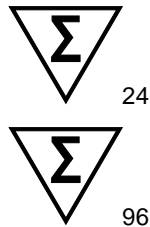


Prosinec 2015

# artus<sup>®</sup> M. tuberculosis RG PCR Kit Uživatelská příručka



Verze 1

Kvantitativní in vitro diagnostika

Pro použití s přístrojem Rotor-Gene<sup>®</sup> Q

IVD



REF

4555263 (24 reakcí)  
4555265 (96 reakcí)



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1  
40724 Hilden  
GERMANY

R5 MAT

1046960CS

# Obsah

Účel použití .....	4
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
PCR na přístrojích Rotor-Gene Q .....	13
Interpretace výsledků .....	20
Řešení problémů .....	22
Kontrola kvality .....	24
Omezení .....	24
Funkční charakteristiky .....	25
Analytická senzitivita .....	25
Specifita .....	26
Přesnost .....	28
Robustnost .....	30
Reprodukovatelnost .....	30
Referenci .....	31
Symboly .....	31
Informace pro objednání .....	33



## Účel použití

Souprava *artus M. tuberculosis RG PCR Kit* je in vitro amplifikační test nukleových kyselin pro detekci všech zástupců komplexu *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti*, *M. pinnipedii*) v lidském sputu, BAL, bronchiálním sekretu, CSF, žaludeční tekutině nebo vzorků peritoneálního punktátu. Tento diagnostický test kit využívá polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a je konfigurovaný pro použití s přístroji Rotor-Gene Q.

## 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. Menšíiny, 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.

## 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 barvivami. 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).

Souprava *artus M. tuberculosis RG 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 Rotor Gene Q. *M. tuberculosis* RG obsahuje reagentie a enzymy pro specifickou amplifikaci 159 bp velké oblasti mycobacteriálního genomu a přímou detekci specifických amplikonů, ve fluorescenčním kanále **Cycling Green**, na přístrojích Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q, nebo Rotor-Gene 6000, nebo ve fluorescenčním kanále **Cycling A.FAM** na přístroji Rotor-Gene 3000.

Souprava *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit navíc obsahuje druhý heterologní amplifikační systém, sloužící k detekci možné inhibice PCR. Ten je detekován jako interní kontrola (IC) ve fluorescenčním kanále **Cycling Yellow** přístrojů Rotor Gene Q MDx, Rotor-Gene Q, nebo Rotor-Gene 6000, nebo ve fluorescenčním kanále **Cycling A.JOE** na přístroji Rotor-Gene 3000. Amplifikace a detekce této interní kontroly nesnižuje analytickou senzitivitu PCR, analyzovaného komplexu *M. tuberculosis* (viz "Analytická senzitivita," strana 25). Externí pozitivní kontroly (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1–4) jsou dodávány v balení, a které umožňují určit nálož patogenu. Pro více informací, viz "Kvantifikace," strana 12.

## Dodávané materiály

### Obsah soupravy

<b>artus M. tuberculosis RG PCR Kit</b>				
<b>Katalogové číslo</b>		<b>4555263</b>	<b>4555265</b>	
<b>Počet reakcí</b>		<b>24</b>	<b>96</b>	
<b>Barva uzávěru</b>	<b>Název činidla</b>	<b>Symbol</b>	<b>Množství</b>	<b>Množství</b>
Modrá	M. tuberculosis RG Master		2 x 12 reactions	8 x 12 reactions
Žlutá	M. tuberculosis RG Mg-Sol*	<b>Mg-Sol</b>	1 x 400 µl	1 x 400 µl
Červená	M. tuberculosis RG/TM QS <sup>†</sup> 1 (3 x 10 <sup>4</sup> copy/µl)	<b>QS</b>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	M. tuberculosis RG/TM QS 2 (3 x 10 <sup>3</sup> copy/µl)	<b>QS</b>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	M. tuberculosis RG/TM QS 3 (3 x 10 <sup>2</sup> copy/µl)	<b>QS</b>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Červená	M. tuberculosis RG/TM QS 4 (3 x 10 <sup>1</sup> copy/µl)	<b>QS</b>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Zelená	M. tuberculosis RG IC <sup>‡</sup>	<b>IC</b>	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
- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, kat. č. 51304)
- Lysozyme mix (viz strana 10)
- Pipety (nastavitelné)
- 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
- Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q, nebo Rotor-Gene instrument s fluorescenčními kanály **Cycling Green** a **Cycling Yellow** nebo s fluorescenčními kanály **Cycling A.FAM** a **Cycling A.JOE**
- Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q software verze 1.7.94 nebo vyšší (Rotor-Gene 6000 software verze 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; Rotor-Gene 3000 software verze 6.0.23)
- Stripové zkumavky a uzávěry, 0.1 ml, pro použití s 72-well rotorem (kat. č. 981103 nebo 981106)
- Alternativně: PCR zkumavky, 0.2 ml, pro použití s 36-well rotorem (kat. č. 981005 nebo 981008)
- Chladicí blok (Loading Block 72 x 0.1 ml zkumavky, kat. č. 9018901, nebo Loading Block 96 x 0.2 ml zkumavky, kat. č. 9018905)

## 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 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, umístěných na ledu nebo na chladičím bloku (72/96-well loading block).

### Upozornění

Informace, týkající se bezpečnosti *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit, najdete v příslušném bezpečnostním listu (SDSs). Bezpečnostní listy (SDSs) jsou dostupné online v PDF formátu na [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety).

## Skladování a manipulace s činidly

Składujte všechny součásti soupravy *artus M. tuberculosis* RG 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, rozalíkvotujte 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 soupravy (např. Buffer AE ze soupravy QIAamp® DNA Mini Kit) a připravte ředění o koncentraci 1 µg/µl. Rozdělte roztok carrier RNA 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:

Činidlo	Počet vzorků	
	1	12
Buffer AL (lyzační pufr)	např. 200 µl	např. 2400 µl
Carrier RNA (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Interní kontrola	10 µl	120 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>212 µl</b>	<b>2544 µl</b>
<b>Extrakční objem</b>	<b>200 µl</b>	<b>each 200 µl</b>

- Použijte okamžitě čerstvě připravenou směs lyzačního pufru a carrier RNA k extrakci. Skladování směsi není možné.
- Souprava *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit by neměla být používána s izolací založenou na ethanolu.
- **Důležité:** Interní kontrola *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit se používá přímo během procesu izolace (viz “Interní kontrola”, strana 12).

## Izolace DNA

Před izolací DNA, vzorky s velkým 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 pufrům. Po závěrečné centrifugaci může být sediment bakterií použita pro následnou izolaci DNA.

Souprava QIAamp DNA Mini Kit (kat. č. 51304) je validována pro purifikaci mykobakteriální DNA z lidského sputa, BAL, bronchiálního sekretu, CSF, žaludeční tekutiny nebo peritoneálního punktátu, při použití v kombinaci se soupravou *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit.

Pro zajištění účinné lýze, bez křížové kontaminace mykobakterií, proveďte purifikaci DNA podle následujících kroků. Tyto kroky jsou odlišné od těch, které jsou uvedeny v příručce soupravy *QIAamp DNA Mini and Blood Mini*.

**Důležité:** Veškeré pipetovací kroky před inkubací v 95°C musejí být provedeny v biohazardním boxu II třídy, poněvadž vzorky jsou potenciálně infekční.

1. Přeneste mezi 250 µl a 500 µl dekontaminovaného NALC-NaOH- vzorku do 1.5 ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem.
  - Je absolutně nezbytné používat zkumavky se šroubovacím uzávěrem.
  - Zkumavky se šroubovacím uzávěrem musejí být důkladně uzavřeny.
2. Centrifugujte po dobu 10 minut při 17,000 x g (13,000 rpm) ve stolní centrifuzě.
3. Pipetováním opatrně odstraňte supernatant.
  - Nedotýkejte se vnitřní strany uzávěru. V případě, že se dotknete, ihned si vyměňte potenciálně kontaminované rukavice.
4. Přidejte 180 µl lysozyme mix (20 mg/ml lysozymu; 20 mM Tris-HCl (pH 8.0); 2 mM EDTA; 1.2% Triton™) a rozsuspendujte pelet pipetováním.
5. Inkubujte po dobu nejméně 1 hodiny při 37°C v thermobloku, nebo v thermomixeru.
  - Nedoporučujeme používat vodní lázeň.
6. Krátce centrifugujte, aby došlo k odstranění kapek z vnitřní strany uzávěru.
  - Po každém inkubačním kroku krátce centrifugujte, aby došlo k odstranění kapek z vnitřní strany uzávěru.

7. Přidejte 20 µl Proteinázy K a 200 µl AL buffer s přidanou carrier RNA a IC (viz výše "Interní kontrola," strana 12).
  - Nedotýkejte se vnitřní strany uzávěru. V případě, že se dotknete, ihned si vyměňte potenciálně kontaminované rukavice.
8. Důkladně promíchejte vortexováním.
9. Inkubujte po dobu 30 minut při 56°C v thermobloku, nebo thermomixeru.
  - Nedoporučujeme používat vodní lázeň.
10. Krátce centrifugujte, aby došlo k odstranění kapek z vnitřní strany uzávěru.
  - Po každém inkubačním kroku krátce centrifugujte, aby došlo k odstranění kapek z vnitřní strany uzávěru.
11. Inkubujte po dobu 15 minut při 95°C.  
**Důležité:** Nepřekračujte inkubační dobu, může to vést k degradaci DNA.
12. **Poznámka:** Pouze po úplné inkubaci při 95°C nejsou dále vzorky infekční. Zchladte vzorky na pokojovou teplotu.
  - Ujistěte se, zda vzorky zchladly z 95°C, v zahřívacím kroku, na pokojovou teplotu, since v opačném případě hrozí extrémní riziko kontaminace aerosolem, po otevření zkumavky.
13. Centrifuge briefly to remove drops from the inside of the lid.

Následujte "Protokol: DNA Purifikace z tkání" v příručce soupravy *QIAamp DNA Mini a Blood Mini* (Třetí vydání, Červen 2012). Začněte přidáním ethanolu v kroku 6 a proveďte finální eluci DNA pomocí 100 µl Buffer AE.

- Ujistěte se, zda není vlhký okraj QIAamp spin kolonky.
- Nedotýkejte se vnitřní strany uzávěru kolonky QIAamp spin. V případě, že se dotknete, ihned si vyměňte potenciálně kontaminované rukavice.
- Nepoužívejte stejnou pipetovací špičku pro různé vzorky, dokonce ani při aplikaci promývacích pufrů AW1 a AW2, nebo elučního pufru AE. Tím zabráníte křížové kontaminaci mezi vzorky a kontaminaci pufrů.
- Použijte každou 2 ml sběrnou zkumavku pouze jednou. V případě, že Vám došly sběrné zkumavky, můžete také použít 2 ml mikrocetrifugační zkumavky, ze kterých byly předtím odstraněny uzávěry.
- Důrazně doporučujeme provádět, v protokole uvedený, doporučený centrifugační krok 10, určený k odstranění zbytkového ethanolu. Doporučujeme prodloužit dobu centrifugace na 3 minuty.

## Interní kontrola

Interní kontrola (M. tuberculosis RG IC) je součástí balení. To umožňuje uživateli kontrolovat jak proces izolace DNA, tak i kontrolu možné inhibice PCR. Za tímto účelem přidejte 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).

**Poznámka:** Interní kontrola a carrier RNA (viz "Izolace DNA," strana 10) by měla být přidána do směsi lyzačního pufru a materiálu vzorku nebo přímo do lyzačního pufru.

Interní kontrola nesmí být přidána přímo do materiálu vzorku. V případě, že je přidána do lyzačního pufru, vězte, že směs interní kontroly a lyzačního pufru/carrier RNA by měla být připravena 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.

**Poznámka:** Nepřidávejte přímo interní kontrolu a carrier RNA do materiálu vzorku.

## Kvantifikace

Pro vytvoření standardní křivky na přístrojích Rotor-Gene Q, by měly být použity všechny 4 kvantifikační standardy a definovány v dialogovém okně **Edit Samples** jako standardy s příslušnými koncentracemi (naleznete v uživatelské příručce k přístroji).

Standardní křivka, vytvořená tak, jak je popsáno výše, může být použita také v následujících bězích, za předpokladu, že alespoň jeden o dané koncentraci je použit v současném běhu. Pro tento účel je nutné importovat, předtím vytvořenou, standardní křivku (naleznete v uživatelské příručce k přístroji). Nicméně tato kvantifikační metoda může vést k odchylkám ve výsledcích, z důvodu variability mezi jednotlivými PCR běhy.

Pro zajištění přesné kvantifikace, je důrazně doporučeno přidat interní kontrolu M. tuberculosis RG Master a M. tuberculosis RG Mg-Sol k použitým kvantifikačním standardům. Za tímto účelem přidejte interní kontrolu přímo do M. tuberculosis RG Master a M. tuberculosis RG Mg-Sol, tak jak je popsáno v kroku 2 tohoto protokolu (strana 13). Tento mastermix použijte pro každý kvantifikační standard (M. tuberculosis RG/TM QS 1–4).

Kvantifikační standardy jsou definovány jako počet kopií/µl. Následující rovnice se používá pro převod hodnot určených pomocí standardní křivky na počet kopií/ml v materiálu vzorku:

$$\text{Výsledky (kopie/ml)} = \frac{\text{Výsledek (kopie/}\mu\text{l)} \times \text{Eluční objem (}\mu\text{l)}}{\text{Objem vzorku (ml)}}$$

V zásadě by měl být zapsán počáteční objem vztoku, do výše uvedené rovnice. S tímto je nutné počítat, jestliže byl změněn objem vzorku před vlastní extrakcí nukleových kyselin (např., při zakoncentrování vzorku centrifugací, nebo zvýšení objemu doplněním na požadovaný objem).

## PCR na přístrojích Rotor-Gene Q

- Udělejte si čas, abyste se mohli seznámit s přístrojem Rotor-Gene Q před zahájením protokolu. Veškeré informace nalezne v uživatelské příručce přístroje.
  - Ujistěte se, že v PCR běhu byl použit alespoň jeden kvantifikační standard, stejně tak negativní kontrola (Voda „PCR grade“). Pro tvorbu standardní křivky použijte všechny 4 dodávané kvantifikační standardy (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1–4) v každém běhu.
  - Ujistěte se, že byl chladicí blok (příslušenství přístroje Rotor-Gene) vychlazen na 2–8°C.
  - Před každým použitím je nezbytné veškerá činidla nechat kompletně roztát, promíchat (opakovaným pipetováním, nebo krátkým vortexováním) s následnou krátkou centrifugací.
1. Vložte požadované množství PCR zkumavek do adaptérů chladicího bloku.
  2. Připravte master mix podle následující tabulky:

	Počet vzorků	
	1	12
M. tuberculosis RG Master	13 $\mu\text{l}$	156 $\mu\text{l}$
M. tuberculosis RG Mg-Sol	2 $\mu\text{l}$	24 $\mu\text{l}$
<b>Celkový objem</b>	<b>15 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>180 <math>\mu\text{l}</math></b>

3. Napipetujte 15  $\mu\text{l}$  master mixu do každé PCR zkumavky. Potom přidejte 10  $\mu\text{l}$  elulovaného vzorku DNA (viz tabulka níže).

Odpovídajícím způsobem přidejte 10  $\mu\text{l}$ , alespoň jednoho, kvantifikačního standardu (*M. tuberculosis* RG QS 1–4). Tento standard musí být použit jako pozitivní kontrola a 10  $\mu\text{l}$  vody (Voda, „PCR grade“), sloužící jako negativní kontrola.

	Počet vzorků	
	1	12
Master mix	15 µl	15 µl každý
Vzorek	10 µl	10 µl každý
<b>Celkový objem</b>	<b>25 µl</b>	<b>25 µl každý</b>

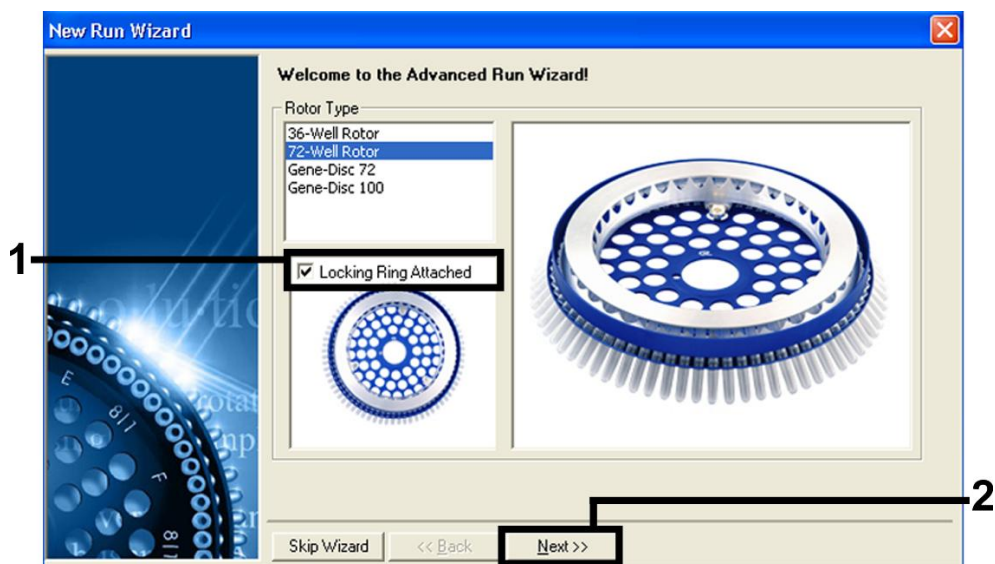
- Zavřete PCR zkumavky.
- Ujistěte se, že locking ring (příslušenství přístroje Rotor-Gene) je umístěn na vrchu rotoru. Zabrání to náhodnému otevření zkumavek během běhu.
- Pro detekci všech zástupců komplexu *M. tuberculosis*, vytvořte teplotní podle následujících instrukcí:

<b>Nastavení obecných parametrů testu</b>	<b>Obrázky 1, 2 a 3</b>
<b>Úvodní aktivace hot start enzymu</b>	<b>Obrázek 4</b>
<b>Amplifikace DNA</b>	<b>Obrázek 5</b>
<b>Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů</b>	<b>Obrázek 6</b>
<b>Start běhu</b>	<b>Obrázek 7</b>

Veškeré specifikace se vztahují k přístrojům a software Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q software verze 1.7.94, Rotor Gene 6000 software verze 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 a Rotor-Gene 3000 software verze 6.0.23. Další informace o programování přístrojů Rotor-Gene naleznete v uživatelské příručce.

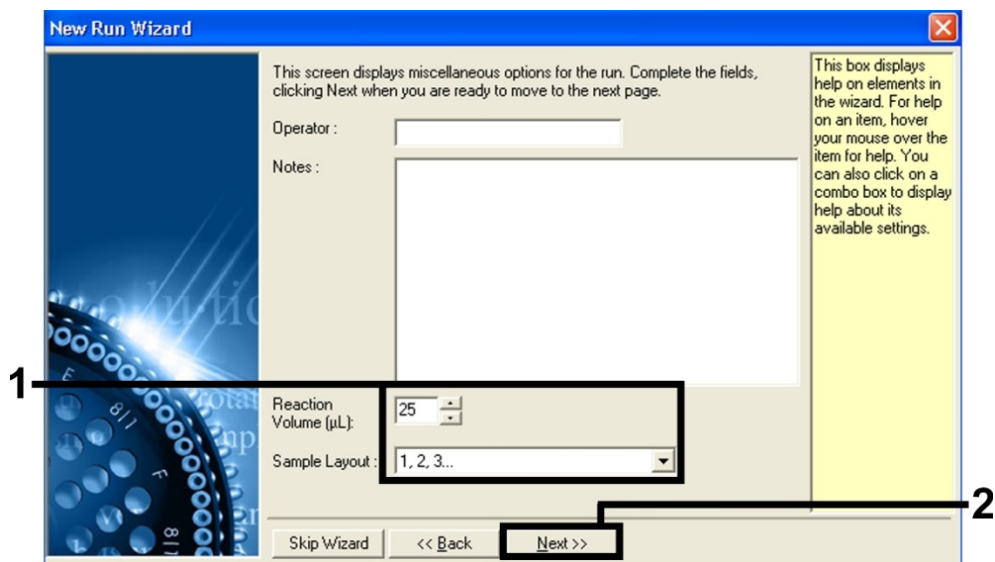
Na obrázcích jsou tato nastavení zarámována tučnou černou čarou. Ilustrace jsou uvedeny pro přístroje Rotor-Gene Q. Tam, kde jsou požadovány odlišné hodnoty pro přístroje Rotor-Gene 3000, jsou tyto rozdíly popsány v textu.

7. Nejprve otevřete dialogové okno **New Run Wizard** (Obrázek 1). Zaškrtněte políčko **Locking Ring Attached** a klikněte na **Next**.



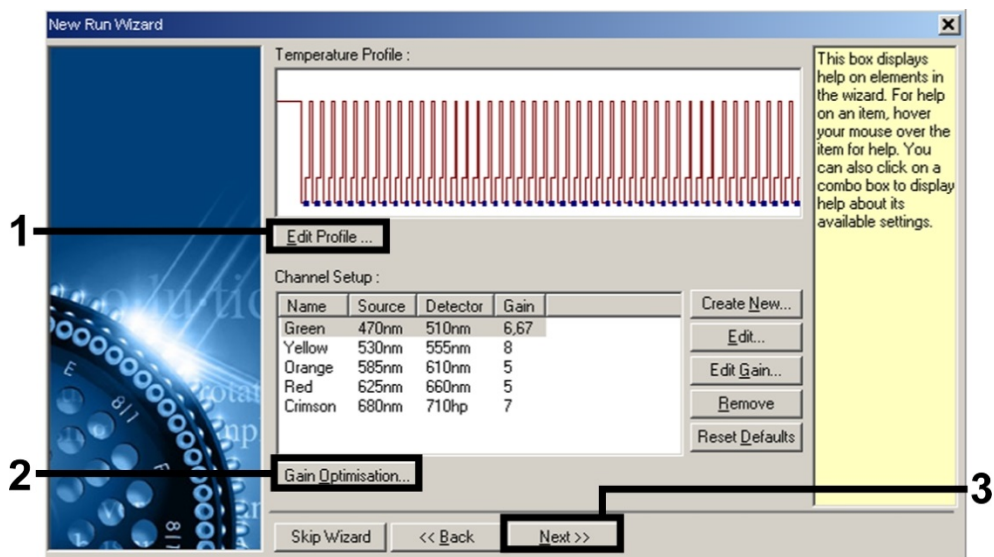
Obrázek 1. Dialogové okno **The New Run Wizard**.

8. Vyberte **25** pro PCR reakční objem a klikněte na **Next** (Obrázek 2).

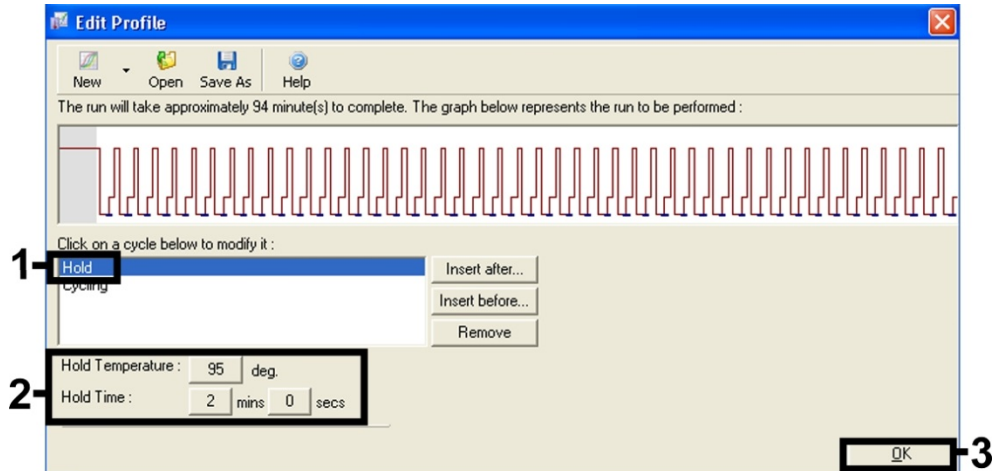


Obrázek 2. Nastavení obecných parametrů testu.

9. Klikněte na tlačítko **Edit Profile**, v následujícím dialogovém okně **New Run Wizard** (Obrázek 3) a naprogramujte teplotní profil, tak jak je uvedeno na Obrázku 4 a 5.

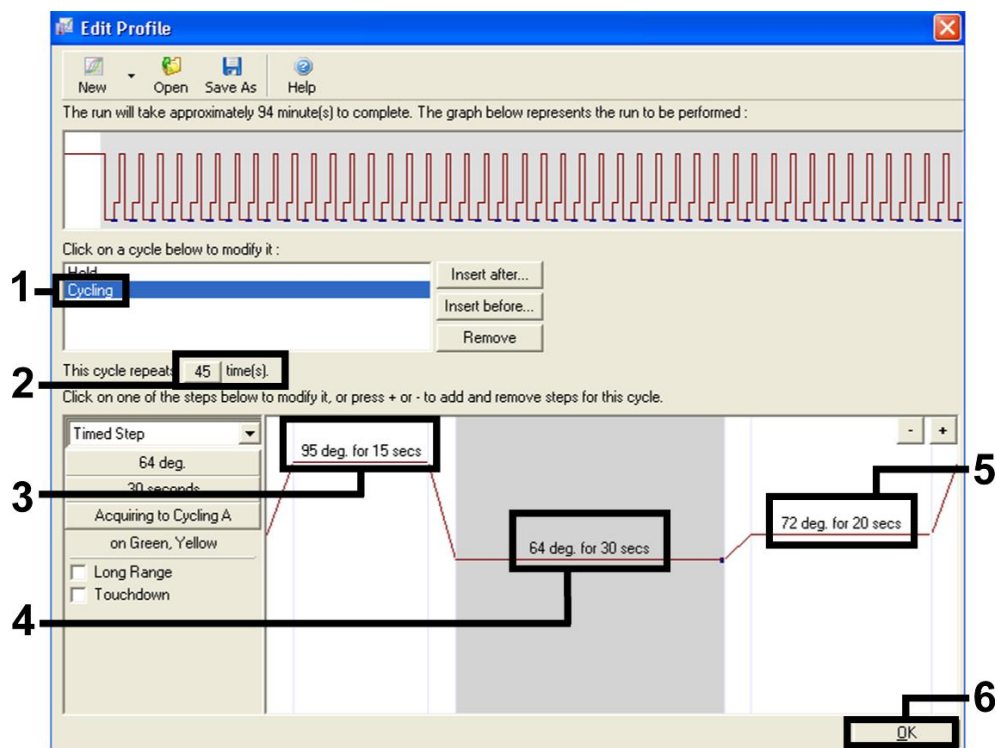


Obrázek 3. Editace profilu.



Obrázek 4. Úvodní aktivace hot-start enzymu.



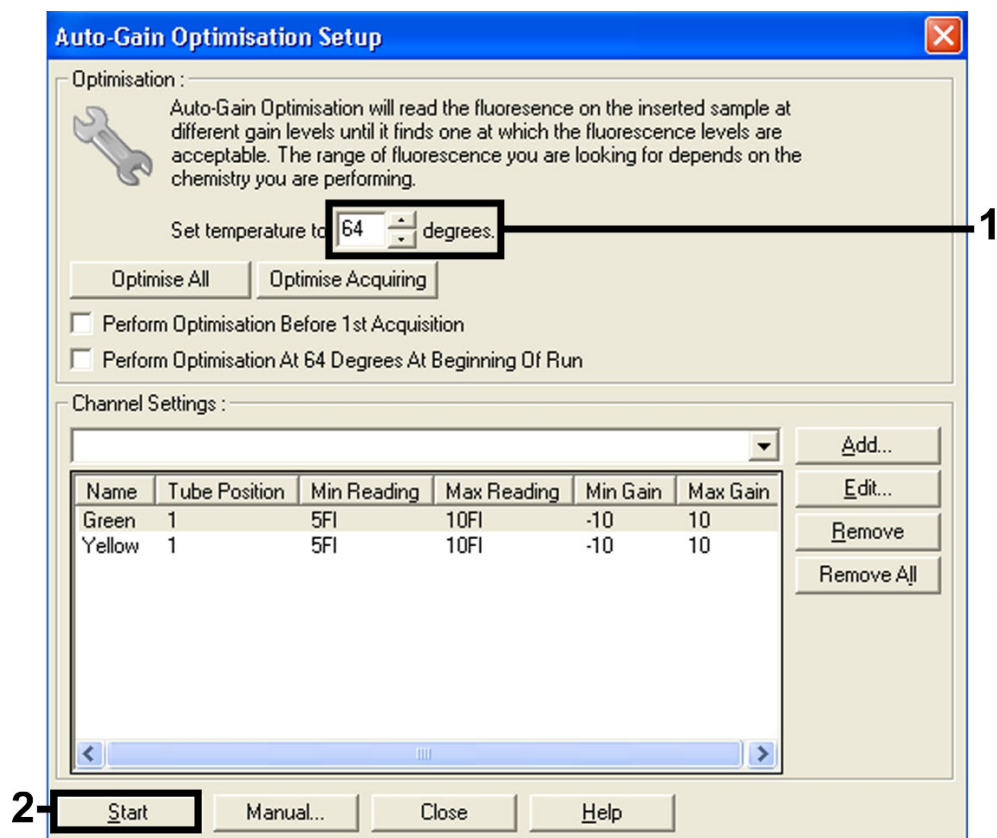


**Obrázek 5. Amplifikace DNA.**

**Poznámka:** Na přístroji Rotor-Gene 3000, software nadefinuje fluorescenční barviva jako **FAM/Sybr®**, **JOE**.

10. Detekční rozsah fluorescenčních kanálů je určen na základě fluorescenčních intenzit v PCR zkumavkách, Klikněte na **Gain Optimisation** v dialogovém okně **New Run Wizard** (viz Obrázek 3), tím otevřete dialogové okno **Auto-Gain Optimisation Setup**.

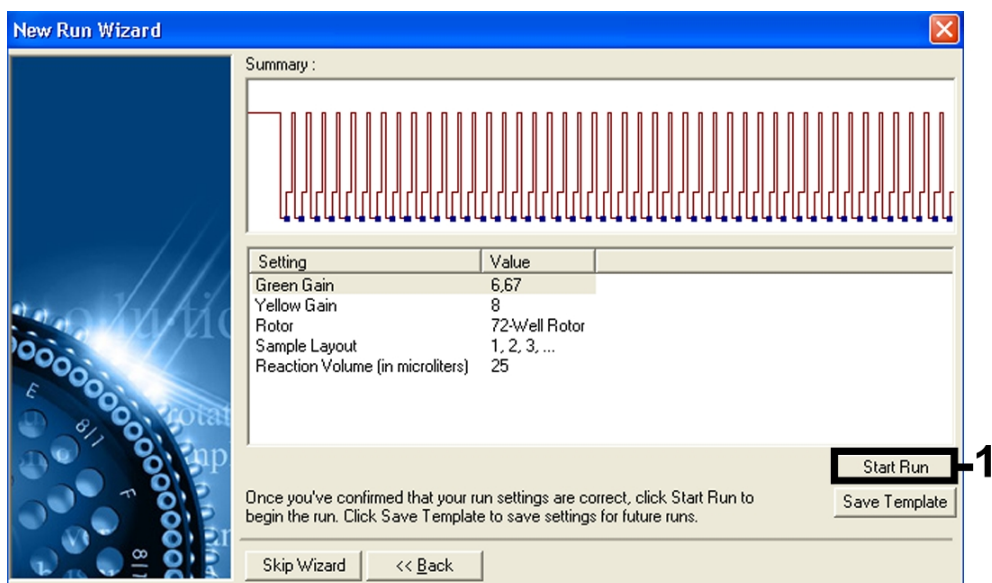
11. Nastavte kalibrační teplotu na **64** tak, aby odpovídala teplotě anealingu amplifikačního programu (Obrázek 6).



**Obrázek 6. Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů.**

**Poznámka:** Na přístroji Rotor-Gene 3000, software nadefinuje fluorescenční barviva jako **FAM/Sybr** a **JOE**.

12. Hodnoty zisku určené kalibrací jsou automaticky uloženy a jsou uvedeny v posledním nabídkovém okně programování (Figure 7). Klikněte na **Start Run**.



**Obrázek 7. Start běhu.**

**Poznámka:** Na přístroji Rotor-Gene 3000 software nadefinuje fluorescenční barviva jako **FAM/Sybr** a **JOE**.

13. Po skončení běhu analyzujte data podle instrukcí uvedených v kapitole "Interpretace výsledků," strana 20.

## Interpretace výsledků

Příklady pozitivních a negativních PCR reakcí jsou uvedeny v Obrázku 8 a Obrázku 9.

Možné jsou následující výsledky:

- Signál je detekován ve fluorescenčním kanále **Cycling Green**.

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

V tomto případě není bezpodmínečně nutná detekce signálu ve fluorescenčním kanále **Cycling Yellow**, protože úvodní vysoké koncentrace DNA komplexu *M. tuberculosis* (pozitivní signál v kanále **Cycling Green**) může vést ke snížení, nebo absenci fluorescenčního signálu interní kontroly v kanále **Cycling Yellow** (kompetice).

**Poznámka:** Na přístroji Rotor-Gene 3000 jsou odpovídajícími kanály **Cycling A.FAM** pro pozitivní signál a **Cycling A.JOE** pro interní kontrolu.

- Jestliže není detekován signál ve fluorescenčním kanále **Cycling Green**, přičemž ve stejné době je detekován signál ve fluorescenčním kanále pro interní kontrolu, **Cycling Yellow**, je vzorek negativní.

Jestliže ve vzorku není detekovatelná DNA komplexu *M. tuberculosis*. Je možné ho považovat za negativní.

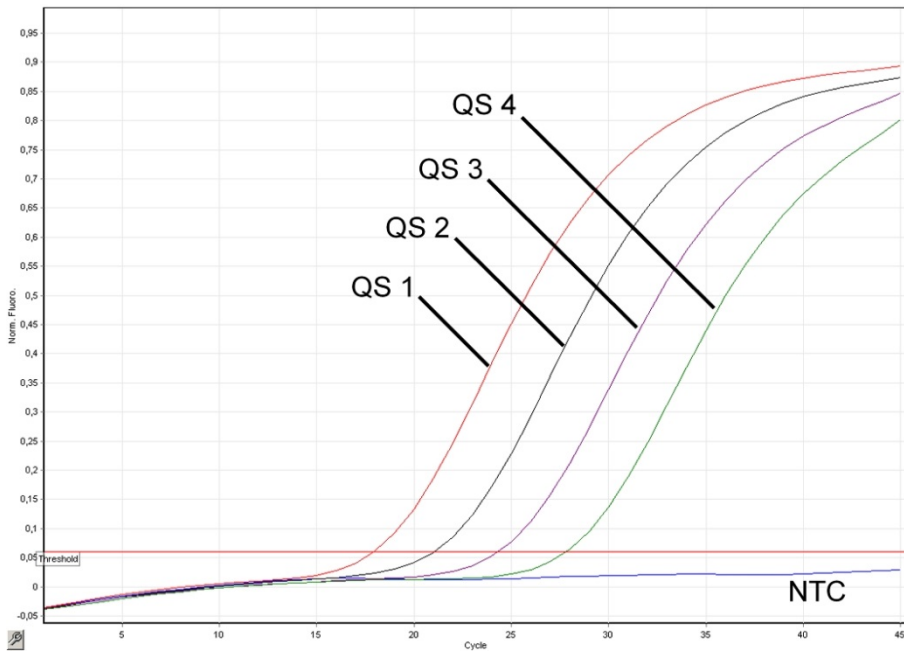
V případě negativní PCR komplexu *M. tuberculosis*, detekovaný signál v IC vylučuje možnost inhibice PCR reakce.

**Poznámka:** Na přístroji Rotor-Gene 3000 jsou odpovídajícími kanály **Cycling A.JOE** pro interní kontrolu a nedostatek signálu v kanále **Cycling A.FAM**.

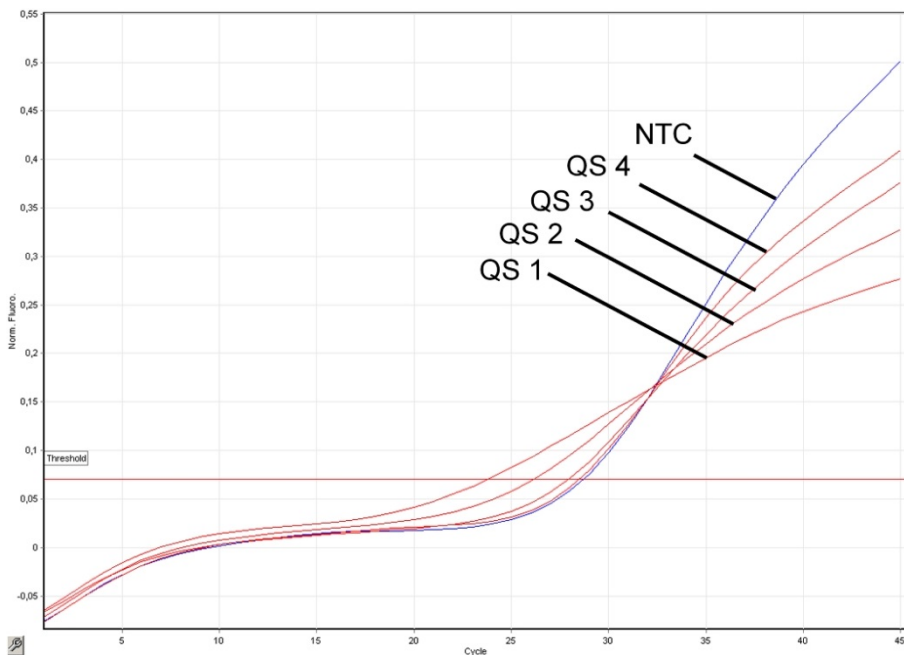
- Jestliže není detekovaný signál v kanále **Cycling Green**, nebo v kanále **Cycling Yellow**, nemohou být učiněny žádné závěry.

**Poznámka:** Na přístroji Rotor-Gene 3000, jsou odpovídajícími kanály **Cycling A.FAM** a **Cycling A.JOE**.

Informace týkající se zdrojů chyb a jejich řešení, můžete najít v kapitole "Řešení problémů," strana 22.



**Obrázek 8. Detekce kvantifikačních standardů (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1–4) ve fluorescenčním kanále Cycling Green. NTC: kontrola bez templátu (negativní kontrola).**



**Obrázek 9. Detekce interní kontroly ve fluorescenčním kanále Cycling Yellow se simultální amplifikací kvantifikačních standardů (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1–4). NTC: kontrola bez templátu (negativní kontrola).**

## Řešení problémů

Tento průvodce řešením problémů může být užitečný při řešení jakýchkoliv problémů, které se mohou vyskytnout.

### Náměty a připomínky

---

#### **Žádný signál pro pozitivní kontroly (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1–4) ve fluorescenčním kanále Cycling Green nebo Cycling A.FAM**

- |  |   |
|--|---|
| a) Vybraný fluorescenční kanál pro analýzu PCR dat není kompatibilní s protokolem. | Pro analýzu dat vyberte fluorescenční kanál <b>Cycling Green</b> nebo <b>Cycling A.FAM</b> pro analyzovaný PCR komplex <i>M. tuberculosis</i> a fluorescenční kanál <b>Cycling Yellow</b> nebo <b>Cycling A.JOE</b> pro interní kontrolu PCR. |
| b) Nesprávně naprogramovaný teplotní profil přístroje Rotor-Gene.                  | Porovnejte teplotní profil s protokolem (viz "PCR na přístrojích Rotor-Gene Q," strana 13).   |
| c) Nesprávná konfigurace PCR reakce.   | Zkontrolujte svůj pracovní postup s pipetovacím schématem (viz "PCR na přístrojích Rotor-Gene Q" strana 13) a v případě nutnosti opakujte PCR.  |
| d) Nebyly dodrženy podmínky skladování jedné nebo více součástí soupravy           | Zkontrolujte skladovací podmínky (viz "Skladování a manipulace s činidly," strana 8) a datum expirace (viz etiketa soupravy) činidel. V případě nutnosti použijte novou soupravu.   |
| e) Vypršela doba použitelnosti soupravy <i>artus M. tuberculosis</i> RG PCR Kit.   | Zkontrolujte skladovací podmínky (viz "Skladování a manipulace s činidly," strana 8) a datum expirace (viz etiketa soupravy) činidel. V případě nutnosti použijte novou soupravu.   |

#### **Slabý nebo žádný signál ve fluorescenčním kanále pro interní kontrolu - Cycling Yellow nebo Cycling A.JOE a simultánní absence signálu v kanále Cycling Green nebo Cycling A.FAM pro specifický PCR komplex *M. tuberculosis***

- |   |   |
|---|---|
| a) Podmínky PCR nejsou v souladu s protokolem | Zkontrolujte podmínky PCR (viz "Žádný signál ve fluorescenčním kanále pro pozitivní kontrolu [ <i>M. tuberculosis</i> RG QS 1–4] Cycling Green nebo Cycling |
|---|---|

## Náměty a připomínky

---

- A.FAM," viz výše). V případě nutnosti opakujte PCR se správně nastavenými podmínkami.
- b) PCR byla inhibována
- Ujistěte se, zda byla použita doporučená metoda extrakce (viz "Izolace DNA," strana 10) a pozorně sledujte pokyny výrobce.
- Ujistěte se, že během izolace DNA byl proveden doporučený dodatečný krok centrifugace, před závěrečnou elucí. Tento krok odstraní zbytkový ethanol (viz "Izolace DNA," strana 10).
- c) DNA byla ztracena během izolace
- V případě, že byla interní kontrola přidána do extrakce, chybějící signál interní kontroly může indikovat ztrátu DNA během extrakce. Ujistěte se, že byla použita doporučená metoda extrakce (viz "Izolace DNA," strana 10) a pozorně sledujte pokyny výrobce.
- d) Nebyly dodrženy podmínky skladování jedné nebo více součástí soupravy
- Zkontrolujte skladovací podmínky (viz "Skladování a manipulace s činidly," strana 8) a datum expirace (viz etiketa soupravy) činidel. V případě nutnosti použijte novou soupravu.
- e) Vypršela doba použitelnosti soupravy *artus* M. tuberculosis RG PCR Kit.
- Zkontrolujte skladovací podmínky (viz "Skladování a manipulace s činidly," strana 8) a datum expirace (viz etiketa soupravy) činidel. V případě nutnosti použijte novou soupravu.

## Signals with the negative controls in fluorescence channel Cycling Green or Cycling A.FAM of the analytical PCR

- a) Došlo ke kontaminaci v průběhu přípravy PCR
- Opakujte PCR s novými činidly v replikátech.
- Pokud je to možné, uzavřete PCR zkumavky, které mají být testovány, bezprostředně po přidání vzorku.

### Náměty a připomínky

---

Ujistěte se, že pozitivní kontrola byla pipetována jako poslední.

Ujistěte se, že pracovní prostor a nástroje jsou dekontaminovány v pravidelných intervalech.

b) Došlo ke kontaminaci v průběhu extrakce.

Opakujte extrakci a PCR vzorků, jež mají být testovány, při použití nových činidel.

Ujistěte se, že pracovní prostor a nástroje jsou dekontaminovány v pravidelných intervalech.

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

## Kontrola kvality

V souladu s QIAGEN ISO-certified Quality Management System, každá šarže soupravy *artus M. tuberculosis RG PCR Kit* je testována proti předem stanoveným specifikacím k zajištění konstatní kvality výrobků.

## Omezení

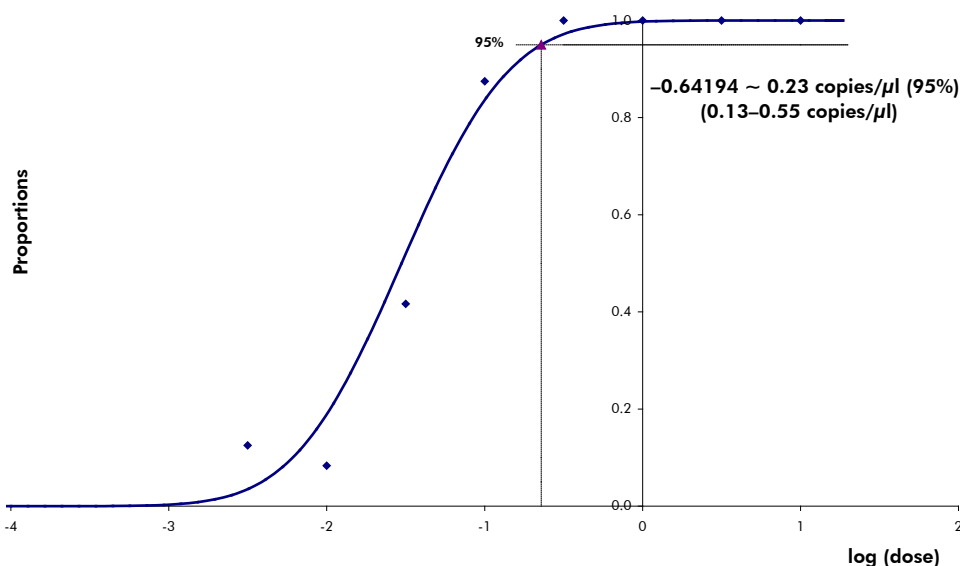
- Všechna činidla mohou být výlučně použita v *in vitro* diagnostice
- Výrobek má být používán pouze speciálně vyškoleným a trénovaným personálem v *in vitro* diagnostických postupech.
- Je požadováno striktní dodržování instrukcí v uživatelské příručce, pro dosažení optimálních výsledků PCR.
- Měla 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, mutace 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 navrženého testu jsou vyhodnocovány v pravidelných intervalech.



# Funkční charakteristiky

## Analytická senzitivita

Aby bylo možné určit analytickou senzitivitu the *artus* M. tuberculosis RG PCR Kit, standardní ředící řada byla vytvořena od 10 do celkového počtu 0.003 a od 10 do celkového počtu 0.05 *M. tuberculosis* genomových ekvivalentů/μl a analyzována na přístrojích Rotor-Gene 6000 a Rotor-Gene 3000 v tomto pořadí v kombinaci se soupravou *artus* M. tuberculosis RG PCR Kit. Testování bylo provedeno ve 3 různých dnech v 8 replikátech. Výsledky byly stanoveny probit analýzou. Grafické znázornění probit analýzy na přístroji Rotor-Gene 6000 je zobrazeno na Obrázku 10. Analytický detekční limit soupravy *artus* M. tuberculosis RG PCR Kit v kombinaci s Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 a v kombinaci s Rotor-Gene 3000 je 0.23 kopií/μl ( $p = 0.05$ ) a 0.9 kopií/μl ( $p = 0.05$ ). Znamená to, že je 95% pravděpodobnost, že 0.23 kopií/μl nebo 0.9 kopií/μl bude detekováno.



**Obrázek 10. Probit analýza: *M. tuberculosis* (Rotor-Gene 6000).** Analytická senzitivita soupravy *artus* M. tuberculosis RG PCR Kit na přístroji Rotor-Gene 6000.

## Specifita

Specifita soupravy *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit je v první řadě zajištěna výběrem primerů 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*

Kromě toho byla specifita validována s 90 různými negativními vzorky komplexu *M. tuberculosis* (30 sputum, 30 BAL a 30 vzorků bronchiálního komplexu). Tyto vzorky negenerovaly žádný signál s primery a sondami komplexu *M. tuberculosis*, které jsou zahrnuty v *M. tuberculosis* RG Master.

K určení specifity soupravy *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit, jsme testovali křížovou reaktivitu s kontrolní skupinou uvedenou v Tabulce 1. Žádný z uvedených patogenů nebyl reaktivní.

**Tabulka 1. Testování specifity soupravy s potenciálně křížově-reaktivními patogeny**

Kontrolní skupina	<i>M. tuberculosis</i> (Cycling Green nebo Cycling A.FAM)	Interní kontrola (Cycling Yellow nebo Cycling A.JOE)
<i>Actinomyces israelii</i>	–	+
<i>Aeromonas hydrophila</i>	–	+
<i>Bordetella pertussis</i>	–	+
<i>Candida albicans</i>	–	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	–	+
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	–	+
<i>Citrobacter freundii</i>	–	+
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	–	+
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	–	+
<i>Cryptococcus neoformans</i>	–	+
<i>Eikenella corrodens</i>	–	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	–	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	–	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	–	+

<b>Kontrolní skupina</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> (Cycling Green nebo Cycling A.FAM)</b>	<b>Interní kontrola (Cycling Yellow nebo Cycling A.JOE)</b>
<i>Enterococcus faecium</i>	–	+
<i>Escherichia coli</i>	–	+
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp. <i>polymorphum</i>	–	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	–	+
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	–	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	–	+
<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>avium</i>	–	+
<i>Mycobacterium celatum</i>	–	+
<i>Mycobacterium chelonae</i>	–	+
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	–	+
<i>Mycobacterium gordonae</i>	–	+
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	–	+
<i>Mycobacterium kansasii</i>	–	+
<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	–	+
<i>Mycobacterium malmoeense</i>	–	+
<i>Mycobacterium marinum</i>	–	+
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	–	+
<i>Mycobacterium szulgai</i>	–	+
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	–	+
<i>Mycobacterium xenopi</i>	–	+
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	–	+
<i>Neisseria meningitidis</i>	–	+
<i>Nocardia asteroides</i>	–	+
<i>Nocardia brasiliensis</i>	–	+

<b>Kontrolní skupina</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> (Cycling Green nebo Cycling A.FAM)</b>	<b>Interní kontrola (Cycling Yellow nebo Cycling A.JOE)</b>
<i>Nocardia farcinia</i>	–	+
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	–	+
<i>Peptostreptococcus productus</i>	–	+
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	–	+
<i>Prevotella denticola</i>	–	+
<i>Propionibacterium acnes</i>	–	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	–	+
<i>Salmonella typhi</i>	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	–	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	–	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	–	+
<i>Streptococcus mutans</i>	–	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	–	+
<i>Streptomyces venezuelae</i>	–	+
<i>Veillonella parvula</i>	–	+
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	–	+

## Přesnost

Přesné údaje o soupravě *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit byly nashromážděny pomocí přístrojů Rotor-Gene 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 soupravě *artus M. tuberculosis RG PCR Kit* byly nashromážděny použitím kvantifikačních standardů s nejnižší koncentrací (QS 4; 30 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 Tabulka 2). Kromě toho přesnost dat pro kvantitativní výsledky počtu kopií/μl byly stanoveny pomocí odpovídajících  $C_T$  hodnot (viz Tabulka 3). Na základě těchto výsledků, celkový statistický rozptyl každého vzorku o uvedené koncentraci je 1.26% ( $C_T$ ) nebo 14.64% (kopií/μl) a pro detekci IC 1.57% ( $C_T$ ). Tyto hodnoty jsou založeny na souhrnu všech jednotlivých stanovených hodnot variabilit.

**Tabulka 2. Přesné údaje na základě  $C_T$  hodnot**

	Standardní odchylka	Odchylka	Variační koeficient (%)
Variabilita v rámci testu: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0.10	0.01	0.32
Variabilita v rámci testu: Internal Control	0.13	0.02	0.45
Variabilita v rámci testu: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0.24	0.06	0.78
Variabilita v rámci testu: Internal Control	0.29	0.08	0.95
Variabilita mezi šaržemi: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0.39	0.15	1.28
Variabilita mezi šaržemi: Internal Control	0.66	0.43	2.16
Celková variabilita: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0.38	0.15	1.26
Celková variabilita: Internal Control	0.48	0.23	1.57

**Tabulka3. Přesná data na základě kvantitativních dat (v počtu kopií/μl)**

	Standardní odchylka	Odchylka	Variační koeficient (%)
Variabilita v rámci testu: M. tuberculosis RG/TM QS 4	1.97	3.90	6.56
Variabilita v rámci testu: M. tuberculosis RG/TM QS 4	3.93	15.43	13.00
Variabilita mezi šaržemi: M. tuberculosis RG/TM QS 4	5.51	30.41	18.09
Celková variabilita: M. tuberculosis RG/TM QS 4	4.44	19.69	14.64

## Robustnost

Ověření robustnosti umožňuje stanovení celkové chybovosti soupravy *artus* M. tuberculosis RG PCR Kit. Celkem 30 negativních vzorků komplexu *M. tuberculosis* každého sputa, BAL a bronchiálního sekretu bylo obohaceno o 3 kopie/μl elučního objemu *M. tuberculosis* kontrolní DNA (přibližně 3-násobné koncentrace limitu analytické senzitivity). Po extrakci při použití QIAamp DNA Mini Kit (viz "Izolace DNA" strana **Fehler! Textmarke nicht definiert.**) byly tyto vzorky analyzovány soupravou *artus* M. tuberculosis RG PCR Kit. Pro všechny vzorky *M. tuberculosis* samples, dosáhla chybovost hodnoty 0%. Kromě toho byla posuzována i robustnost interní kontroly purifikací a analýzou vzorků komplex-negativních *M. tuberculosis* ze sputa, BAL a vzorků bronchiálního sekretu (30 každý). Celková chybovost byla 0%. Inhibice nebyly pozorovány. Tedy, robustnost souprav *artus* M. tuberculosis RG PCR Kit je ≥ 99%.









## Reprodukovatelnost


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

## Referenci

1. 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 známka pro Evropskou shodu
	Pro In vitro diagnostiku zdravotnických zařízení
 <N>	Obsahuje dostatečné množství činidel pro <N> testů

Symbol	Definice symbolu
<b>COMP</b>	Komponenty
<b>CONT</b>	Obsahuje
<b>NUM</b>	Číslo
<b>GTIN</b>	číslo položky „Global Trade“
	Teplotní omezení
<b>QS</b>	Kvantifikační standard
<b>IC</b>	Interní kontrola
<b>Mg-Sol</b>	Roztok hořčíku



## Informace pro objednání

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>artus</i> M. tuberculosis RG PCR Kit (24)	Pro 24 reakcí: Master, Mg Solution, 4 Kvantifikační standardy, Interní kontrolka, Voda („PCR grade“)	4555263
<i>artus</i> M. tuberculosis RG PCR Kit (96)	Pro 96 reakcí: Master, Mg Solution, 4 Kvantifikační standardy, Interní kontrolka, Voda („PCR grade“)	4555265
<b>QIAamp DNA Mini Kit — pro izolaci genomické, mitochondriální, bakteriální, parazitické, nebo virové DNA</b>		
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Pro 50 DNA prepů: 50 kolonek QIAamp Mini Spin, QIAGEN Proteinase K, Reagents, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	51304
<b>Rotor-Gene Q MDx a příslušenství</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Real-time PCR cycler s 5 kanály (green, yellow, orange, red, crimson), laptop, software, příslušenství: zahrnuje 1-letou záruku na součástky a práci, nezahrnuje instalaci a zaškolení	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Real-time PCR cycler s 5 kanály (green, yellow, orange, red, crimson), laptop, software, příslušenství: zahrnuje 1-letou záruku na součástky a práci, nezahrnuje instalaci a zaškolení	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cycler a High Resolution Melt analyzer s 5 kanály (green, yellow, orange, red, crimson) plus HRM kanál, laptop, software, příslušenství: zahrnuje 1-letou záruku na součástky a práci, nezahrnuje instalaci a zaškolení	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cycler a High Resolution Melt analyzer s 5 kanály (green, yellow, orange, red, crimson) plus HRM kanál, laptop, software, příslušenství: zahrnuje 1-letou záruku na součástky a práci, nezahrnuje instalaci a zaškolení	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Real-time PCR přístroj s 6 kanály (blue, green, yellow, orange, red, crimson), zahrnuje laptop, software, příslušenství: zahrnuje 1-letou záruku na součástky a práci, nezahrnuje instalaci a zaškolení	9002042

Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Real-time PCR přístroj s 6 kanály (blue, green, yellow, orange, red, crimson), zahrnuje laptop, záruku na součástky a práci, nezahrnuje instalaci a zaškolení	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Real-time PCR cycler s 2 kanály (green, yellow), laptop, software, příslušenství: zahrnuje 1-letou záruku na součástky a práci, nezahrnuje instalaci a zaškolení	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Real-time PCR cycler s 2 kanály (green, yellow), laptop, software, příslušenství: zahrnuje 1-letou záruku na součástky a práci, nezahrnuje instalaci a zaškolení	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Real-time PCR cycler a High Resolution Melt analyzer s 2 kanály (green, yellow) plus HRM kanál, laptop, software, příslušenství: zahrnuje 1-letou záruku na součástky a práci, nezahrnuje instalaci a zaškolení	9002012
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Real-time PCR cycler a High Resolution Melt analyzer s 2 kanály (green, yellow) plus HRM kanál, laptop, software, příslušenství: zahrnuje 1-letou záruku na součástky a práci, nezahrnuje instalaci a zaškolení	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Hliníkový blok pro manuální přípravu reakce pomocí jednonanálové pipety v 72 x 0.1 ml zkumavkách	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Hliníkový blok pro manuální přípravu reakce ve standardním formátu 8 x 12 array, použitím 96 x 0.2 ml zkumavek	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 stripů o 4 zkumavkách a uzávěry pro 1000 reakcí	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 stripů o 4 zkumavkách a uzávěry pro 10,000 reakcí	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 tenkostěných zkumavek pro 1000 reakcí	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 tenkostěných zkumavek pro 1000 reakcí	981008

Pro aktuální licenční informace a produktově-specifická prohlášení, viz příslušná QIAGEN kit uživatelská příručka, nebo uživatelský manuál. QIAGEN kit uživatelské příručky a uživatelské manuály jsou dostupné na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com), nebo mohou být vyžádány od QIAGEN Technical Service, nebo od vašeho místního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); FAM™, JOE™, SYBR® (Life Technologies); 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.

Souprava *artus M. tuberculosis* RG 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 jsou dostupné na [www.qiagen.com](http://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.

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 příložených komponent soupravy s komponenty, které nejsou zahrnuty v této soupravě, s výjimkou případů uvedených v protokolech dodávaných s produktem, tímto manuálem a dodatečných protokolech dostupných na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Některé z těchto dodatečných protokolů byly poskytnuty QIAGEN uživateli pro uživatele QIAGEN. Tyto protokoly 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 zákazníky 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 aktualizovanou licenční ustanovení, viz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-0058-007 151031225 10/2015 © 2007–2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.



