *M. tuberculosis* a komplexem *M. avium* ve fluorescenčním kanále 640/Back 530 na stroji LightCycler 2.0 (Program: Melting Curve).



Obrázek 13. Detekce kvantifikačních standardů (M. tuberculosis LC QS 1–4) a pozitivních kontrol (M. avium LC Control, M. intracellulare LC Control) ve fluorescenčním kanále 640/Back 530 strojeLightCycler 2.0. NTC: non-template control (negativní kontrola).



Obrázek 14Detekce interní kontroy ve fluorescenčním kanále 705/Back 530 stroje LightCycler 2.0 se simultální amplifikací kvantifikačních standardů (M. tuberculosis LC QS 1–4). NTC: non-template control (negativní kontrola).

	Náměty a připomínky
Žádný signál u kvantifikačních standardů (M. tuberculosis LC QS 1–4) a pozitivních kontrol (M. avium LC Control, M. intracellulare LC Control) ve fluorescenčním kanále F2/Back-F1 or 640/Back 530	
a) Vybraný fluorescenční kanál pro analýzu PCR dat není kompatibilní s protokolem	Pro analýzu dat vyberte fluorescenční kanály **F2/Back-F1** nebo **640/Back 530,** pro analyzovaný PCR komplex *M. tuberculosis*/*M. avium* a fluorescenční kanály **F3/Back-F1** nebo **705/Back 530** pro interní kontrolu PCR.
b) Nesprávné naprogramování teplotního profilu stroje LightCycler 1.1/1.2/1.5 nebo stroje LightCycler 2.0	Porovnejte teplotní profil s protokolem (viz Programování přístroje LightCycler ," strana 16).
c) Nesprávná konfigurace PCR reakce	Zkontrolujte vaše pracovní kroky s piúpetovacím schématem (viz "Příprava PCR" strana 13) a v případě nutnosti opakujte PCR.
d) Nebyly dodrženy skladovací podmínky pro jednu, nebo více součástí, uvedených v instrukcích soupravy, nebo došlo k expiraci souprvy *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit	Zkontrolujte skladovací podmínky činidel (viz „Skladování a manipulace s činidly" strana 8roof*) a dobu expirace (viz štítek soupravy).V případě nutnosti použijte novou soupravu.
Slabý nebo žádný signál interní kontroly ve fluorescenčním kanále F3/Back F1 nebo 705/Back 530 a simultální absence signálu v kanále F2/Back F1 nebo 640/Back 530 pro specifický PCR komplex *M. tuberculosis*/*M. avium*	
a) Podmínky PCR nejsou v souladu s protokolem	Zkontrolujte podmínky PCR (viz „Žádný signál u kvantifikačních standardů a pozitivních kontrol," viz výše) V případě nutnosti opakujte PCR v souladu s protokolem

*

		Náměty a připomínky
b)	Inhibice PCR	Ujistěte se, že jste použili doporučenou metodu izolace (viz “Izolace Izolace DNA ,” strana 10) a pozorně následujte pokyny výrobce. Uistěte se zda byl v průběhu izolace DNA, před elucí DNA, proveden doporučený krok dodatečné centrifugace. Tento krok odstarnění zbytkový ethanol (viz “Izolace DNA ,” strana 10).
c)	DNA byla ztracena při extrakci	Chybějící signál interní kontroly může být způsoben ztrátou DNA v průběhu extrakce. Ujistěte se, že jste použili doporučenou metodu izolace (viz “Izolace Izolace DNA ,” strana 10) a pozorně následujte pokyny výrobce.
d)	The storage conditions for one or more kit components did not comply with the instructions or the *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit had expired	Zkontrolujte skladovací podmínky (viz “Skladování a manipulace s činidly” strana 8)a dobu expirace (viz štítek soupravy). V případě nutnosti použijte novou soupravu.
Signál ve fluorescenčním kanále pro negativní kontrolu F2/Back-F1 nebo 640/Back 530 analytické PCR		
a)	Objevila se kontaminace během procesu izolace	Opakujte PCR s novými činidly v replikátech. Jestliže to je možné, uzavřete PCR zkumavky ihned po přidání testovaného vzorku. Pozitivní kontrolu pipetujte vždy jako poslední. Ujistěte se, že pracovní prostor a nástroje jsou dekontaminovány v pravidelných intervalech.

		Náměty a připomínky
b)	Objevila se kontaminace během izolace	Opakujte extrakci a PCR vzorků, za použití nových činidel. Ujistěte se, že pracovní prostor a nástroje jsou dekontaminovány v pravidelných intervalech.

Analýza křivky tání ve fluorescenčním kanále F2/Back-F1 nebo 640/Back 530 neumožňuje jasné přiřazení k jedné ze 3 detekovatelných mycobacterialních skupin

a)	Vzorek obsahuje DNA sérovaru *M. intracellulare* 7 nebo 18	Bod tání je přibližně 52°C.
b)	Vzorek obsahuje DNA *M. marinum* a/nebo *M. ulcerans*	Bod tání je přibližně 53°C.
c)	Vzorek obsahuje DNA *M. haemophilum*	Bod tání je přibližně mately 62°C.
d)	Vzorek obsahuje DNA jiných mycobacteriálních druhů, než zástupců komplexů *M. avium* a M. *tuberculosis* a také *M. marinum* a *M. ulcerans*	Vyšetření určitých mycobacteriálních druhů není možné.

Máte-li jakékoli další otázky, nebo pokud se vyskytnou problémy, obraťte se na technický servis QIAGEN .

Kontrola kvality

V souladu s QIAGEN's ISO 9001 a ISO 13485-ověřené Total Quality Management System, každá šarže *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit je testována proti předem stanoveným specifikacím k zajištění konstatní kvality výrobků.

Omezení

- Výrobek má být používán pouze speciálně vyškoleným a trénovaným personálem v in vitro diagnostických postupech.
- Je požadováno striktní dodržování instrukcí v uživatelské příručce, pro dosažení optimálních výsledků PCR.
- Měla by být věnována pozornost, datmu expirace všech součástí, které je uvedeno krabičce a na štítku každé součásti soupravy. Nepoužívejte prošlá činidla.
- Ačkoliv je to vzácné, muatce ve vysoce konzervované části bakteriálního genomu, kterou pokrývají primery a/nebo sondy, mohou mít za následek nízkou kvantifikovatelnost nebo selhání detekční schopnosti bakterie. Platnost a výkonnost navržení testu jsou vyhodnocovány v pravidelných intervalech.

Funkční charakteristiky

Analytická senzitivita

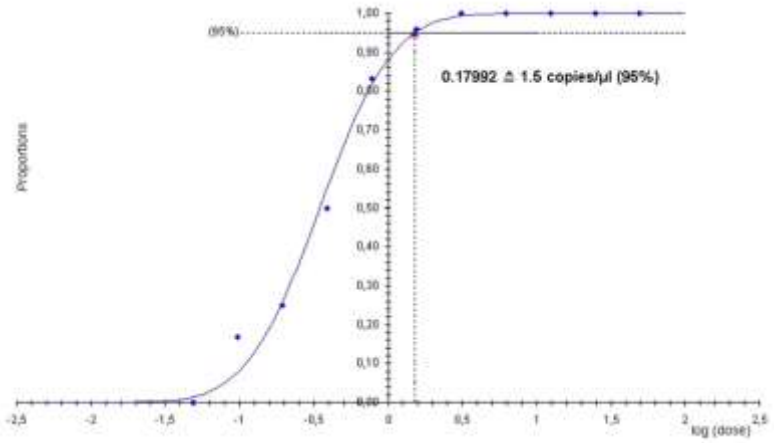
Aby bylo možné určit analytickou citlivost *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit, standardní ředicí řada byla vytvořena od 50 do koncových 0.05 *M. tuberculosis* kopií* ekvivalentů/µl a od 50 do koncových 0.39 *M. avium* stejně tak *M. intracellulare* kopií ekvivalentů/µl a analyzována na stroji LightCycler 1.1/1.2/1.5 v kombinaci s *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit. Testování probíhalo ve 3 různých dnech na 8 v 8 opakováních. Výsledky byly určeny probit analýzou a jsou zobrazeny v Tabulce 1 a. Grafické znázrnění je uvedeno na Obrázcích 15–17.

Table 1. Detekční limity cílů spolu s *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit

Cíl	Detekční limit (p = 0.05)
M. tuberculosis complex	1.5 kopií/µl
M. avium subspecies	3.8 kopií/µl
M. intracellulare	2.8 kopií/µl

To znamená, že existuje 95% pravděpodobnost, že bude detekováno 1.5 copies/µl (komplexu *M. tuberculosis*), 3.8 coií/µl (poddruhu *M. avium*) a 2.8 kopií/µl (*M. intracellulare*)

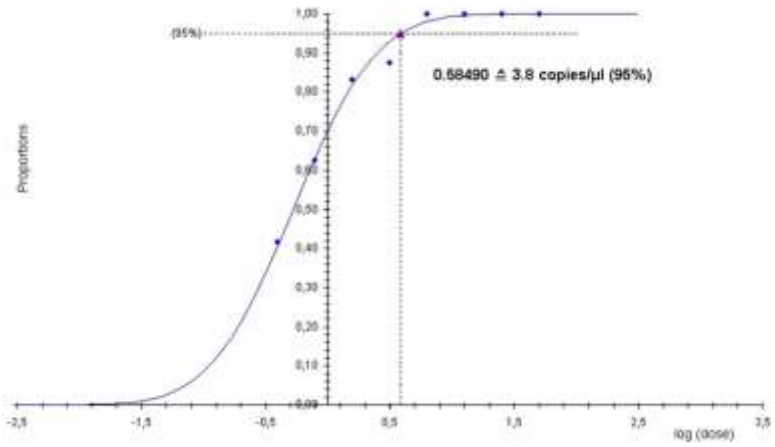
Probit analýza: *Mycobacterium tuberculosis* (LightCycler1.1/1.2/1.5)



Obrázek 15. Analytická senzitivita *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit (*M. tuberculosis*) na stroji LightCycler 1.1/1.2/1.5.

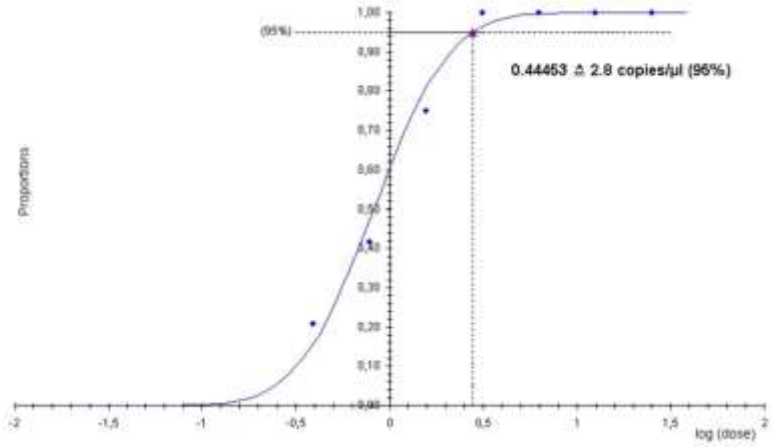
* Standard je klon PCR produktu, jehož koncentrace byla stanovena absorbcí a fluorescenční spektrofotometrií.

Probit analýza: *Mycobacterium avium* (LightCycler1.1/1.2/1.5)



Obrázek 16. Analytický senzitivita *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit (*M. avium*) na stroji LightCycler 1.1/1.2/1.5.

Probit analýza: *Mycobacterium intracellulare* (LightCycler1.1/1.2/1.5)



Obrázek 17. Analytická senzitivita *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit (*M. intracellulare*) na stroji LightCycler 1.1/1.2/1.5.

Specifita

Specifita *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit je v prvé řadě zajištěna výběrem peimerů a sond, stejně tak výběrem přísných reakčních podmínek. Primery a sondy byly testovány na možné homologie všech sekvencí, publikovaných v genetických bankách, pomocí srovnávací analýzy. Tím je zajištěna detekovatelnost všech zástupců komplexu *M. tuberculosis* a komplexu *M. avium*.

Kromě toho byla specifita validována s 90 různými negativními komplexy *M. tuberculosis* a *M. avium* (30 hlen, 30 BAL a 30 vzorků bronchialnho sekretu). Tyto vzorky negenerovaly žádný signál s primery a sondami komplexu *M. tuberculosis*/*M. avium* complex, jež jsou součástí Mycobac. diff. LC Master. Chcete-li určit specifitu *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit, kontrolní skupina, která byla testována na zkříženou reaktivitu, je uvedena v Tabulce 2. Žádný z testovaných patogenů nebyl reaktivní.

Tabulka 2. Testování specifity soupravy s potenciálně reaktivními patogeny.

Kontrolní skupina	***M. tuberculosis*/ *komplexM. avium*** **(F2/Back-F1 or 640/Back 530)**	**Interní kontrola (F3/Back-F1 or 705/Back 530)**
Actinomyces israelii	–	+
Aeromonas hydrophila	–	+
Bordetella pertussis	–	+
Candida albicans	–	+
Chlamydia trachomatis	–	+
Chlamydia pneumoniae	–	+
Citrobacter freundii	–	+
Corynebacterium diphtheriae	–	+
Corynebacterium jeikeium	–	+
Cryptococcus neoformans	–	+
Eikenella corrodens	–	+
Enterobacter aerogenes	–	+
Enterobacter cloacae	–	+
Enterococcus faecalis	–	+
Enterococcus faecium	–	+
Escherichia coli	–	+
Fusobacterium nucleatum ssp. *polymorphum*	–	+
Haemophilus influenzae	–	+
Haemophilus parainfluenzae	–	+

Kontrolní skupina	*M. tuberculosis*/ *komplexM. avium* (F2/Back-F1 or 640/Back 530)	Interní kontrola (F3/Back-F1 or 705/Back 530)
Klebsiella pneumoniae	–	+
Lactobacillus acidophilus	–	+
Neisseria gonorrhoeae	–	+
Neisseria meningitidis	–	+
Nocardia asteroides	–	+
Nocardia brasiliensis	–	+
Nocardia farcinia	–	+
Nocardia otitidiscaviarum	–	+
Peptostreptococcus productus	–	+
Porphyromonas gingivalis	–	+
Prevotella denticola	–	+
Propionibacterium acnes	–	+
Pseudomonas aeruginosa	–	+
Salmonella enteritidis	–	+
Salmonella typhi	–	+
Staphylococcus aureus	–	+
Staphylococcus epidermidis	–	+
Streptococcus agalactiae	–	+
Streptococcus pyogenes	–	+
Streptococcus mutans	–	+
Streptococcus pneumoniae	–	+
Streptomyces venezuelae	–	+
Veillonella parvula	–	+
Xanthomonas maltophilia	–	+

Velké množství DNA mycobacteriálních druhů, které nepatří do komplexu *M. tuberculosis*/*M. avium* může vést k selhání interní kontroly (viz Tabulka 3). Navíc je možná tvorba amplifikační křivky v kanále fluorimetru **F2/Back-F1** a/nebo křivka tání. Ale pro všechny testované mikrobiální druhy, je možná analýza křivky tání což umožňuje rozlišení komlexů *M. tuberculosis*/*M. avium* (viz Tabulka 3).

Tabulka 3: Testování specifity soupravy s potenciálně křížově reaktivními mycobacteriemi.

Druhy	*M. tuberculosisl M. avium* complex (F2/Back-F1 or 640/Back 530)	Interní kontrola (F3/Back-F1 or 705/Back 530)	Bod tání (F2/Back-F1 or 640/Back 530)
Mycobacterium celatum	+	–	49.5°C
Mycobacterium chelonae	–	–	–
Mycobacterium fortuitum	–	–	–
Mycobacterium gordonae	–	+	–
Mycobacterium haemophilum	+	–	62.0°C
Mycobacterium kansasii	–	–	49.0°C
Mycobacterium lentiflavum	+	–	50.0°C
Mycobacterium malmoense	–	–	50.0°C
Mycobacterium marinum	+	–	53.5°C
Mycobacterium scrofulaceum	–	–	–
Mycobacterium szulgai	–	–	50.5°C
Mycobacterium ulcerans	+	–	53.5°C
Mycobacterium xenopi	–	+	–

Přesnost

Přesné údaje o *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit byly nashromážděny pomocí stroje LightCycler 1.1/1.2/1.5 a umožňují určit celkový rozptyl testu. Celkový rozptyl se skládá z variability testu (variabilita více výsledků vzorků o stejné koncentrace v rámci jednoho experimentu), z variability mezi testy (variabilita více výsledků testů byla generována na různých strojích stejného typu ve

stejné laboratoři) a variabilitou mezi šaržemi (variabilita více výsledků testu při použití různých šarží). Získané údaje byly použity pro stanovení standardní odchylky, rozptylu a variačního koeficientu pro patogen-specifické a interní kontroly PCR.

Přesné údaje o *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit byly nashromážděny použitím kvantifikačních standardů s nejnižší koncentrací (QS 4; 50 kopií/µl). Testování bylo provedeno s 8 opakováními. Údaje o přesnosti byly vypočítány na základě C_T hodnot amplifikačních křivek (C_T: threshold cyklu, viz Table 4). Kromě toho přesnost dat pro kvantitativní výsledky copies/µl byly stanoveny pomocí odpovídajících C_T hodnot (viz Tabulka 4). Na základě těchto výsledků, celkový statistický rozptyl každého vzorku o uvedené koncenmtraci je 1.42% (C_T) nebo 12.17% (kopií/µl) a pro detekci interní kontroly 1.36 % (C_T). Tyto hodnoty jsou založeny na souhrnu všech jednotlivých stanovených hodnot variabilit.

Tabulka 4. Přesné údaje na základě C_T hodnot

	Standardní odchylka	Odchylka	Variační koeficient (%)
Variabilita v rámci testu: M. tuberculosis LC QS 4	0.15	0.02	0.73
Variabilita v rámci testu: Interní kontrola	0.16	0.02	0.78
Variabilita v rámci testu: M. tuberculosis LC QS 4	0.23	0.06	1.42
Variabilita v rámci testu: Interní kontrola	0.33	0.11	1.65
Variabilita mezi šaržemi: M. tuberculosis LC QS 4	0.25	0.06	1.23
Variabilita mezi šaržemi: Interní kontrola	0.23	0.06	1.17
Celková variabilita: M. tuberculosis LC QS 4	0.29	0.08	1.42
Celková variabilita: Interní kontrola	0.27	0.07	1.36

Tabulka 5. Přesné údaje na základě kvantitativních výsledků (v kopiích/µl)

	Standardní odchylka	Odchylka	Variační koeficient (%)
Variabilita v rámci testu: M. tuberculosis LC QS 4	5.35	28.57	10.64
Variabilita v rámci testu: M. tuberculosis LC QS 4	7.44	55.40	14.73
Variabilita mezi šaržemi: M. tuberculosis LC QS 4	5.07	25.67	10.08
Total variance: M. tuberculosis LC QS 4	6.13	37.56	12.17

Robustnost

Ověření robustnosti umožňuje stanovení celkové chybovosti *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit. Celkem 30 komplex - negativních *M. tuberculosis*/*M. avium* vzorků z hlenu, BAL a bronchiálního sekretu bylo obohaceno o 12.5 kopií/µl elučního objemu kontrolní DNA *M. avium* (přibližně 3-násobné koncentrace limitu analytické senzitivity). Po extrakci při použití QIAamp DNA Mini Kit (viz “Izolace Izolace DNA ,” strana 10), byly tyto vzorky analyzovány soupravou *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit. Pro všechny vzorky *M. avium* dosáhla chybovost hodnoty 0%. Kromě toho byla posuzována i robustnost interní kontroly purifikací a analýzou vzorků komplex-negativních *M. tuberculosis*/*M. avium* z hlenu, BAL a vzorků bronchiálního sekretu (30 každý). Chybovost dosáhla 0%. Inhibice nebyly pozorovány. Tedy robustnost souprav *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit je ≥ 99%.

Reprodukovatelnost

Údaje o reprodukovatelnosti umožňují pravidelné hodnocení výkonnosti *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit stejně tak srovnávání účinnosti s ostatními produkty. Tyto data se získávají účastí v zavedených programech způsobilosti.

Reference

6. Mackay I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. **10**, 190.

Symboly

Symbol	Definice symbolu
	Použitelné do
	Číslo šarže
	Výrobce
	Katalogové číslo
	Číslo materiálu
	CE označení pro Evropské shody
	In vitro diagnostika zdravotnické zařízení
	Obsahuje činidla v dostatečném množství pro <N> testů

Symbol	Definice symbolu
COMP	Součásti
CONT	Obsahuje
NUM	Číslo
GTIN	Global Trade Item Number
	Teplotní limity
QS	Kvantifikační standard
IC	Interní kontrola
Mg-Sol	Roztok hořčíku

Tato stránka je záměrně prázdná

Ochranné známky: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*® (QIAGEN Group); LightCycler® (Roche Group); Triton™ (The Dow Chemical Company).

Registrované názvy, ochranné známky, atd. použité v tomto dokumentu, i když jako takové nejsou, nemají být považovány za zákonem nechráněné.

The *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit je CE-označená diagnostická souprava podle European In Vitro Diagnostic Directive 98/79/EC. Není dostupné ve všech zemích.

Aktuální informace o licencích a produktově-specifických vyloučení odpovědnosti, naleznete v příslušném QIAGEN uživatelské příručce k soupravě nebo v uživatelském manuálu. QIAGEN uživatelské příručky a uživatelské manuály jou dostupné na **www.qiagen.com** nebo mohou být vyžádány od QIAGEN Technického Servisu nebo od vašeho místního distributora.

Koupě tohoto produktu opravňuje kupce k jeho užití v rámci humánní in vitro diagnostiky. Není poskytnut žádný obecný patent nebo licence jiná než toto specifické právo užití vycházející z koupě.

KOUPÍ TOHOTO PRODUKTU SE UDĚLUJÉ KUPUJÍCÍMU PRÁVA PODLE JEDNOHO NEBO VÍCE U.S. PATENTŮ NOS 6,174,670, 7,160,998, 6,569,627 A 6,245,514 A A JEJICH ZAHRANIČNÍMI PROTĚJŠKY, POUŽÍVAT TENTO PRODUKT VÝHRADNĚ PRO ZAJIŠTĚNÍ IN VITRO DIAGNOSTICKÝCH SLUŽEB LIDEM A ZVÍŘATŮM. NENÍ POSLYTNUT ŽÁDNÝ OBECNÝ PATENT NEBO LICENCE JINÁ NEŽ TOTO SPECIFICKÉ PRÁVO UŽITÍ VYCHÁZEJÍCÍ Z KOUPĚ, TO ZARUČUJE TENTO DOKUMENT.

Omezená licenční smlouva na *artus* Mycobac. diff. LC PCR Kit

Použitím produktu vyjadřuje kupec nebo uživatel produktu souhlas s následujícími podmínkami:

1. Produkt smí být používán výhradně v souladu s protokoly dodávanými s produktem a tímto manuálem a pouze s komponenty obsaženými v soupravě. QIAGEN neposkytuje žádnou licenci v rámci kteréhokoliv svého duševního vlastnictví k použití nebo k začlenění přiložených komponent soupravy s komponenty, které nejsou zahrnuty v této soupravě, s vyjímkou případů uvedených v protokolech dodávaných s produktem, tomto manuálu a dodatečných protokolech dostupných na www.qiagen.com. Některé z těchto dodatečných protokolů byly poskytnuty QIAGEN uživateli pro uživatele QIAGEN. Tyto protokly nebyly důkladně testovány ani optimalizovány QIAGEN. QIAGEN za ně neposkytuje žádné záruky a ani nezaručuje, že nebudou narušovat práva třetích stran.
2. Mimo výslovně uvedenou licenci QIAGEN neposkytuje žádnou záruku, že tato souprava a/nebo její použití neporušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její komponenty jsou licencovány pro jedno použití a nesmí být znovu použity, obnoveny či znovu prodány
4. QIAGEN zvláště vylučuje odpovědnost za jakékoliv jiné licence, vyjádřené či implikované, než výslovně uvedené.
5. Kupec a uživatel soupravy souhlasí s tím, že nepodnikne nebo nikomu neumožní podniknout kroky, které by mohly vést nebo usnadnit zakázané skutky uvedené výše. QIAGEN může zákazy tohoto Licenčního ujednání prosadit u každého soudu a vyžadovat úhradu všech vyšetřovacích a soudních poplatků, inkl. poplatků za advokáta, v rámci jakéhokoliv postupu k prosazení tohoto Licenčního ujednání nebo jakýchkoliv jiných práv duševního vlastnictví vztahujících se na tento kit a/nebo jeho komponenty.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení, viz **www.qiagen.com**.

HB-0034-006 151031227 10/2015 © 2007–2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.