

Outubro de 2015

# Manual do kit *artus*<sup>®</sup> M. tuberculosis RG PCR



Versão 1

Diagnóstico in vitro quantitativo

Para utilização com instrumentos Rotor-Gene<sup>®</sup> Q

IVD



REF

4555263 (24 reações)  
4555265 (96 reações)



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1  
40724 Hilden  
ALEMANHA

R5 MAT

1046960PT

# Índice

Utilização prevista.....	4
Resumo e explicação .....	4
Princípio do procedimento.....	4
Materiais fornecidos .....	6
Conteúdo do kit .....	6
Materiais necessários, mas não fornecidos.....	7
Avisos e precauções .....	8
Advertências .....	8
Armazenamento e manuseamento de reagentes.....	8
Procedimento.....	9
Pontos importantes antes de iniciar o procedimento .....	9
Isolamento de ADN.....	10
Controlo interno.....	12
Quantificação.....	12
PCR em instrumentos Rotor-Gene Q.....	13
Interpretação dos resultados .....	20
Resolução de problemas .....	22
Controlo de qualidade.....	24
Limitações.....	24
Características de desempenho.....	25
Sensibilidade analítica.....	25
Especificidade .....	26
Precisão.....	28
Robustez .....	30
Reprodutibilidade.....	30
Referências.....	31
Símbolos .....	31
Informações para encomenda.....	33



## Utilização prevista

O kit *artus M. tuberculosis* RG PCR é um teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* para a detecção de todos os membros do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*,

*M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. pinnipedi*) em amostras humanas de expetoração, LBA, secreções brônquicas, LCR, fluido estomacal ou de punção peritoneal. Este kit de teste de diagnóstico utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) e está configurado para ser utilizado com os instrumentos Rotor-Gene Q.

## Resumo e explicação

A tuberculose (TB) continua a ser uma das doenças infecciosas mais relevantes em todo o mundo. Cerca de dois mil milhões de pessoas, um terço da população mundial, estão infetados com *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da TB. A incidência de TB em todo o mundo é de cerca de 8 milhões e cerca de 3 milhões de pessoas irão morrer todos os anos. A TB é uma doença reemergente nos países industrializados, principalmente devido à imigração de pessoas infetadas e ao desenvolvimento de TB resistente aos medicamentos. Os sem-abrigo, toxicodependentes e as pessoas imunocomprometidas são desproporcionadamente afetadas pela doença.

A TB é uma doença crónica e cíclica que afeta principalmente os pulmões e os nódulos linfáticos associados. No entanto, dependendo do estado de imunidade do paciente, a bactéria *M. tuberculosis* pode também colonizar outros órgãos. A TB é transmitida principalmente de pessoa para pessoa através de aerossóis. Apenas as pessoas com a doença ativa são contagiosas. Em pessoas imunossuprimidas, em particular, a bactéria *M. tuberculosis* pode ser reativada (recrudescente) vários anos após a infeção inicial.

## Princípio do procedimento

O diagnóstico de agentes patogénicos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) baseia-se na amplificação de regiões específicas do genoma do agente patogénico. Através da PCR em tempo real, o produto amplificado é detetado com recurso a corantes fluorescentes. Estes estão habitualmente aglutinados a sondas de oligonucleotídeos que se ligam especificamente ao produto amplificado. A monitorização das intensidades de fluorescência no decorrer da PCR (ou seja, em tempo real) possibilita a detecção e a quantificação dos produtos sem ter que voltar a abrir os tubos de reação depois de concluída a PCR (1).

O kit *artus M. tuberculosis* RG PCR é um sistema pronto a utilizar para a deteção de todos os membros do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. pinnipedii*) utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) em instrumentos Rotor Gene Q. O *M. tuberculosis* RG Master contém reagentes e enzimas para a amplificação específica de uma região de 159 pb do genoma micobacteriano e para a deteção direta de fragmentos amplificados específicos no canal de fluorescência **Cycling Green** do Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene 6000 ou **Cycling A.FAM** do Rotor-Gene 3000.

Ao mesmo tempo, o kit *artus M. tuberculosis* RG PCR contém um segundo sistema de amplificação heterólogo para identificar uma possível inibição da PCR. Esta inibição é detetada como um controlo interno (IC) no canal de fluorescência **Cycling Yellow** do Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene 6000, ou **Cycling A.JOE** do Rotor-Gene 3000. A amplificação e a deteção deste controlo interno não reduz o limite de deteção da PCR analítica do complexo *M. tuberculosis* (ver "Sensibilidade analítica", na página 25). São fornecidos controlos positivos externos (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1–4) que permitem a determinação da carga de agente patogénico. Para mais informações, consultar "Quantificação", na página 12.

# Materiais fornecidos

## Conteúdo do kit

<b>artus M. tuberculosis RG PCR Kit</b>				
<b>Número de catálogo</b>			<b>4555263</b>	<b>4555265</b>
<b>Número de reações</b>			<b>24</b>	<b>96</b>
<b>Cor da tampa</b>	<b>Nome do reagente</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Quantidade</b>
Azul	M. tuberculosis RG Master		2 x 12 reações	8 x 12 reações
Amarelo	M. tuberculosis RG Mg-Sol*	<b>Mg-Sol</b>	1 x 400 µl	1 x 400 µl
Vermelho	M. tuberculosis RG/TM QS <sup>†</sup> 1 (3 x 10 <sup>4</sup> cópias/µl)	<b>QS</b>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Vermelho	M. tuberculosis RG/TM QS 2 (3 x 10 <sup>3</sup> cópias/µl)	<b>QS</b>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Vermelho	M. tuberculosis RG/TM QS 3 (3 x 10 <sup>2</sup> cópias/µl)	<b>QS</b>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Vermelho	M. tuberculosis RG/TM QS 4 (3 x 10 <sup>1</sup> cópias/µl)	<b>QS</b>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Verde	M. tuberculosis RG IC <sup>‡</sup>	<b>IC</b>	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl
Branco	Água (grau PCR)		1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

\* Mg-Sol: Solução de magnésio.

† QS: Padrão de quantificação

‡ IC: Controlo interno

## Materiais necessários, mas não fornecidos

**Importante:** Assegurar que os instrumentos utilizados nestes procedimentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

- Luvas de laboratório isentas de pó
- Kit QIAamp® DNA Mini (QIAGEN, n.º cat. 51304)
- Mistura de lisozima (ver a página 10)
- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipetas estéreis com filtros
- Misturador vórtex
- Bloco de aquecimento ou termoagitador com capacidade de aquecimento entre 37 °C e 95 °C
- Centrífuga de bancada com rotor para tubos de reação de 2 ml
- Instrumento Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q ou Rotor-Gene com canais de fluorescência para **Cycling Green** e **Cycling Yellow** ou com canais de fluorescência para **Cycling A.FAM** e **Cycling A.JOE**
- Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q, versão de software 1.7.94 ou posterior (Rotor-Gene 6000, versão de software 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; Rotor-Gene 3000, versão de software 6.0.23)
- Strip Tubes and Caps (tiras de tubos e tampas), 0,1 ml, para utilização com o rotor de 72 poços (n.º cat. 981103 ou 981106)
- Em alternativa: PCR Tubes (tubos de PCR), 0,2 ml, para utilização com o rotor de 36 poços (n.º cat. 981005 ou 981008)
- Bloco de refrigeração (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes [bloco de carregamento 72 tubos de 0,1 ml], n.º cat. 9018901, ou Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes [bloco de carregamento 96 tubos de 0,2 ml], n.º cat. 9018905)

## Avisos e precauções

O utilizador deve ter sempre em atenção o seguinte:

- Utilizar pontas de pipetas estéreis com filtros.
- Armazenar e extrair materiais positivos (amostras, controlos e fragmentos amplificados) separadamente dos restantes reagentes e adicioná-los à mistura de reação numa unidade situada num espaço separado.
- Descongelar completamente todos os componentes à temperatura ambiente antes de dar início a um ensaio.
- De seguida, misturar completamente e centrifugar brevemente os componentes.
- Trabalhar com rapidez e manter os componentes em gelo ou no bloco de refrigeração (bloco de carregamento de 72/96 poços).

## Advertências

Para obter informações de segurança sobre o kit *artus M. tuberculosis* RG PCR, consultar as fichas de dados de segurança adequadas. As fichas de dados de segurança estão disponíveis on-line em formato PDF, cómodo e compacto, no endereço [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety).

## Armazenamento e manuseamento de reagentes

Os componentes do kit *artus M. tuberculosis* RG PCR devem ser armazenados entre  $-15$  e  $-30$  °C e são estáveis até ao prazo de validade impresso no rótulo. A repetida descongelação e congelação (> 2 x) deve ser evitada uma vez que pode reduzir a sensibilidade. Se os reagentes se destinarem a ser usados de forma intermitente, devem ser congelados em alíquotas. O armazenamento a  $2-8$  °C não pode exceder um período de 5 horas.



# Procedimento

## Pontos importantes antes de iniciar o procedimento

- A adição de ARN transportador é de grande importância para a eficiência e, com isso, para o rendimento do ADN/ARN. A adição de transportador (Homopolímero do ARN Poli[rA], não incluído no kit QIAamp DNA Mini) é vivamente recomendada para a extração de ácidos nucleicos de fluidos corporais isentos de células e material com nível reduzido de ADN e ARN (por exemplo, LCR).
- Ressuspender o ARN transportador liofilizado (Homopolímero do ARN Poli[rA], não incluído no kit QIAamp DNA Mini) utilizando o tampão de eluição (não utilizar o tampão de lise) do kit de extração (tampão AE do kit QIAamp DNA Mini), e preparar uma diluição com uma concentração de 1 µg/µl. Repartir esta solução de ARN transportador num número de alíquotas suficientes para as necessidades e conservá-las entre -15 °C a -30 °C. Evitar a repetida descongelação (> 2 x) de uma alíquota de ARN transportador.
- Utilizar 1 µg de ARN transportador por 100 µl de tampão de lise. Por exemplo, se o protocolo de extração sugerir 200 µl de tampão de lise, adicionar 2 µl de ARN transportador (1 µg/µl) diretamente no tampão de lise (tampão AL do kit QIAamp DNA Mini). Antes de iniciar cada extração, deverá ser preparada no momento uma mistura de tampão de lise, ARN transportador e controlo interno (ver "Controlo interno", na página 12) de acordo com o seguinte esquema de pipetagem:

Reagente	Número de amostras	
	1	12
Tampão AL (tampão de lise)	por exemplo, 200 µl	por exemplo, 2400 µl
ARN transportador (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Controlo interno	10 µl	120 µl
<b>Volume total</b>	<b>212 µl</b>	<b>2544 µl</b>
<b>Volume por extração</b>	<b>200 µl</b>	<b>cada 200 µl</b>

- Usar mistura preparada no momento de tampão de lise, controlo interno e ARN transportador **imediatamente** para extração. **Não** é possível conservar a mistura.
- O kit *artus M. tuberculosis* RG PCR não deve ser usado com métodos de isolamento baseados em fenol.

- **Importante:** O controlo interno do kit *artus M. tuberculosis* RG PCR pode ser utilizado diretamente no procedimento de isolamento (ver "Controlo interno", na página 12).

## Isolamento de ADN

Antes do isolamento de ADN, grandes volumes de amostra ou amostras altamente acídicas devem ser primeiramente concentradas ou neutralizadas, respetivamente. Para a análise de expetoração, recomenda-se a descontaminação com NALC-NaOH; o fluido estomacal deve ser neutralizado com tampão fosfato. Após uma centrifugação final, o pellet de bactérias pode ser utilizado para o isolamento de ADN que se segue.

O kit QIAamp DNA Mini (n.º cat. 51304) está validado para purificação de ADN micobacteriano obtido a partir de amostras humanas de expetoração, LBA, secreções brônquicas, LCR, fluido estomacal ou de punção peritoneal para utilização com o kit *artus M. tuberculosis* RG PCR.

Para assegurar uma lise eficaz e isenta de contaminação das micobactérias, efetuar a purificação do ADN de acordo com os passos que se seguem, que são diferentes dos protocolos indicados no *Manual do QIAamp DNA Mini e Blood Mini*.

**Importante:** Todos os passos de pipetagem antes da incubação a 95 °C têm de ser levados a cabo numa cabine de segurança de classe II, uma vez que as amostras são potencialmente infecciosas.

1. Transferir entre 250 µl e 500 µl da amostra descontaminada com NALC-NaOH para um tubo com tampa roscada de 1,5 ml.
  - A utilização dos tubos de tampa roscada é absolutamente necessária.
  - Os tubos de tampa roscada têm de ser sempre firmemente fechados.
2. Centrifugar durante 10 minutos a 17 000 x g (13 000 rpm) numa centrífuga de mesa.
3. Eliminar cuidadosamente o sobrenadante por pipetagem.
  - Não tocar no interior da tampa do tubo. Caso tal aconteça, substituir imediatamente a luva contaminada.
4. Adicionar 180 µl de mistura de lisozima (20 mg/ml de lisozima; 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 2 mM de EDTA; 1,2% Triton™) e ressuspender o pellet pipetando para cima e para baixo.
5. Incubar durante, pelo menos, 1 hora a 37 °C num bloco de aquecimento ou termoagitador.
  - Não se recomenda a utilização de banho-maria.
6. Centrifugar brevemente para remover gotas do interior da tampa.
  - Após cada passo de incubação, centrifugar brevemente o tubo para remover gotas do interior da tampa.

7. Adicionar 20 µl de proteinase K e 200 µl de tampão AL com ARN transportador e IC (ver acima e "Controlo interno" na página 12).
  - Não tocar no interior da tampa do tubo. Caso tal aconteça, substituir imediatamente a luva contaminada.
8. Misturar bem agitando no vórtex.
9. Incubar durante 30 minutos a 56 °C num bloco de aquecimento ou termoagitador.
  - Não se recomenda a utilização de banho-maria.
10. Centrifugar brevemente para remover gotas do interior da tampa.
  - Após cada passo de incubação, centrifugar brevemente o tubo para remover gotas do interior da tampa.
11. Incubar durante 15 minutos a uma temperatura de 95 °C.

**Importante:** O tempo de incubação não deve ser ultrapassado porque poderá provocar degradação do ADN.
12. **Nota:** Apenas após a conclusão da incubação a 95 °C é que as amostras deixam de ser infecciosas. Arrefecer a amostra à temperatura ambiente.
  - Assegurar que as amostras arrefecem até à temperatura ambiente após o passo de aquecimento a 95 °C, caso contrário o risco de contaminação por aerossóis após a abertura do tubo é extremamente elevado.
13. Centrifugar brevemente para remover gotas do interior da tampa.

Seguir o "Protocolo: Purificação de ADN de tecidos" no *Manual do QIAamp DNA Mini e do Blood Mini* (terceira edição, junho de 2012) iniciando com a adição de etanol no passo 6 e efetuar uma eluição final do ADN utilizando 100 µl de tampão AE.

- Assegurar que o aro da coluna de centrifugação do QIAamp não se molha.
- Não tocar no interior da tampa de uma coluna de centrifugação do QIAamp. Caso tal aconteça, substituir imediatamente a luva contaminada.
- Não utilizar a mesma ponta de pipeta para diferentes amostras, nem mesmo para aplicar os tampões de lavagem AW1 e AW2 ou o tampão de eluição AE. Isto evita a contaminação cruzada entre amostras e a contaminação de um tampão.
- Utilizar cada um dos tubos de colheita de 2 ml apenas uma vez. Se ficar sem tubos de colheita também pode utilizar tubos de microcentrifugação de 2 ml, cujas tampas têm de ser removidas antes da utilização.
- Recomenda-se vivamente a realização do passo 10 de centrifugação recomendado no protocolo para remover quaisquer resíduos de etanol. Recomenda-se o aumento do tempo desta centrifugação para 3 minutos.

## Controlo interno

É fornecido um controlo interno (M. tuberculosis RG IC). Isto permite ao utilizador controlar o procedimento de isolamento de ADN e verificar a possível inibição da PCR. Para este fim, adicionar o controlo interno numa relação de 0,1 µl por 1 µl do volume de eluição no isolamento. Por exemplo, ao utilizar o kit QIAamp DNA Mini, o ADN é eluído em 100 µl de tampão AE. Daí que, devem ser inicialmente adicionados 10 µl do controlo interno. O volume de controlo interno depende do volume de eluição. A utilização de 10 µl **apenas é válida** para um volume de eluição de 100 µl (0,1 µl por 1 µl de volume de eluição).

**Nota:** O controlo interno e ARN transportador (ver "Isolamento de ADN", na página 10) só devem ser adicionados à mistura de tampão de lise e material de amostra ou diretamente ao tampão de lise.

O controlo interno não pode ser adicionado diretamente à amostra. Se adicionado ao tampão de lise, ter em atenção que a mistura do controlo interno com o tampão de lise/ARN transportador deverá ser utilizada logo após ser preparada. A conservação da mistura à temperatura ambiente ou a 4 °C pode, em poucas horas, resultar em falha do controlo interno e diminuir a eficiência da extração.

**Nota:** Não adicionar o controlo interno e o ARN transportador diretamente na amostra.

## Quantificação

Para gerar uma curva padrão nos instrumentos Rotor-Gene Q, todos os 4 padrões de quantificação devem ser usados e definidos na caixa de diálogo **Edit Samples** (Editar amostras) como padrões com as concentrações especificadas (consultar o manual do utilizador do instrumento aplicável).

A curva padrão gerada, tal como descrito acima, também pode ser utilizada para ensaios subsequentes, desde que seja utilizado, pelo menos, um padrão de **uma** determinada concentração no ensaio atual. Para isso, a curva padrão anteriormente gerada deve ser importada (ver o manual do utilizador do instrumento aplicável). No entanto, este método de quantificação pode originar resultados erróneos devido à variabilidade entre diferentes ensaios de PCR.

Para assegurar uma quantificação precisa, é altamente recomendado adicionar o controlo interno ao M. tuberculosis RG Master e ao M. tuberculosis RG Mg-Sol utilizados para os padrões de quantificação. Para este fim, adicionar o controlo interno diretamente no M. tuberculosis RG Master e no M. tuberculosis RG Mg-Sol, tal como descrito no passo 2 do protocolo (página 13) e utilizar esta master mix para cada padrão de quantificação (M. tuberculosis RG/TM QS 1–4).

Os padrões de quantificação são definidos como cópias/ $\mu$ l. A seguinte equação tem de ser aplicada para converter os valores determinados usando a curva padrão para cópias/ml de material de amostra:

$$\text{Resultados (cópias/ml)} = \frac{\text{Resultado (cópias/\mu l)} \times \text{Volume de eluição (\mu l)}}{\text{Volume de amostra (ml)}}$$

Como regra geral, o volume de amostra inicial deve ser introduzido na equação acima representada. Isto tem de ser considerado quando o volume da amostra tiver sido alterado antes da extração do ácido nucleico (por ex.: reduzir o volume por centrifugação ou aumentar o volume adicionando ao volume necessário para o isolamento).

## PCR em instrumentos Rotor-Gene Q

- Familiarizar-se com o instrumento Rotor-Gene Q antes de dar início ao protocolo. Consultar o manual do utilizador do instrumento.
  - Assegurar que, pelo menos, um dos padrões de quantificação e um controlo negativo (água, grau de PCR) são incluídos por ensaio de PCR. Para gerar uma curva padrão, utilizar os 4 padrões de quantificação fornecidos (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1–4) para cada ensaio de PCR.
  - Assegurar que o bloco de refrigeração (acessório do instrumento Rotor-Gene Q) é pré-arrefecido para 2–8 °C.
  - Antes de cada utilização, todos os reagentes têm de ser completamente descongelados, misturados (por pipetagem repetida para cima e para baixo ou por ação rápida do vórtex) e brevemente centrifugados.
1. Colocar o número de tubos de PCR pretendidos nos adaptadores do bloco de refrigeração.
  2. Preparar uma master mix de acordo com a tabela que se segue:

	Número de amostras	
	1	12
<i>M. tuberculosis</i> RG Master	13 $\mu$ l	156 $\mu$ l
<i>M. tuberculosis</i> RG Mg-Sol	2 $\mu$ l	24 $\mu$ l

	Número de amostras	
<b>Volume total</b>	<b>15 µl</b>	<b>180 µl</b>

3. Pipetar 15 µl da master mix para cada tubo de PCR. De seguida, adicionar 10 µl de ADN da amostra eluída (ver a tabela abaixo).

Da mesma forma, deverão ser utilizados 10 µl de, pelo menos, um dos padrões de quantificação (*M. tuberculosis* RG QS 1–4) como controlo positivo e 10 µl de água (água, grau de PCR) como um controlo negativo.

	Número de amostras	
	<b>1</b>	<b>12</b>
Master mix (Mistura padrão)	15 µl	15 µl cada
Amostra	10 µl	10 µl cada
<b>Volume total</b>	<b>25 µl</b>	<b>25 µl cada</b>

4. Fechar os tubos PCR.
5. Assegurar que o anel de bloqueio (acessório do instrumento Rotor-Gene) é colocado no topo do rotor para evitar a abertura accidental dos tubos durante o ensaio.
6. Para a deteção de todos os membros do complexo *M. tuberculosis*, criar um perfil de temperatura de acordo com os passos a seguir indicados.

<b>Definição dos parâmetros de ensaio gerais</b>	<b>Figuras 1, 2 e 3</b>
<b>Ativação inicial da enzima de começo quente</b>	<b>Figura 4</b>
<b>Amplificação do ADN</b>	<b>Figura 5</b>
<b>Ajuste da sensibilidade do canal de fluorescência</b>	<b>Figura 6</b>
<b>Início do ensaio</b>	<b>Figura 7</b>

Todas as especificações referem-se ao Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q, versão de software 1.7.94, Rotor Gene 6000, versões de software 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 e Rotor-Gene 3000, versão de software 6.0.23. Para mais informações sobre a programação dos instrumentos Rotor-Gene consultar o manual do utilizador do instrumento.

Estas definições estão enquadradas a negrito, nas ilustrações que se seguem. São incluídas ilustrações para os instrumentos Rotor-Gene Q. Sempre que forem necessários valores diferentes para o Rotor-Gene 3000, estas diferenças são descritas no texto.

7. Começar por abrir a caixa de diálogo **New Run Wizard** (Assistente de novo ensaio) (Figura 1). Marcar a caixa **Locking Ring Attached** (Anel bloqueador conectado) e clicar em **Next** (Seguinte).

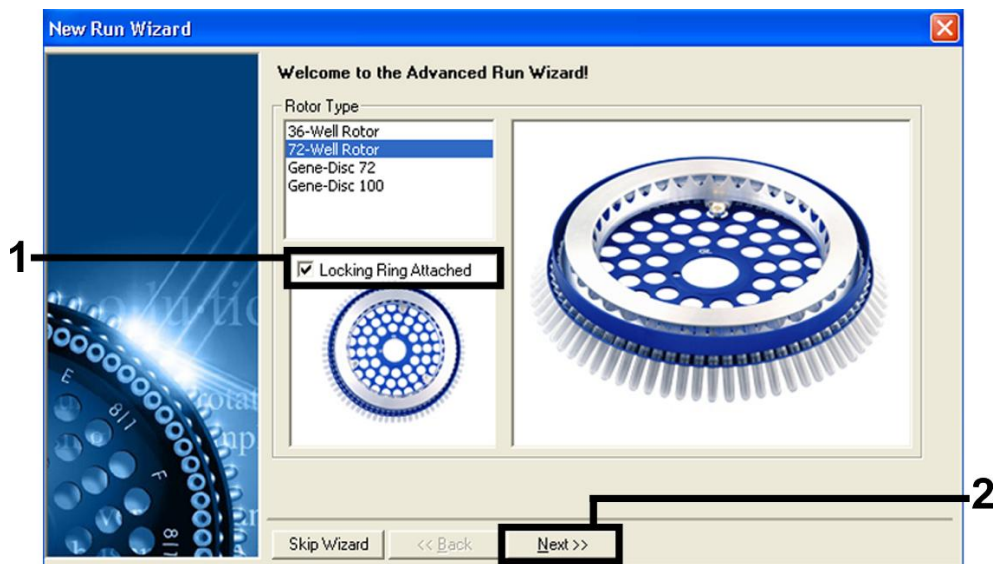
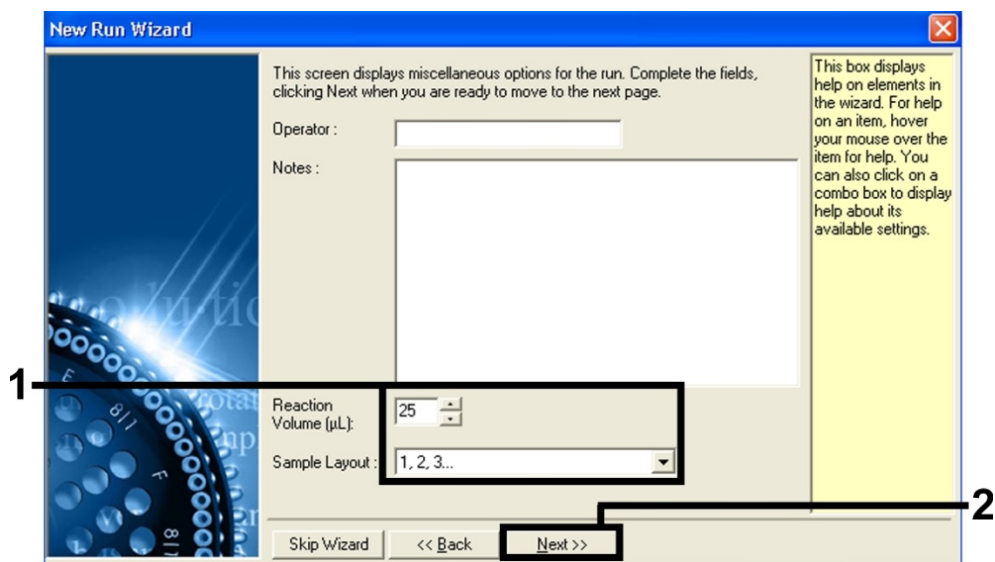


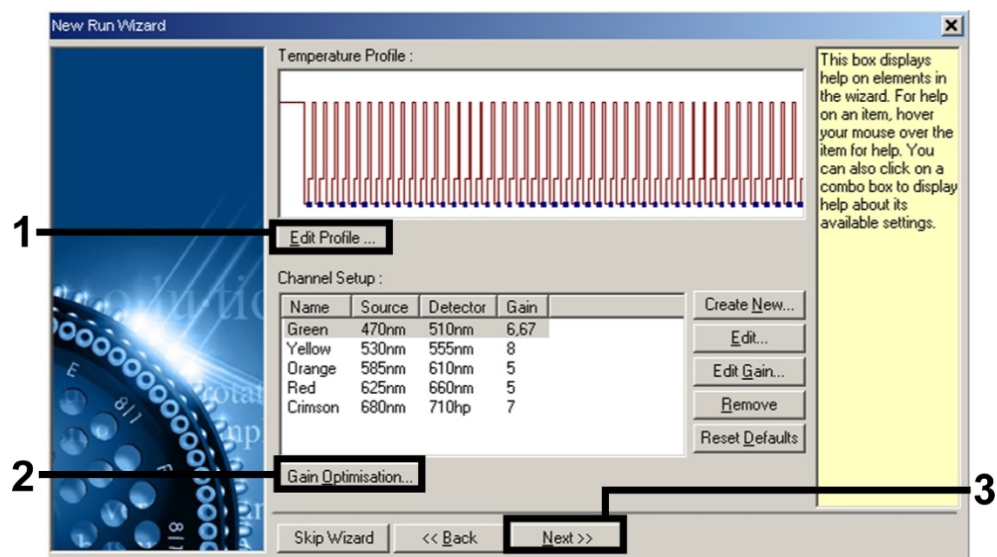
Figura 1: Caixa de diálogo New Run Wizard.

8. Selecionar **25** para o volume de reação da PCR e clicar em **Next** (figura 2).

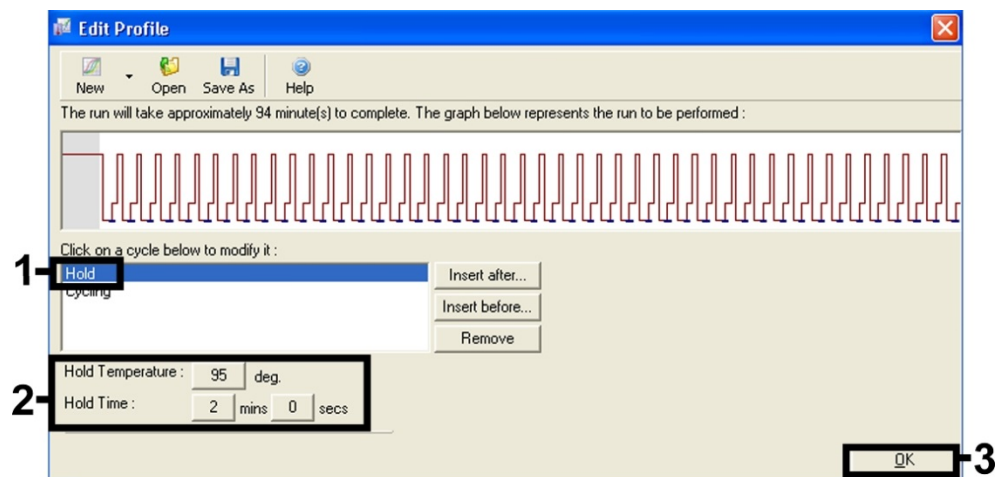


**Figura 2: Definição dos parâmetros de ensaio gerais.**

9. Clicar no botão **Edit Profile** (Editar perfil) na caixa de diálogo seguinte do **New Run Wizard** (figura 3) e programar o perfil de temperatura conforme se mostra nas figuras 4 e 5).

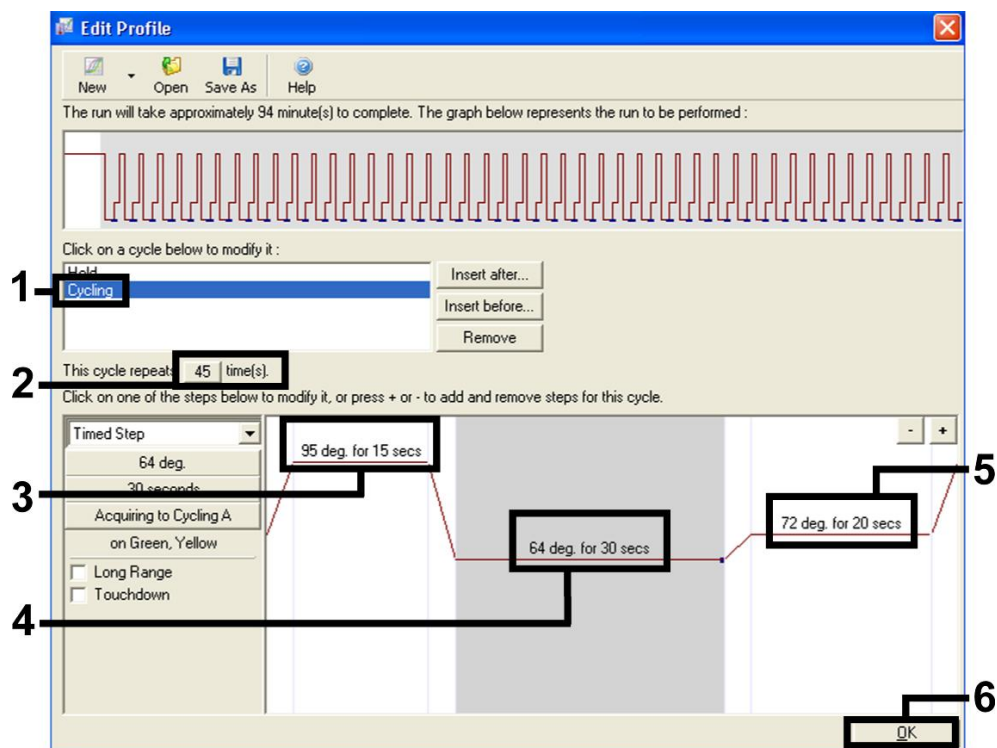


**Figura 3: Edição do perfil.**



**Figura 4: Ativação inicial da enzima de começo quente.**



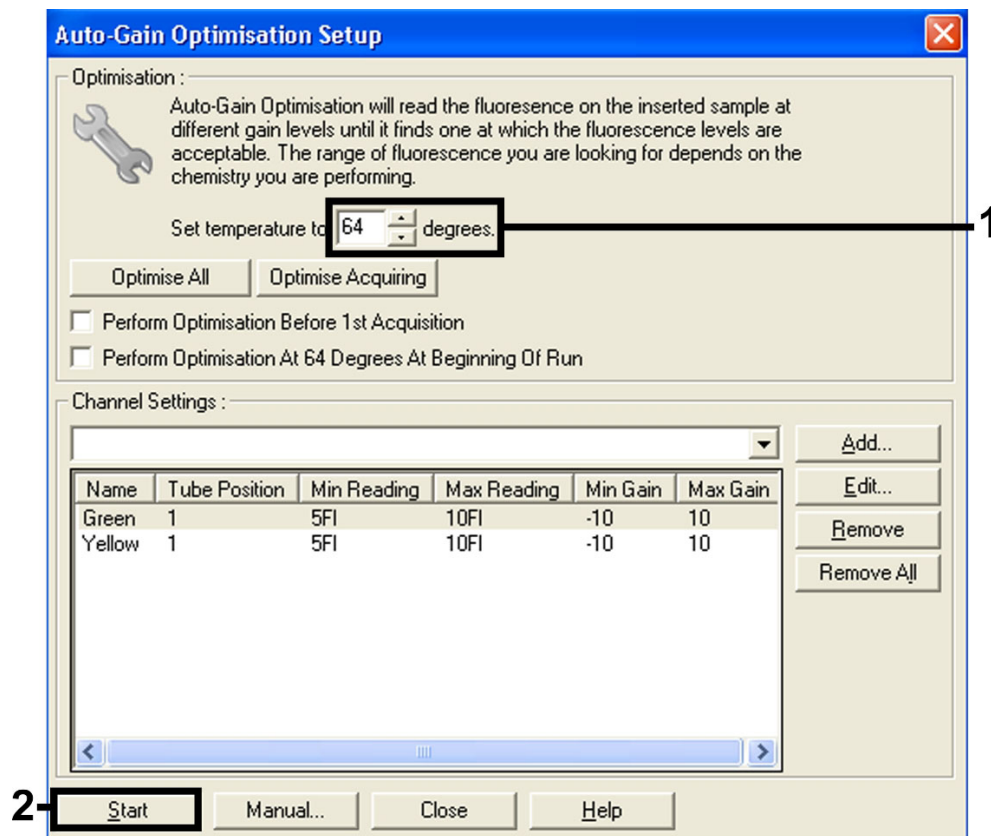


**Figura 5: Amplificação do ADN.**

**Nota:** No Rotor-Gene 3000, o software irá definir os corantes fluorescentes como **FAM/Sybr®**, **JOE**.

10. O intervalo de deteção dos canais de fluorescência tem de ser determinado de acordo com as intensidades de fluorescência nos tubos de PCR. Clicar em **Gain Optimisation** (Otimização de ganho) na caixa de diálogo **New Run Wizard** (ver figura 3) para abrir a caixa de diálogo **Auto-Gain Optimisation Setup** (Configuração da otimização automática de ganho).

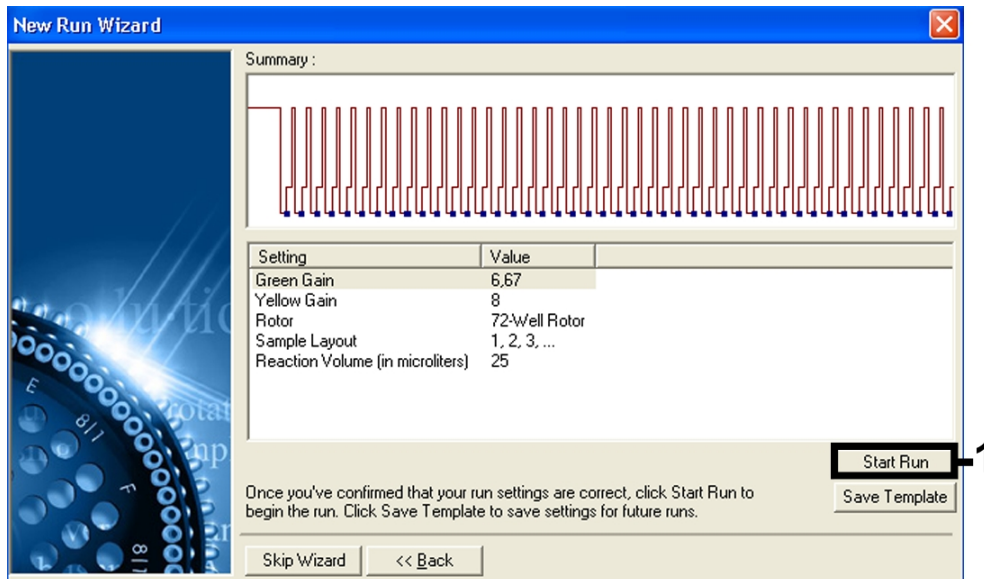
11. Definir a temperatura de calibração para **64** para igualar a temperatura de anelamento do programa de amplificação (figura 6).



**Figura 6: Ajustar a sensibilidade do canal de fluorescência.**

**Nota:** No Rotor-Gene 3000, o software irá definir os corantes fluorescentes como **FAM/Sybr** e **JOE**.

12. Os valores de ganho determinados pela calibração de canais são guardados automaticamente e são enumerados na última janela do menu do procedimento de programação (figura 7). Clicar em **Start Run** (Iniciar ensaio).



**Figura 7: Início do ensaio.**

**Nota:** No Rotor-Gene 3000, o software irá definir os corantes fluorescentes como **FAM/Sybr** e **JOE**.

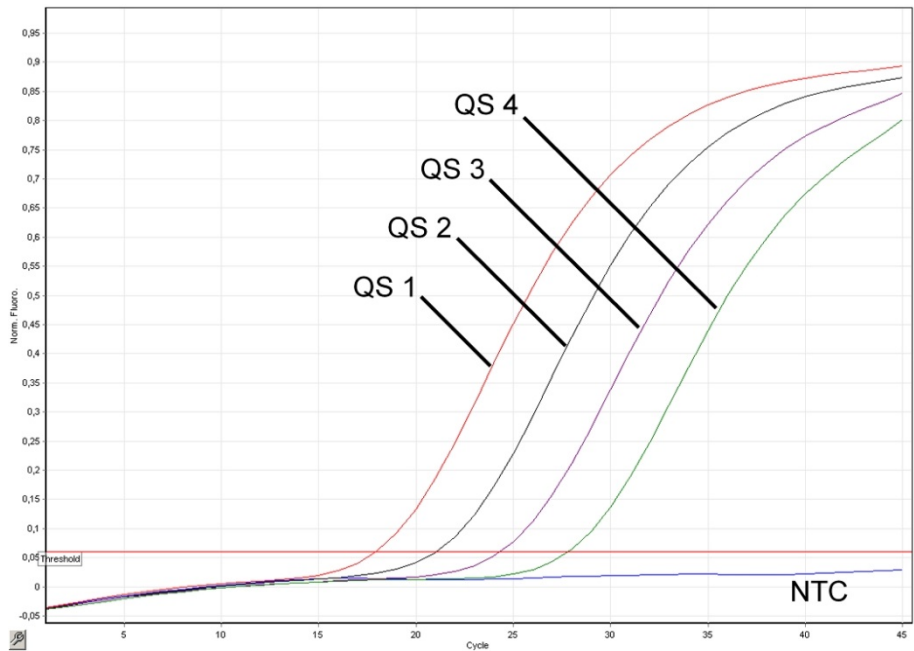
13. Após completar o ensaio, analisar os dados de acordo com "Interpretação dos resultados", na página 20.

## Interpretação dos resultados

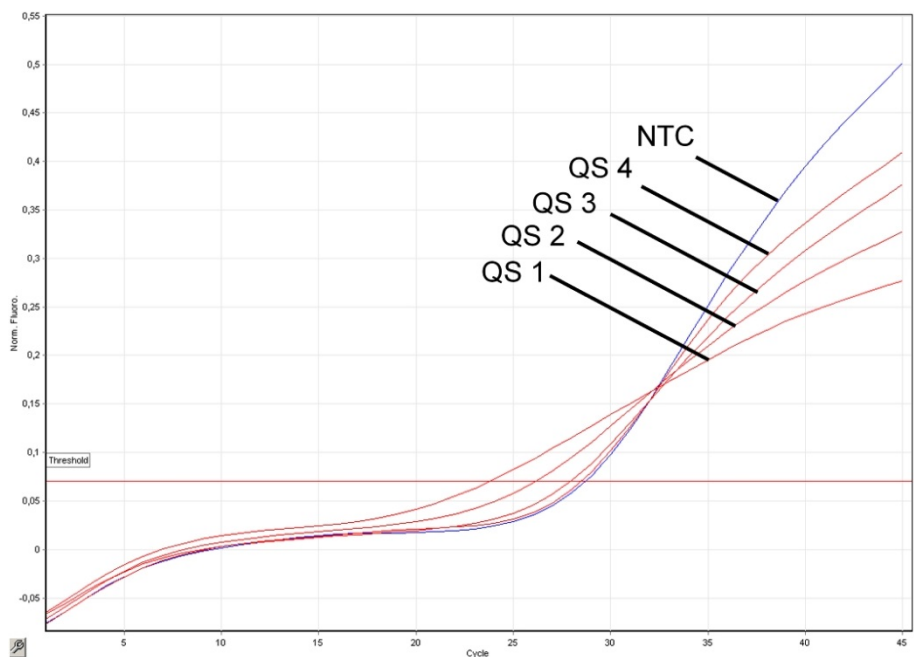
São fornecidos exemplos de reações de PCR positivas e negativas na Figura 8 e na Figura 9.

Os seguintes resultados podem ser obtidos:

- É detetado um sinal no canal de fluorescência **Cycling Green**.  
O resultado da análise é positivo. A amostra contém ADN de um ou mais membros do complexo *M. tuberculosis*.  
Neste caso, a deteção de um sinal no canal **Cycling Yellow** é dispensável, uma vez que as concentrações iniciais elevadas de ADN do complexo *M. tuberculosis* (sinal positivo no canal **Cycling Green**) podem levar a um sinal de fluorescência reduzido ou ausente do controlo interno no canal **Cycling Yellow** (competição).  
**Nota:** No Rotor-Gene 3000, os canais relevantes são **Cycling A.FAM** para o sinal positivo e **Cycling A.JOE** para o controlo interno.
  - Não é detetado sinal no canal de fluorescência **Cycling Green**. Ao mesmo tempo, aparece um sinal do controlo interno no canal **Cycling Yellow**.  
Na amostra, não se deteta ADN de membros do complexo *M. tuberculosis*. Pode ser considerado negativo.  
No caso de uma PCR negativa para o complexo *M. tuberculosis*, o sinal detetado do IC exclui a possibilidade de inibição da PCR.  
**Nota:** No Rotor-Gene 3000, os canais relevantes são **Cycling A.JOE** para o controlo interno e uma ausência de sinal para **Cycling A.FAM**.
  - Não é detetado sinal nos canais **Cycling Green** ou **Cycling Yellow**.  
Não pode inferir-se qualquer resultado.  
**Nota:** No Rotor-Gene 3000, os canais relevantes são **Cycling A.FAM** e **Cycling A.JOE**.
- É possível encontrar informações sobre as origens de erros e respetivas soluções em "Resolução de problemas", na página 22.



**Figura 8. Detecção dos padrões de quantificação (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1-4) no canal de fluorescência Cycling Green. NTC: non-template control (controlo negativo).**



**Figura 9. Detecção do controlo interno no canal de fluorescência Cycling Yellow com amplificação simultânea dos padrões de quantificação (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1-4). NTC: non-template control (controlo negativo).**

## Resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir.

### Comentários e sugestões

#### **Ausência de sinal com controlos positivos (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1–4) no canal de fluorescência Cycling Green ou Cycling A.FAM**

- |    |  |  |
|----|--|--|
| a) | O canal de fluorescência selecionado para análise dos dados de PCR não cumpre o protocolo. | Para análise de dados, selecionar o canal de fluorescência <b>Cycling Green</b> ou <b>Cycling A.FAM</b> para a PCR do complexo <i>M. tuberculosis</i> e o canal de fluorescência <b>Cycling Yellow</b> ou <b>Cycling A.JOE</b> para a PCR do controlo interno. |
| b) | Programação incorreta do perfil de temperatura do instrumento Rotor-Gene                   | Comparar o perfil de temperatura com o protocolo (ver "PCR em instrumentos Rotor-Gene Q", na página 13).   |
| c) | Configuração incorreta da reação de PCR  | Rever os passos com ajuda do esquema de pipetagem (ver "PCR em instrumentos Rotor-Gene Q", na página 13) e, se for o caso, repetir a PCR.  |
| d) | As condições de conservação para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções   | Verificar as condições de armazenamento (ver "Armazenamento e manuseamento de reagentes", na página 8) e a data de validade (ver etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, caso seja necessário.  |
| e) | O kit <i>artus M. tuberculosis</i> RG PCR expirou.   | Verificar as condições de armazenamento (ver "Armazenamento e manuseamento de reagentes", na página 8) e a data de validade (ver etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, caso seja necessário.  |

#### **Sinal fraco ou ausente do controlo interno no canal de fluorescência Cycling Yellow ou Cycling A.JOE e ausência simultânea de sinal no canal Cycling Green ou Cycling A.FAM para a PCR específica do complexo *M. tuberculosis***

- |    |  |  |
|----|--|--|
| a) | As condições de PCR não cumprem os requisitos do protocolo | Verificar as condições de PCR (ver "Ausência de sinal com controlos positivos [ <i>M. tuberculosis</i> RG QS 1–4] no canal de fluorescência Cycling Green ou Cycling A.FAM" acima) |
|----|--|--|

### Comentários e sugestões

---

- e repetir a PCR com as definições corrigidas, caso seja necessário.
- b) A PCR foi inibida
- Assegurar que é utilizado um método de isolamento recomendado (ver "Isolamento de ADN", na página 10) e seguir atentamente as instruções do fabricante.
- Assegurar que foi efetuado o passo recomendado de centrifugação adicional para completa eliminação de resíduos de etanol antes da eluição durante o isolamento de ADN (ver "Isolamento de ADN", na página 10).
- c) Ocorreram perdas de ADN durante a extração
- Se o controlo interno tiver sido adicionado à extração, a ausência de um sinal do controlo interno pode indicar a perda de ADN durante a extração. Assegurar que é utilizado um método de isolamento recomendado (ver "Isolamento de ADN", na página 10) e seguir atentamente as instruções do fabricante.
- d) As condições de conservação para um ou mais componentes do kit não cumprem as instruções
- Verificar as condições de armazenamento (ver "Armazenamento e manuseamento de reagentes", na página 8) e a data de validade (ver etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, caso seja necessário.
- e) O kit *artus M. tuberculosis* RG PCR expirou
- Verificar as condições de armazenamento (ver "Armazenamento e manuseamento de reagentes", na página 8) e a data de validade (ver etiqueta do kit) dos reagentes e usar um novo kit, caso seja necessário.

### Sinais com controlos negativos no canal de fluorescência Cycling Green ou Cycling A.FAM da PCR analítica

- a) Ocorreu contaminação durante a preparação da PCR
- Repetir a PCR com novos reagentes em replicações.
- Se possível, fechar os tubos de PCR imediatamente após a adição da amostra a ser testada.

### Comentários e sugestões

---

Assegurar que os controlos positivos são sempre pipetados no fim.

Assegurar que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados regularmente.

b) Ocorreu contaminação durante a extração.

Repetir a extração e a PCR da amostra a ser testada usando novos reagentes.

Assegurar que o espaço de trabalho e os instrumentos são descontaminados regularmente.

Em caso de dúvidas ou problemas, contactar a Assistência Técnica da QIAGEN.

## Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Total da QIAGEN certificado pela norma ISO, todos os lotes do kit *artus M. tuberculosis RG PCR* são testados face a especificações predeterminadas, para garantir uma qualidade constante do produto.

## Limitações

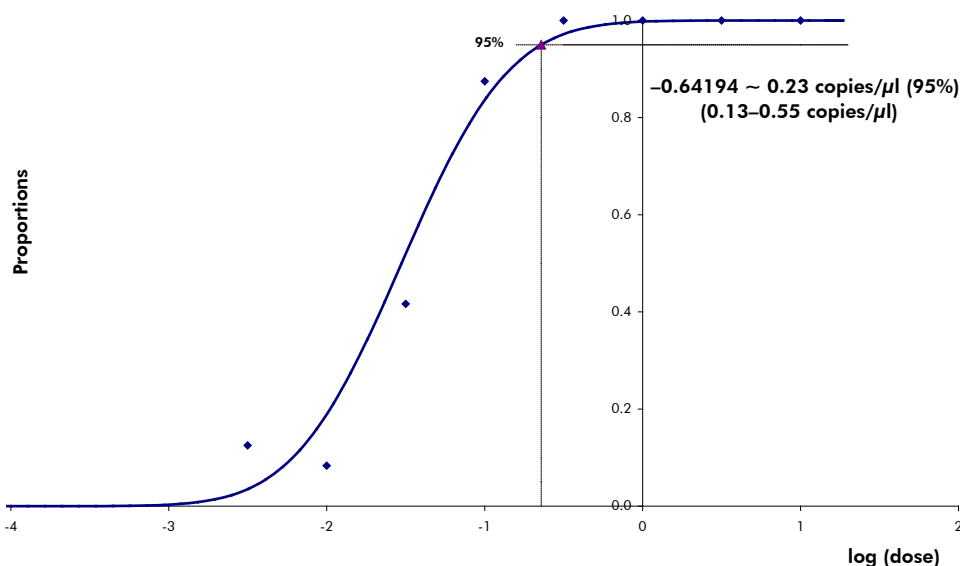
- Todos os reagentes podem ser exclusivamente utilizados em diagnóstico in vitro.
- O produto deve apenas ser utilizado por pessoal com formação específica em procedimentos de diagnóstico in vitro e devidamente instruído para o efeito.
- Para resultados de PCR ótimos, é necessário que as instruções do manual do utilizador sejam rigorosamente observadas.
- Atenção aos prazos de validade impressos na caixa e nos rótulos de todos os componentes. Não utilizar componentes cujo prazo de validade tenha expirado.
- Embora rara, a ocorrência de mutações nas regiões altamente conservadas do genoma bacteriano cobertas pelos primers e/ou sonda do kit pode resultar em subquantificação ou falha em detetar a presença da bactéria. A validade e o desempenho do ensaio são avaliados regularmente.



# Características de desempenho

## Sensibilidade analítica

Para determinar a sensibilidade analítica do kit *artus M. tuberculosis* RG PCR, foi criada uma série de diluições padrão de 10 a aproximadamente 0,003 e de 10 a aproximadamente 0,05 equivalentes do genoma de *M. tuberculosis*/µl que foram analisadas no Rotor-Gene 6000 e no Rotor-Gene 3000, respetivamente, em conjunto com o kit *artus M. tuberculosis* RG PCR. As análises foram efetuadas em 3 dias diferentes em 8 replicações. Os resultados foram determinados por análise de probit. A figura 10 apresenta uma ilustração gráfica da análise de probit no Rotor-Gene 6000. O limite de deteção analítica do kit *artus M. tuberculosis* RG PCR em conjunto com o Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 e o Rotor-Gene 3000 é de 0,23 cópias/µl ( $p = 0,05$ ) e 0,9 cópias/µl ( $p = 0,05$ ), respetivamente. Isto significa que existe uma probabilidade de 95% de o limite de 0,23 cópias/µl ou de 0,9 cópias/µl ser detetado.



**Figura 10: Análise de probit: *M. tuberculosis* (Rotor-Gene 6000).** Sensibilidade analítica do kit *artus M. tuberculosis* RG PCR no Rotor-Gene 6000.

## Especificidade

A especificidade do kit *artus M. tuberculosis* RG PCR é, em primeiro lugar, garantida através da seleção dos primers e das sondas, assim como da seleção de condições de reação otimizadas. Os primers e as sondas foram verificados em termos de possível homologia com todas as sequências publicadas nos bancos de genes, por análise comparativa de sequências. A detetabilidade de todos os membros do complexo *M. tuberculosis* foi assim assegurada.

Além disso, a especificidade foi validada com 90 amostras negativas diferentes do complexo *M. tuberculosis* (30 de expetoração, 30 de LBA e 30 de secreções brônquicas). Estas não geraram quaisquer sinais com os primers e sondas específicos do complexo *M. tuberculosis*, os quais estão incluídos no *M. tuberculosis* RG Master.

Para determinar a especificidade do kit *artus M. tuberculosis* RG PCR, foi testado o grupo de controlo indicado na tabela 1 quanto a reações cruzadas. Nenhum dos agentes patogénicos testados demonstrou reatividade.

**Tabela 1. Testes de especificidade do kit com agentes patogénicos com potencial de reação cruzada**

<b>Grupo de controlo</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> (Cycling Green ou Cycling A.FAM)</b>	<b>Controlo interno (Cycling Yellow ou Cycling A.JOE)</b>
<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>	–	+

<b>Grupo de controlo</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> (Cycling Green ou Cycling A.FAM)</b>	<b>Controlo interno (Cycling Yellow ou Cycling A.JOE)</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>	–	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	–	+
<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>	–	+

<b>Grupo de controlo</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> (Cycling Green ou Cycling A.FAM)</b>	<b>Controlo interno (Cycling Yellow ou Cycling A.JOE)</b>
<i>Nocardia asteroides</i>	–	+
<i>Nocardia brasiliensis</i>	–	+
<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>	–	+

## Precisão

Os dados de precisão do kit *artus M. tuberculosis* RG PCR foram recolhidos através de instrumentos Rotor-Gene e permitem apurar a variância total do ensaio. A variância total consiste na variabilidade intra-ensaio (variabilidade de múltiplos resultados de amostras da mesma

concentração num ensaio), na variabilidade entre ensaios (variabilidade de múltiplos resultados do ensaio gerados nos diversos instrumentos do mesmo tipo, por diferentes operadores num laboratório) e a na variabilidade entre lotes (variabilidade de múltiplos resultados do ensaio utilizando diversos lotes). Os dados obtidos foram utilizados para determinar o desvio padrão, a variância e o coeficiente de variação para o agente patogénico específico e a PCR de controlo interno.

Os dados de precisão do kit *artus M. tuberculosis RG PCR* foram recolhidos utilizando o padrão de quantificação com a menor concentração (QS 4; 30 cópias/ $\mu$ l). O teste foi realizado com 8 replicações. Os dados de precisão foram calculados com base nos valores de  $C_T$  das curvas de amplificação ( $C_T$ : ciclo limite, ver a tabela 2). Além disso, foram determinados dados de precisão para resultados quantitativos em cópias/ $\mu$ l utilizando os valores de  $C_T$  correspondentes (ver a tabela 3). Tendo por base estes resultados, a dispersão estatística global de uma dada amostra com a concentração referida é de 1,26% ( $C_T$ ) ou 14,64% (cópias/ $\mu$ l) para a deteção do IC de 1,57% ( $C_T$ ). Estes valores baseiam-se na totalidade dos valores individuais das variabilidades determinadas.

**Tabela 2. Dados de precisão com base nos valores de  $C_T$**

	<b>Desvio padrão</b>	<b>Variância</b>	<b>Coeficiente de variação (%)</b>
Variabilidade intra-ensaio: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0,10	0,01	0,32
Variabilidade intra-ensaio: Controlo interno	0,13	0,02	0,45
Variabilidade entre ensaios: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0,24	0,06	0,78
Variabilidade entre ensaios: Controlo interno	0,29	0,08	0,95
Variabilidade entre lotes: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0,39	0,15	1,28
Variabilidade entre lotes: Controlo interno	0,66	0,43	2,16
Variância total: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0,38	0,15	1,26
Variância total: Controlo interno	0,48	0,23	1,57

**Tabela 3. Dados de precisão com base nos resultados quantitativos (em cópias/μl)**

	<b>Desvio padrão</b>	<b>Variância</b>	<b>Coefficiente de variação (%)</b>
Variabilidade intra-ensaio: M. tuberculosis RG/TM QS 4	1,97	3,90	6,56
Variabilidade entre ensaios: M. tuberculosis RG/TM QS 4	3,93	15,43	13,00
Variabilidade entre lotes: M. tuberculosis RG/TM QS 4	5,51	30,41	18,09
Variância total: M. tuberculosis RG/TM QS 4	4,44	19,69	14,64

## Robustez

A verificação da robustez permite apurar a taxa total de erro do kit *artus M. tuberculosis* RG PCR. Foi misturado um total de 30 amostras negativas do complexo *M. tuberculosis* de cada amostra de expetoração, LBA e secreções brônquicas com 3 cópias/μl por volume de eluição de ADN de controlo de *M. tuberculosis* (aproximadamente 3 vezes a concentração do limite de sensibilidade analítica). Após a extração utilizando o kit QIAamp DNA Mini (ver "Isolamento de ADN", na página 10), estas amostras foram analisadas com o kit *artus M. tuberculosis* RG PCR. Para todas as amostras de *M. tuberculosis*, a taxa de erro foi de 0%. Além disso, a robustez do IC foi verificada através da purificação e análise de amostras de expetoração, LBA e secreções brônquicas (30 de cada) negativas do complexo *M. tuberculosis*. A taxa total de erro foi de 0%. Não foram observadas inibições. Assim, a robustez do kit *artus M. tuberculosis* RG PCR Kit é  $\geq 99\%$ .









## Reprodutibilidade


Os dados de reprodutibilidade permitem uma avaliação regular do desempenho do kit *artus M. tuberculosis* RG PCR, bem como uma comparação de eficiência com outros produtos. Estes dados foram obtidos pela participação nos programas de competência estabelecidos.

## Referências

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

## Símbolos

Símbolo	Definição do símbolo
	Prazo de validade
	Código de lote
	Fabricante
	Número de catálogo
	Número do material
	Marca CE relativa a conformidade europeia
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Contém reagentes suficientes para <N> testes

<b>Símbolo</b>	<b>Definição do símbolo</b>
<b>COMP</b>	Componentes
<b>CONT</b>	Contém
<b>NUM</b>	Número
<b>GTIN</b>	Número do item de comércio mundial
	Limites de temperatura
<b>QS</b>	Padrão de quantificação
<b>IC</b>	Controlo interno
<b>Mg-Sol</b>	Solução de magnésio



## Informações para encomenda

Produto	Índice	N.º de catálogo
<i>artus M. tuberculosis</i> RG PCR Kit (24)	Para 24 reações: Master, solução de magnésio, 4 padrões de quantificação, controlo interno, água (grau PCR)	4555263
<i>artus M. tuberculosis</i> RG PCR Kit (96)	Para 96 reações: Master, solução de magnésio, 4 padrões de quantificação, controlo interno, água (grau PCR)	4555265
<b>Kit QIAamp DNA Mini — para o isolamento de ADN genómico, mitocondrial, bacteriano, parasitário e viral</b>		
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Para 50 preparações de ADN: 50 colunas para centrifugação do QIAamp Mini, proteinase K QIAGEN, reagentes, tampões, tubos de colheita (2 ml)	51304
<b>Rotor-Gene Q MDx e acessórios</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Ciclador de PCR em tempo real com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Ciclador de PCR em tempo real com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002033

Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Instrumento de PCR em tempo real com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), incluindo computador portátil, software, acessórios: 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Instrumento de PCR em tempo real com 6 canais (azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim), incluindo computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Ciclador de PCR em tempo real com 2 canais (verde, amarelo), computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Ciclador de PCR em tempo real com 2 canais (verde, amarelo), computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 2 canais (verde, amarelo) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação não incluídas	9002012
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 2 canais (verde, amarelo) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios: inclui 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra, instalação e formação	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloco de alumínio para configuração da reação manual com pipeta de um canal em 72 tubos de 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Bloco de alumínio para configuração da reação manual numa variedade padrão de 8 x 12 utilizando 96 tubos de 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 tiras de 4 tubos e tampas para 1000 reações	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos e tampas para 10 000 reações	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 tubos de parede fina para 1000 reações	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 tubos de parede fina para 1000 reações	981008

---

Para obter informações de licenciamento atualizadas e renúncia de responsabilidades específicas do produto, consultar o respectivo manual do utilizador ou o manual do kit QIAGEN. Os manuais do kit e do utilizador QIAGEN encontram-se disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser solicitados à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Marcas comerciais: QIAGEN®, QIAamp®, artus®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); FAM™, JOE™, SYBR® (Life Technologies); Triton™ (The Dow Chemical Company).

Os nomes registados, as marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, mesmo quando não assinalados como tal, não devem ser considerados como não protegidos por lei.

O kit *artus M. tuberculosis* RG PCR é um kit de diagnóstico com a marca CE, de acordo com a Diretiva Europeia 98/79/CE relativa ao Diagnóstico In Vitro. Não disponível em todos os países.

Para obter informações de licenciamento atualizadas e renúncia de responsabilidades específicas do produto, consultar o respetivo manual do utilizador ou o manual do kit QIAGEN. Os manuais do kit e do utilizador QIAGEN encontram-se disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser solicitados à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

A aquisição deste produto permite ao comprador o seu uso para efetuar serviços de diagnóstico em processos de diagnóstico humano in vitro. Não é aqui concedida patente geral ou outra licença de qualquer tipo além deste direito de utilização específico a partir da compra.

#### **Acordo de licença limitada para o kit *artus M. tuberculosis* RG PCR**

A utilização deste produto significa a aceitação, por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto, dos seguintes termos:

1. O produto só pode ser usado em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e este manual e apenas com os componentes contidos no kit. A QIAGEN não concede qualquer licença ao abrigo da sua propriedade intelectual para usar ou incorporar os componentes incluídos neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, exceto conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, este manual e quaisquer protocolos adicionais disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Alguns destes protocolos adicionais foram fornecidos por utilizadores QIAGEN para utilizadores QIAGEN. Estes protocolos não foram devidamente testados nem otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não garante nem fornece qualquer garantia de que os mesmos não infrinjam direitos de terceiros.
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados ou objeto de revenda.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador do kit concorda em não tomar nem permitir que qualquer outro tome medidas que possam conduzir ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições deste Acordo de Licença Limitada em qualquer Tribunal e irá recuperar todos os seus custos legais e de investigação, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir este Acordo de Licença Limitada ou qualquer dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, consultar [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-0058-007 151031225 © 2007–2015 QIAGEN, todos os direitos reservados.

