

Ottobre 2015

Manuale del kit *artus*[®] M. tuberculosis RG PCR



Versione 1

Diagnostica quantitativa in vitro

Per l'uso con strumenti Rotor-Gene[®] Q

IVD



REF

4555263 (24 reazioni)
4555265 (96 reazioni)



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
GERMANIA

R5 MAT

1046960IT

Indice

Uso previsto.....	4
Sommario e spiegazioni.....	4
Principio della metodica.....	4
Materiali in dotazione.....	6
Contenuto del kit	6
Materiali necessari ma non in dotazione.....	7
Avvertenze e precauzioni.....	8
Avvertenze	8
Conservazione e manipolazione dei reagenti.....	8
Procedura.....	9
Punti importanti prima di iniziare	9
Estrazione del DNA.....	10
Controllo interno.....	12
Quantificazione.....	12
PCR sugli strumenti Rotor-Gene Q.....	13
Interpretazione dei risultati.....	20
Risoluzione dei problemi	22
Controllo di qualità.....	24
Limiti della metodica.....	24
Caratteristiche delle prestazioni.....	26
Sensibilità analitica.....	26
Specificità.....	27
Precisione.....	29
Robustezza.....	31
Riproducibilità.....	31
Riferimenti bibliografici.....	32
Simboli.....	32
Informazioni per l'ordine.....	34

Uso previsto

Il kit *artus M. tuberculosis* RG PCR è un sistema in vitro per l'amplificazione degli acidi nucleici utilizzato per rilevare tutti i componenti del complesso *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. pinnipedii*) in campioni umani di espettorato, BAL, secrezione bronchiale, FCS, liquido gastrico o iniezione peritoneale. Questo kit diagnostico utilizza la reazione a catena della polimerasi (PCR) ed è configurato per gli strumenti Rotor-Gene Q.

Sommario e spiegazioni

La tubercolosi (TB) è ancora una delle più importanti malattie infettive del mondo. Circa due miliardi di persone, un terzo della popolazione mondiale, sono infettate dal *Mycobacterium tuberculosis*, l'agente responsabile della TB. L'incidenza della TB nel mondo è pari a circa 8 milioni e circa 3 milioni di persone muoiono ogni anno. La TB è una malattia riemergente nei paesi industrializzati, soprattutto a causa dell'immigrazione di persone infette e dello sviluppo di una forma di tubercolosi farmaco-resistente. Le persone senza tetto, farmaco-dipendenti e immunodepresse sono interessate dalla malattia in misura sproporzionata.

La TB è una malattia ciclica cronica, che colpisce soprattutto il polmone e i linfonodi associati. Tuttavia, a seconda delle condizioni del sistema immunitario del paziente, i batteri *M. tuberculosis* possono colonizzare anche altri organi. La TB si trasmette principalmente da persona a persona tramite aerosol. Solo le persone con malattia in atto sono contagiose. In particolare nei pazienti immunodepressi, i batteri *M. tuberculosis* possono essere riattivati (recrudescenza) persino anni dopo l'esordio dell'infezione iniziale.

Principio della metodica

Per la diagnosi tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) vengono amplificate specifiche regioni del genoma dell'agente patogeno. Nella real-time PCR la rilevazione del prodotto di amplificazione richiede l'impiego di coloranti fluorescenti, di solito legati a sonde oligonucleotidiche, che si legano in modo specifico al prodotto di amplificazione. La rilevazione dell'intensità di fluorescenza durante la real-time PCR consente di identificare e quantificare il prodotto interessato senza dover riaprire le provette di reazione al termine della PCR (1).

Il kit *artus M. tuberculosis* RG PCR è un sistema pronto all'uso utilizzato per rilevare tutti i componenti del complesso *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*,

M. pinnipedii) tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) sugli strumenti Rotor Gene Q. L'M. tuberculosis RG Master contiene reagenti ed enzimi per l'amplificazione specifica di una regione di 159 bp del genoma micobatterico, nonché per la rilevazione immediata dell'amplicone specifico nel canale di fluorescenza **Cycling Green** del Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q o Rotor-Gene 6000, oppure nel canale **Cycling A.FAM** del Rotor-Gene 3000.

Il kit *artus M. tuberculosis* RG PCR contiene anche un secondo sistema di amplificazione eterologa per verificare una possibile inibizione della PCR. Questa viene rilevata come controllo interno (IC) nel canale di fluorescenza **Cycling Yellow** del Rotor Gene Q MDx, Rotor-Gene Q o Rotor-Gene 6000, oppure nel canale **Cycling A.JOE** del Rotor-Gene 3000. L'amplificazione e la rilevazione di questo controllo interno non riducono il limite di rilevabilità della PCR analitica del complesso *M. tuberculosis* (vedere "Sensibilità analitica," pag. 26). Il kit comprende controlli positivi esterni (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1-4), che consentono di determinare la carica dell'agente patogeno. A tale proposito consultare il paragrafo "Quantificazione", pagina 12.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

artus M. tuberculosis RG PCR Kit				
N° di catalogo			4555263	4555265
N° di reazioni			24	96
Colore del tappo	Nome del reagente	Simbolo	Quantità	Quantità
Blu	M. tuberculosis RG Master		2 x 12 reazioni	8 x 12 reazioni
Giallo	M. tuberculosis RG Mg-Sol*	Mg-Sol	1 x 400 µl	1 x 400 µl
Rosso	M. tuberculosis RG/TM QS [†] 1 (3 x 10 ⁴ copie/µl)	QS	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rosso	M. tuberculosis RG/TM QS 2 (3 x 10 ³ copie/µl)	QS	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rosso	M. tuberculosis RG/TM QS 3 (3 x 10 ² copie/µl)	QS	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rosso	M. tuberculosis RG/TM QS 4 (3 x 10 ¹ copie/µl)	QS	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Verde	M. tuberculosis RG IC [‡]	IC	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl
Bianco	Acqua (grado PCR)		1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

* Mg-Sol: Soluzione di magnesio.

† QS: Standard di quantificazione

‡ IC: Controllo interno

Materiali necessari ma non in dotazione

Importante: Assicurarsi che gli strumenti utilizzati in queste procedure siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

- Guanti monouso non talcati
- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, cat. n° 51304)
- Miscela di liozima (vedere pag. 10)
- Pipette (regolabili)
- Puntali per pipette sterili con filtri
- Agitatore vortex
- Blocco riscaldante o termomiscelatore in grado di raggiungere una temperatura compresa tra 37°C e 95°C
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml
- Strumento Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q o Rotor-Gene con canali di fluorescenza per **Cycling Green** e **Cycling Yellow** oppure con canali di fluorescenza per **Cycling A.FAM** e **Cycling A.JOE**
- Software del Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q versione 1.7.94 o superiore (software del Rotor-Gene 6000 versione 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; software del Rotor-Gene 3000 versione 6.0.23)
- Provette e tappi per strisce, 0,1 ml, da usare con rotore a 72 pozzetti (cat. n° 981103 o 981106)
- In alternativa: provette per PCR, 0,2 ml, da usare con rotore a 36 pozzetti (cat. n° 981005 o 981008)
- Blocco di raffreddamento (blocco di caricamento per 72 provette da 0,1 ml, cat. n° 9018901, o blocco di caricamento per 96 provette da 0,2 ml, cat. n° 9018905)

Avvertenze e precauzioni

Chi utilizza il prodotto deve sempre attenersi a quanto segue:

- Utilizzare puntali per pipette sterili con filtri.
- Estrarre e conservare il materiale positivo (campioni, controlli, ampliconi) separatamente da tutti gli altri reagenti e aggiungerlo alla miscela di reazione in luogo separato.
- Prima dell'inizio del test scongelare accuratamente tutti i componenti a temperatura ambiente.
- Una volta scongelati miscelare i componenti su vortex e sottoporli a breve centrifugazione.
- Operare rapidamente tenendo i componenti in ghiaccio o nel blocco di raffreddamento (blocco di caricamento a 72/96 pozzetti).

Avvertenze

Per informazioni riguardanti la sicurezza del kit *artus M. tuberculosis* RG PCR, consultare le appropriate schede di sicurezza (SDS), disponibili online nel pratico e compatto formato PDF all'indirizzo www.qiagen.com/safety.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

I componenti del kit *artus M. tuberculosis* RG PCR devono essere conservati ad una temperatura compresa fra -15°C e -30°C e sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Evitare di scongelarli e congelarli più di due volte, poiché ciò potrebbe ridurre la sensibilità del test. Se si prevede un uso non regolare dei reagenti, congelarli in aliquote. La conservazione a 2-8°C non deve superare un periodo di 5 ore.

Procedura

Punti importanti prima di iniziare

- L'aggiunta di carrier RNA è di fondamentale importanza per l'efficacia dell'estrazione e, quindi, per la resa del DNA/RNA. L'aggiunta di carrier (omopolimero di RNA Poly[rA], non incluso nel kit QIAamp DNA Mini) è fortemente raccomandata per l'estrazione degli acidi nucleici da fluidi corporei acellulari e materiale a basso contenuto di DNA/RNA (ad es. FCS).
- Risospendere il carrier RNA liofilizzato (omopolimero di RNA Poly[rA], non incluso nel kit QIAamp DNA Mini) utilizzando il tampone di eluizione (non utilizzare il tampone di lisi) del kit di estrazione (tampone AE del kit QIAamp DNA Mini) e preparare una diluizione con una concentrazione di 1 µg/µl. Dividere questa soluzione del carrier RNA in un numero di aliquote sufficiente per le proprie esigenze e conservarle a una temperatura compresa fra -15°C e -30°C. Evitare di ricongelare più di 2 volte un'aliquota del carrier RNA.
- Utilizzare 1 µg di carrier RNA per 100 µl di tampone di lisi. Ad esempio, se il protocollo di estrazione indica 200 µl di tampone di lisi, aggiungere 2 µl di carrier RNA (1 µg/µl) direttamente al tampone di lisi (tampone AL del kit QIAamp DNA Mini). Prima di cominciare ogni estrazione, si raccomanda di preparare una miscela fresca di tampone di lisi, carrier RNA e controllo interno (vedere "Controllo interno," pag. 12) secondo il seguente schema di pipettamento:

Reagente	Numero dei campioni	
	1	12
Tampone AL (tampone di lisi)	ad es., 200 µl	ad es., 2.400 µl
Carrier RNA (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Controllo interno	10 µl	120 µl
Volume totale	212 µl	2544 µl
Volume per estrazione	200 µl	ogni 200 µl

- Utilizzare **immediatamente** per l'estrazione la miscela appena preparata di tampone di lisi, controllo interno e carrier RNA. **Non** è ammessa la conservazione della miscela.
- Il kit *artus M. tuberculosis* RG PCR non deve essere usato con metodi di estrazione a base di fenolo.
- **Importante:** Il controllo interno del kit *artus tuberculosis* RG PCR è utilizzato direttamente nella procedura di estrazione (vedere "Controllo interno", pag. 12).

Estrazione del DNA

Prima dell'estrazione del DNA, si raccomanda di concentrare grandi volumi di campioni o neutralizzare campioni fortemente acidi. Per l'analisi dell'espettorato, consigliamo una decontaminazione con NALC-NaOH; il liquido gastrico deve essere neutralizzato con tampone fosfato. Dopo la centrifugazione finale, è possibile utilizzare il precipitato di batteri per la procedura di estrazione del DNA riportata di seguito.

Il kit QIAamp DNA Mini (cat. n° 51304) è convalidato per l'estrazione del DNA micobatterico da espettorato, BAL, secrezione bronchiale, FCS, liquido gastrico o iniezione peritoneale umani da utilizzare con il kit *artus M. tuberculosis* RG PCR.

Al fine di garantire una lisi dei micobatteri efficace e priva di contaminazione, eseguire l'estrazione del DNA attenendosi alla procedura riportata di seguito, che si discosta dai protocolli contenuti nel *Manuale del kit QIAamp DNA Mini e Blood Mini (QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook)*.

Importante: Tutte le fasi di pipettamento prima dell'incubazione a 95°C devono essere eseguite in una cappa di sicurezza di classe II, poiché i campioni sono potenzialmente infetti.

1. Trasferire una quantità compresa tra 250 µl e 500 µl del campione decontaminato con NALC-NaOH in una provetta da 1,5 ml con tappo a vite.
 - È fondamentale utilizzare provette con tappo a vite.
 - Le provette con tappo a vite devono essere chiuse ermeticamente.
2. Centrifugare per 10 minuti a 17.000 x g (13.000 giri/min) in una centrifuga da banco.
3. Eliminare con cautela il supernatante con una pipetta.
 - Non toccare l'interno del coperchio della provetta. Se ciò accade, sostituire immediatamente il guanto potenzialmente contaminato.
4. Aggiungere 180 µl di miscela di lisozima (20 mg/ml lisozima; 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 2 mM EDTA; 1,2% Triton™) e risospendere il precipitato aspirandolo e rilasciandolo con la pipetta.
5. Incubare per almeno 1 ora a 37°C in blocco riscaldante o termomiscelatore.
 - Si sconsiglia l'uso del bagnomaria.
6. Centrifugare brevemente per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.
 - Dopo ogni fase di incubazione, centrifugare brevemente la provetta per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.

7. Aggiungere 20 µl di proteinasi K e 200 µl di tampone AL contenente carrier RNA e IC (vedere sopra e "Controllo interno," pag. 12).
 - Non toccare l'interno del coperchio della provetta. Se ciò accade, sostituire immediatamente il guanto potenzialmente contaminato.
8. Miscelare bene in vortex.
9. Incubare per 30 minuti a 56°C in blocco riscaldante o termomiscelatore.
 - Non è consigliato l'uso del bagnomaria.
10. Centrifugare brevemente per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.
 - Dopo ogni fase di incubazione, centrifugare brevemente la provetta per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.
11. Incubare per 15 minuti a 95°C.

Importante: Non superare il tempo di incubazione poiché ciò potrebbe causare la degradazione del DNA.
12. **Nota:** I campioni non sono più infetti soltanto una volta completata l'incubazione a 95°C. Fare raffreddare il campione a temperatura ambiente.
 - Accertarsi che i campioni si raffreddino a temperatura ambiente dopo la fase di riscaldamento a 95°C poiché, in caso contrario, il rischio di contaminazione mediata da aerosol dopo l'apertura della provetta è estremamente elevato.
13. Centrifugare brevemente per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.

Rispettare il "Protocollo: Purificazione del DNA da tessuti" nel *Manuale del kit QIAamp DNA Mini e Blood Mini (QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook)* (terza edizione, giugno 2012) iniziando con l'aggiunta di etanolo nella fase 6, quindi effettuare l'eluizione finale del DNA con 100 µl di tampone AE.

- Accertarsi di non bagnare il bordo di una colonna spin QIAamp.
- Non toccare l'interno del coperchio di una colonna spin. Se ciò accade, sostituire immediatamente il guanto potenzialmente contaminato.
- Non utilizzare lo stesso puntale della pipetta per campioni diversi, nemmeno per applicare i tamponi di lavaggio AW1 e AW2 o il tampone di eluizione AE. In tal modo si evita la contaminazione crociata tra i campioni e la contaminazione di un tampone.
- Utilizzare ogni provetta di prelievo da 2 ml una sola volta. Se le provette di prelievo si esauriscono, si possono anche utilizzare provette per microcentrifuga da 2 ml, rimuovendone i coperchi prima dell'uso.

- Si raccomanda vivamente di eseguire la fase 10 di centrifugazione del protocollo per eliminare i residui di etanolo. Si consiglia di aumentare il tempo di questa centrifugazione a 3 minuti.

Controllo interno

Il kit include un controllo interno (*M. tuberculosis* RG IC), che permette all'utilizzatore sia di controllare la procedura di estrazione del DNA che di verificare la possibile inibizione della PCR. Per questa applicazione, aggiungere durante l'estrazione il controllo interno in un rapporto di 0,1 μ l per 1 μ l di volume di eluizione. Ad esempio, se si utilizza il kit QIAamp DNA Mini, il DNA viene eluito in 100 μ l di tampone AE. Inizialmente, si devono quindi aggiungere 10 μ l del controllo interno. Il volume del controllo interno dipende dal volume di eluizione. L'uso di 10 μ l è **valido unicamente** per un volume di eluizione di 100 μ l (0,1 μ l ogni 1 μ l di volume di eluizione).

Nota: Il controllo interno e il carrier RNA (vedere "Estrazione del DNA", pag. 10) devono essere aggiunti esclusivamente alla miscela di tampone di lisi e di campione o direttamente al tampone di lisi.

Il controllo interno non deve essere aggiunto direttamente al campione. In caso di aggiunta al tampone di lisi, la miscela di controllo interno e tampone di lisi/carrier RNA deve essere preparata al momento e utilizzata immediatamente. La conservazione della miscela a temperatura ambiente o a 4°C può portare già dopo poche ore a un'anomalia del controllo interno e quindi ad una minore efficacia della procedura di estrazione.

Nota: Non aggiungere il controllo interno e il carrier RNA direttamente al campione.

Quantificazione

Per generare una curva standard sugli strumenti Rotor-Gene Q, tutti i 4 standard di quantificazione devono essere utilizzati e definiti nella finestra di dialogo **Edit Samples** (Modifica campioni) come standard alle concentrazioni specificate (vedi il manuale utente del rispettivo strumento).

La curva standard generata come sopra indicato può essere utilizzata anche per processi successivi, a condizione che almeno uno standard di **una** data concentrazione venga utilizzato nel rispettivo processo. A tale scopo occorre importare la curva standard precedentemente generata (vedi il manuale utente del rispettivo strumento). Tuttavia, questo metodo di quantificazione può causare discrepanze nei risultati a causa della variabilità fra i diversi processi PCR.

Per garantire un'accurata quantificazione si raccomanda vivamente di aggiungere il controllo interno al *M. tuberculosis* RG Master e alla *M. tuberculosis* RG Mg-Sol utilizzati per gli standard di quantificazione. Per questa applicazione, aggiungere il controllo interno direttamente al *M. tuberculosis* RG Master e alla *M. tuberculosis* RG Mg-Sol, come descritto nella fase 2 del protocollo (pag. 13), e utilizzare questa miscela master per ogni standard di quantificazione (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1–4).

Gli standard di quantificazione sono definiti come copie/ μ l. Per convertire in copie/ml di campione i valori determinati mediante la curva standard, applicare la seguente equazione:

$$\text{Risultati (copie/ml)} = \frac{\text{Risultato (copie/\mu l)} \times \text{volume di eluizione (\mu l)}}{\text{Volume campione (ml)}}$$

In linea di principio, si deve immettere nell'equazione di cui sopra il volume iniziale del campione. Questo è da tenere presente soprattutto quando il volume campione è stato modificato prima dell'estrazione degli acidi nucleici (ad es. per riduzione dovuta a centrifugazione o per aumento dovuto ad aggiunta di volume per raggiungere la quantità richiesta per l'estrazione).

PCR sugli strumenti Rotor-Gene Q

- Dedicare il tempo necessario ad acquisire familiarità con il Rotor-Gene Q prima di avviare il protocollo. Consultare il manuale utente dello strumento.
 - Accertarsi che in ogni PCR siano inclusi almeno uno standard di quantificazione e almeno un controllo negativo (acqua, grado PCR). Per generare una curva standard, utilizzare tutti i 4 standard di quantificazione forniti (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1–4) per ogni PCR.
 - Verificare che il blocco di raffreddamento (accessorio dello strumento Rotor-Gene Q) sia stato preraffreddato a 2–8°C.
 - Prima di ogni utilizzo, tutti i reagenti devono essere scongelati completamente, miscelati (aspirandoli e rilasciandoli più volte con la pipetta o agitandoli rapidamente su vortex) e centrifugati brevemente.
1. Inserire il numero desiderato di provette per PCR negli adattatori del blocco di raffreddamento.
 2. Preparare una miscela master in base alla tabella seguente:

	Numero dei campioni	
	1	12
M. tuberculosis RG Master	13 µl	156 µl
M. tuberculosis RG Mg-Sol*	2 µl	24 µl
Volume totale	15 µl	180 µl

3. Pipettare 15 µL della miscela master in ogni provetta per PCR. Aggiungere poi 10 µl del campione di DNA eluito (vedi tabella seguente).

A questo punto, occorre utilizzare 10 µl di almeno uno degli standard di quantificazione (M. tuberculosis RG QS 1–4) come controllo positivo e 10 µl di acqua (acqua, grado PCR) come controllo negativo.

	Numero dei campioni	
	1	12
Miscela master	15 µl	15 µl ciascuno
Campione	10 µl	10 µl ciascuno
Volume totale	25 µl	25 µl ciascuno

4. Chiudere le provette per PCR.
5. Verificare che l'anello di bloccaggio (accessorio dello strumento Rotor-Gene) sia presente sopra il rotore per evitare l'apertura accidentale delle provette durante l'analisi.
6. Per rilevare tutti i componenti del complesso *M. tuberculosis*, creare un profilo termico come di seguito descritto.

Impostazione dei parametri generali del test	Figure 1, 2 e 3
Attivazione iniziale dell'enzima hot-start	Figura 4
Amplificazione del DNA	Figura 5
Regolazione della sensibilità del canale di fluorescenza	Figura 6
Avvio del processo	Figura 7

Tutte le specifiche fanno riferimento al software del Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q versione 1.7.94, al software del Rotor-Gene 6000 versione 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 e al

software del Rotor-Gene 3000 versione 6.0.23. Per ulteriori informazioni sulla programmazione degli strumenti Rotor-Gene consultare il relativo manuale utente.

Nelle figure queste impostazioni sono evidenziate da un riquadro nero in grassetto. Sono incluse illustrazioni degli strumenti Rotor-Gene Q. Se per il Rotor-Gene 3000 sono necessari valori diversi, tali differenze sono indicate nel testo stesso.

7. In primo luogo, aprire la finestra di dialogo **New Run Wizard** (Nuovo Wizard analisi) (Figura 1). Spuntare la casella **Locking Ring Attached** (Anello di bloccaggio collegato) e cliccare su **Next** (Avanti).

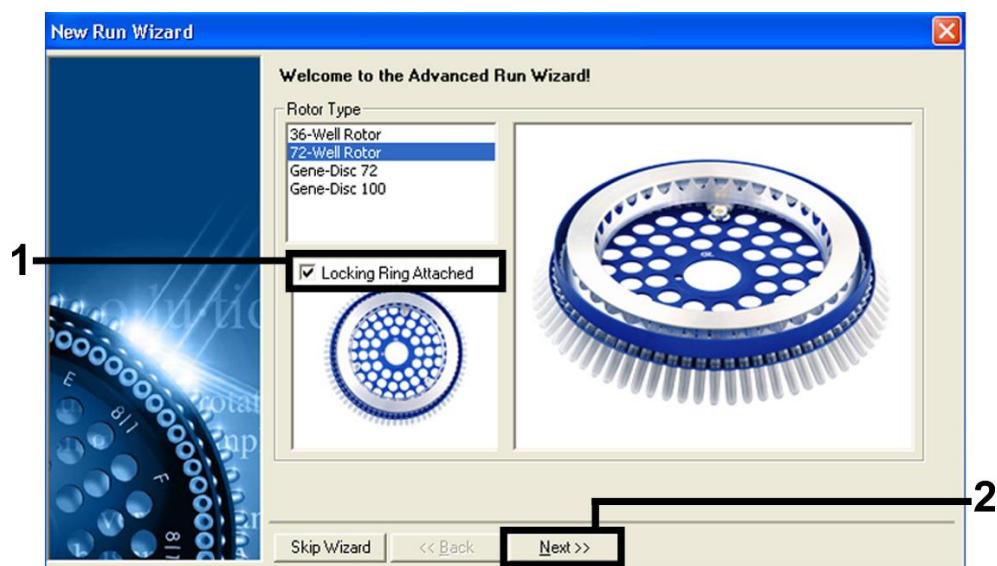


Figura 1. Finestra di dialogo "New Run Wizard".

8. Selezionare **25** per il volume di reazione PCR e cliccare su **Next** (Figura 2).

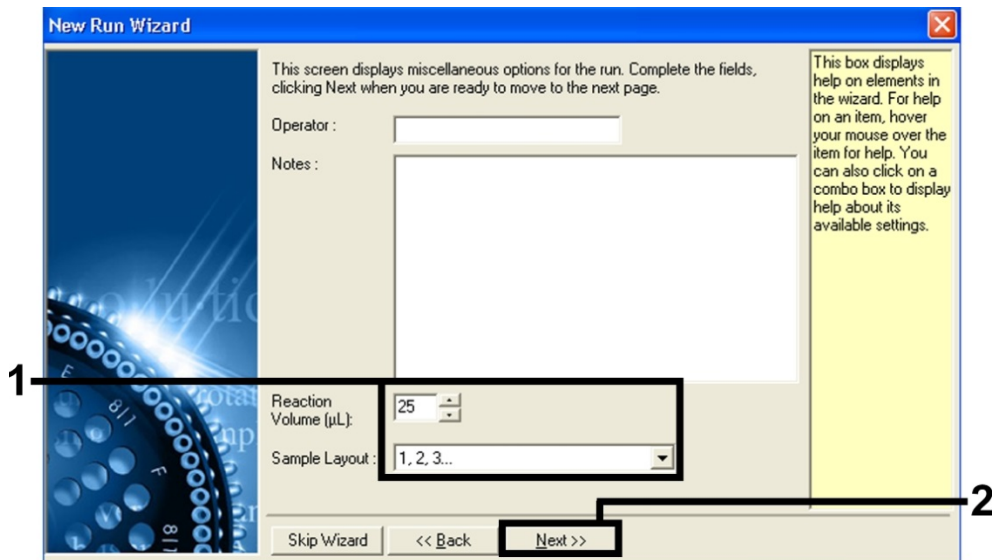


Figura 2. Impostazione dei parametri generali del test.

9. Cliccare sul pulsante **Edit Profile** (Modifica profilo) nella successiva finestra di dialogo **New Run Wizard** (Figura 3) e programmare il profilo termico, come illustrato nelle Figure 4 e 5.

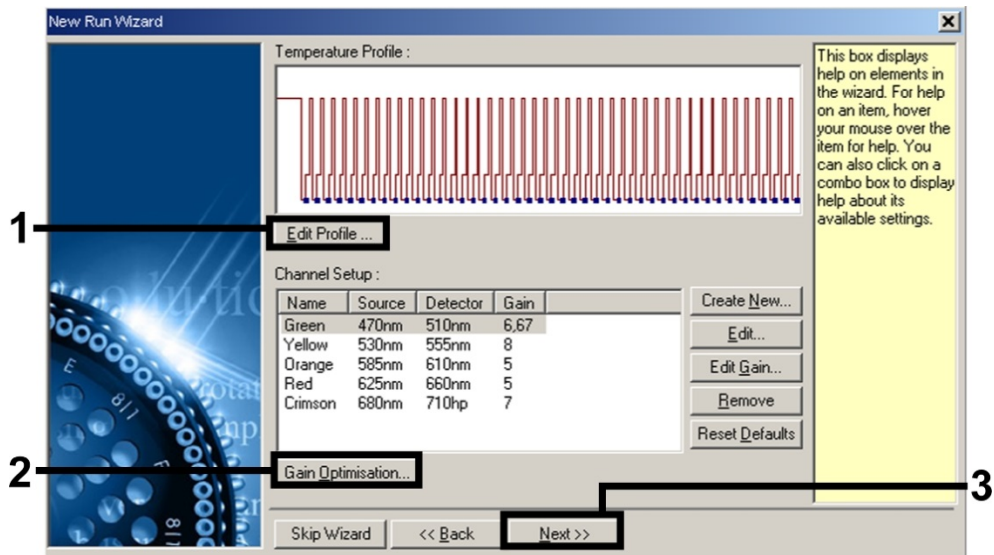


Figura 3. Modifica del profilo.

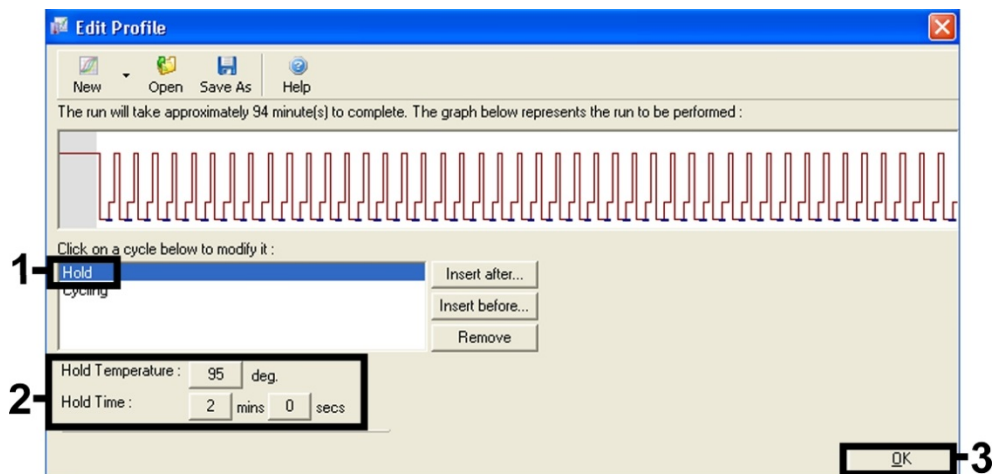


Figura 4. Attivazione iniziale dell'enzima hot-start.

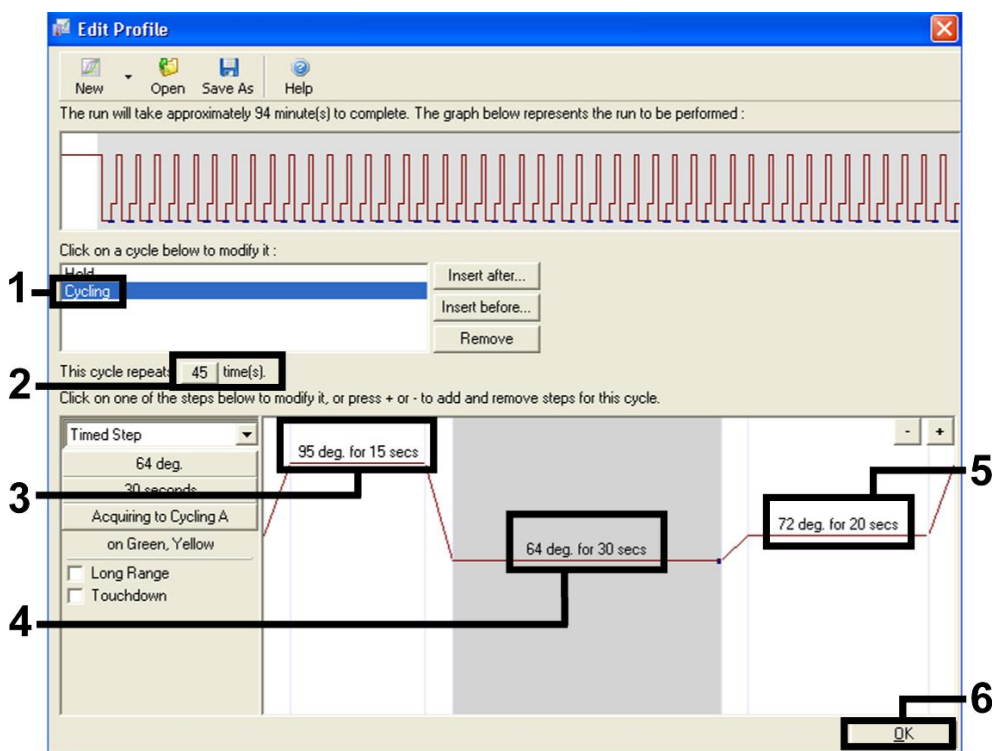


Figura 5. Amplificazione del DNA.

Nota: Sul Rotor-Gene 3000 il software definisce i coloranti di fluorescenza come FAM/Sybr®, JOE.

10. Il range di rilevamento dei canali di fluorescenza deve essere determinato in base all'intensità della fluorescenza nelle provette per PCR. Cliccare su **Gain Optimisation** (Ottimizzazione

gain) nella finestra di dialogo **New Run Wizard** (vedere Figura 3) per aprire la finestra **Auto-Gain Optimisation Setup** (Setup ottimizzazione auto-gain).

11. Impostare la temperatura di calibrazione su **64** per farla coincidere con la temperatura di annealing del programma di amplificazione (Figura 6).

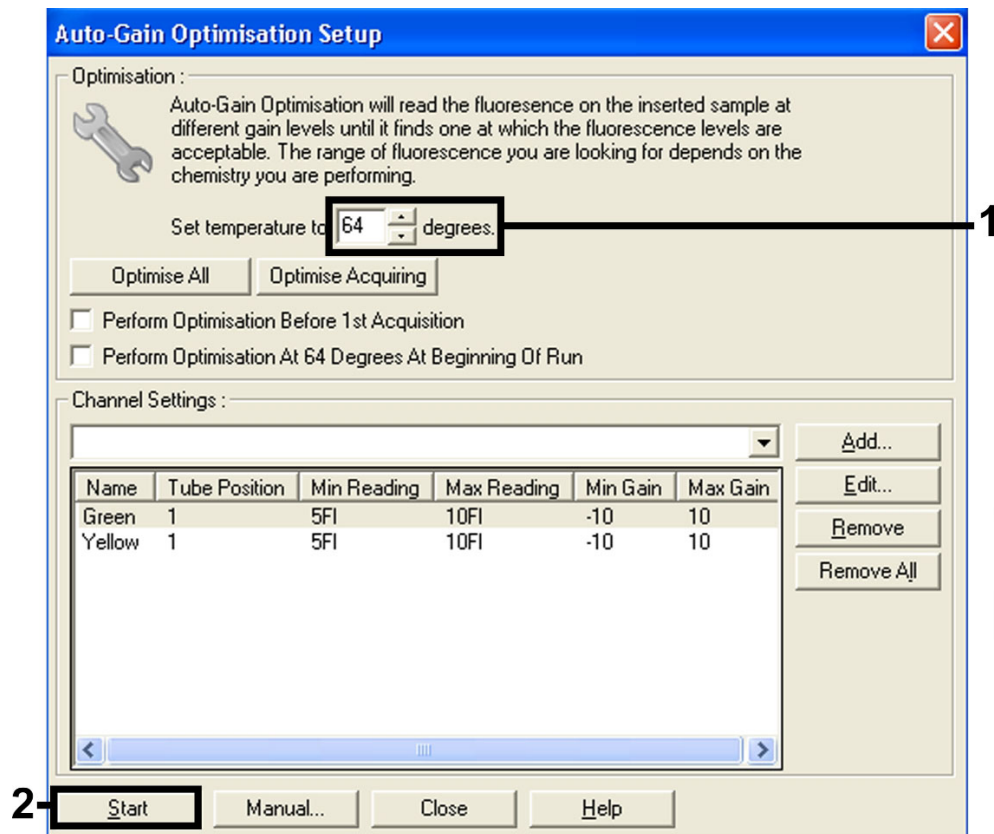


Figura 6. Regolazione della sensibilità dei canali di fluorescenza.

Nota: Sul Rotor-Gene 3000 il software definisce i coloranti di fluorescenza come **FAM/Sybr** e **JOE**.

12. I valori del gain determinati con la calibrazione dei canali sono salvati automaticamente e sono elencati nell'ultima finestra del menu della procedura di programmazione (Figura 7). Cliccare su **Start Run** (Avvio processo).

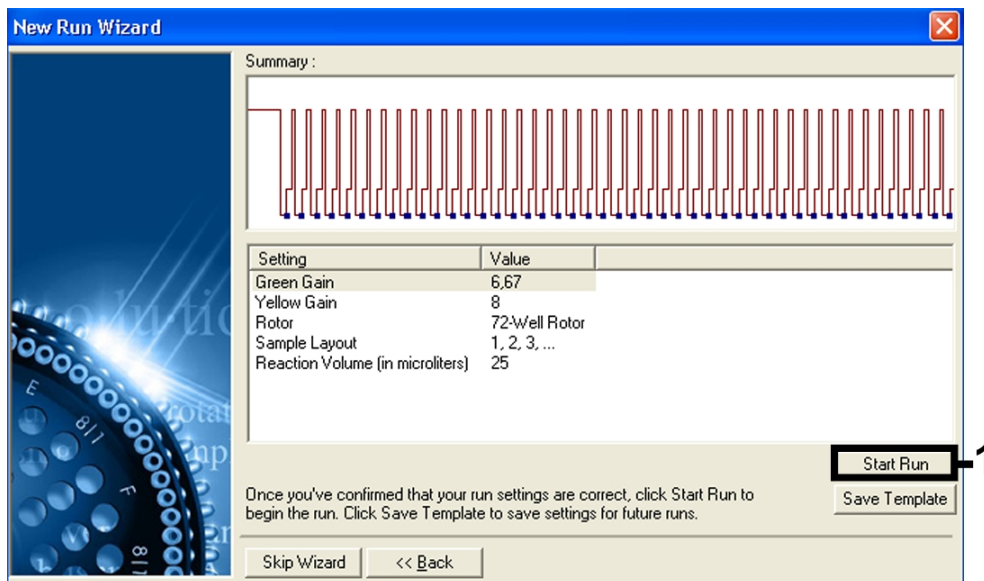


Figura 7. Avvio del processo.

Nota: Sul Rotor-Gene 3000 il software definisce i coloranti di fluorescenza come **FAM/Sybr** e **JOE**.

13. Terminato il processo, analizzare i dati secondo quanto riportato nel paragrafo "Interpretazione dei risultati," pag. 20.

Interpretazione dei risultati

Alcuni esempi di reazioni PCR positive e negative sono riportati nella Figura 8 e nella Figura 9.

Si possono ottenere i seguenti risultati:

- Viene rilevato un segnale nel canale di fluorescenza **Cycling Green**.

Il risultato dell'analisi è positivo. Il campione contiene DNA di uno o più componenti del complesso *M. tuberculosis*.

In questo caso, la rilevazione di un segnale nel canale **Cycling Yellow** è trascurabile, dal momento che alte concentrazioni iniziali di DNA del complesso *M. tuberculosis* (segnale positivo nel canale **Cycling Green**) possono portare ad un segnale di fluorescenza ridotto o assente del controllo interno nel canale **Cycling Yellow** (concorrenza).

Nota: Sul Rotor-Gene 3000 i rispettivi canali sono **Cycling A.FAM** per il segnale positivo e **Cycling A.JOE** per il controllo interno.

- Non viene rilevato nessun segnale nel canale di fluorescenza **Cycling Green**. Al tempo stesso viene rilevato un segnale dal controllo interno nel canale **Cycling Yellow**.

Nel campione non è rilevabile nessun DNA dei componenti del complesso *M. tuberculosis*. Il risultato dell'analisi può essere quindi considerato negativo.

In caso di PCR del complesso *M. tuberculosis* negativa, il segnale rilevato di IC esclude la possibile inibizione della PCR.

Nota: Sul Rotor-Gene 3000 i rispettivi canali sono **Cycling A.JOE** per il controllo interno e mancanza di segnale per **Cycling A.FAM**.

- Non si rileva nessun segnale nei canali **Cycling Green** o **Cycling Yellow**.

Non si può trarre alcun risultato.

Nota: Sul Rotor-Gene 3000 i rispettivi canali sono **Cycling A.FAM** e **Cycling A.JOE**.

Per informazioni sulle cause d'errore e relative soluzioni, consultare il paragrafo "Risoluzione dei problemi", pag. 22.

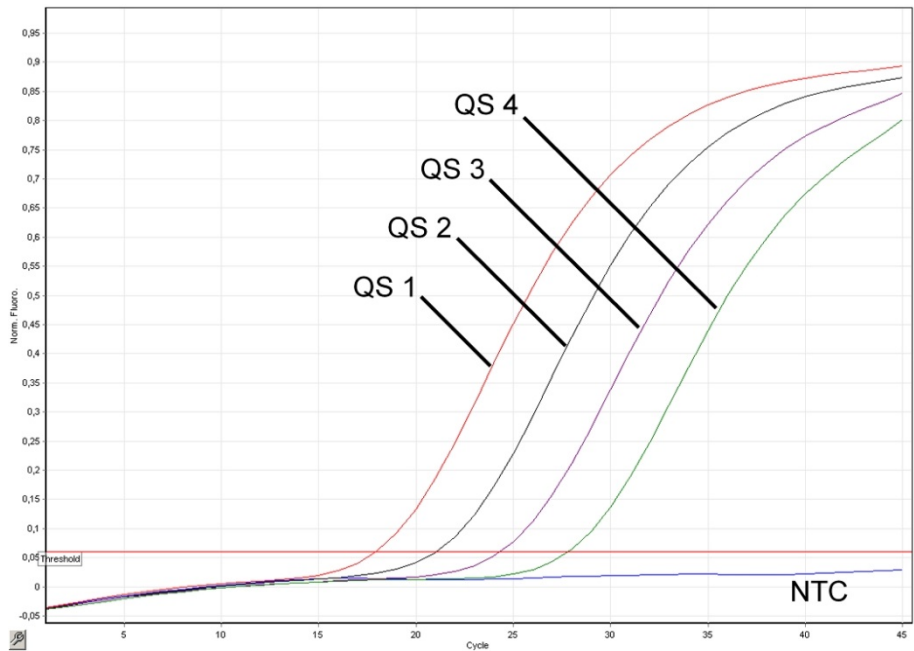


Figura 8. Rilevazione degli standard di quantificazione (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1-4) nel canale di fluorescenza Cycling Green. NTC: controllo non-template (controllo negativo).

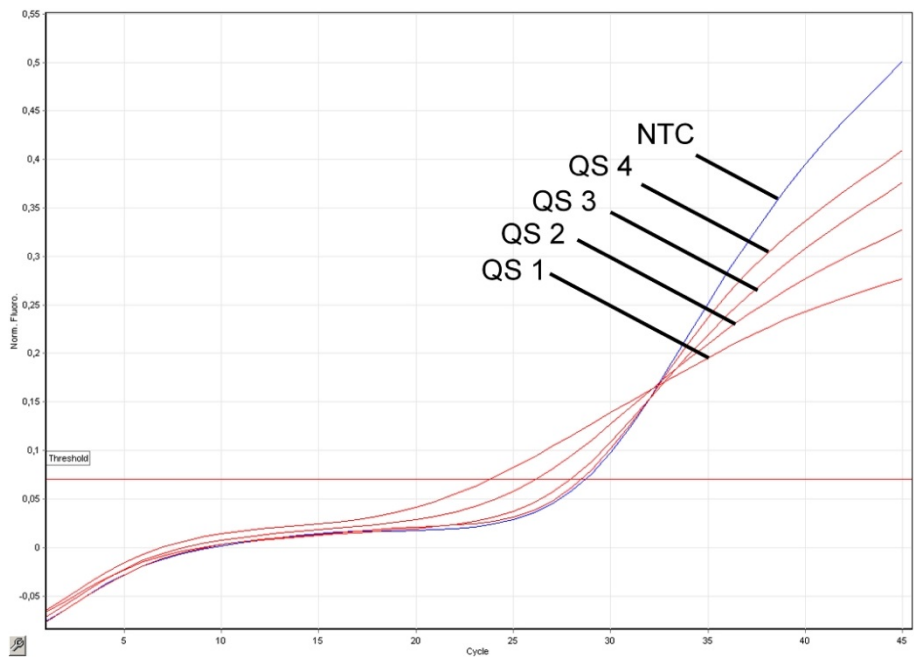


Figura 9. Rilevamento del controllo interno nel canale di fluorescenza Cycling Yellow con amplificazione contemporanea degli standard di quantificazione (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1-4). NTC: controllo non-template (controllo negativo).

Risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per chiarire eventuali dubbi che possano presentarsi.

Commenti e suggerimenti

Non viene rilevato nessun segnale con i controlli positivi (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1–4) nel canale di fluorescenza Cycling Green o Cycling A.FAM

- | | |
|--|---|
| a) Il canale di fluorescenza selezionato per l'analisi dei dati PCR non è conforme al protocollo | Per l'analisi dei dati selezionare il canale di fluorescenza Cycling Green o Cycling A.FAM per la PCR analitica del complesso <i>M. tuberculosis</i> PCR e il canale di fluorescenza Cycling Yellow o Cycling A.JOE per la PCR del controllo interno. |
| b) Programmazione non corretta del profilo termico dello strumento Rotor-Gene | Confrontare il profilo termico con il protocollo (vedere "PCR sugli strumenti Rotor-Gene Q," pag. 13). |
| c) Errata configurazione della reazione PCR | Controllare le fasi operative eseguite con lo schema di pipettamento (vedere "PCR sugli strumenti Rotor-Gene Q," pag. 13) e, se necessario, ripetere la PCR. |
| d) Le condizioni di conservazione per uno o più componenti del kit non corrispondevano alle istruzioni | Controllare le condizioni di conservazione (vedere "Conservazione e manipolazione dei reagenti," pag. 8) e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e, se necessario, utilizzare un nuovo kit. |
| e) Il kit <i>artus M. tuberculosis</i> RG PCR è scaduto. | Controllare le condizioni di conservazione (vedere "Conservazione e manipolazione dei reagenti," pag. 8) e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e, se necessario, utilizzare un nuovo kit. |

Segnale debole o assente del controllo interno nel canale di fluorescenza Cycling Yellow o Cycling A.JOE e assenza simultanea di un segnale nel canale Cycling Green o Cycling A.FAM per la PCR specifica del complesso *M. tuberculosis*

Commenti e suggerimenti

- | | |
|--|---|
| a) Le condizioni della PCR non sono conformi al protocollo | Verificare le condizioni della PCR (vedere "Non viene rilevato nessun segnale con controlli positivi [M. tuberculosis RG QS 1–4] nel canale di fluorescenza Cycling Green o Cycling A.FAM" sopra riportato) e ripetere la PCR con impostazioni corrette, se necessario. |
| b) La PCR era inibita | Verificare che sia stata usata la procedura di estrazione raccomandata (vedere "Estrazione del DNA", pag. 10) e seguire scrupolosamente le istruzioni del produttore.

Accertarsi che durante l'estrazione del DNA e prima dell'eluizione sia stata eseguita l'ulteriore fase di centrifugazione consigliata per eliminare eventuali residui di etanolo (vedi "Estrazione del DNA", pag. 10). |
| c) DNA perso durante l'estrazione | Se è stato aggiunto il controllo interno alla procedura di estrazione, il mancato segnale del controllo interno può indicare una perdita di DNA durante l'estrazione. Verificare che sia stata usata la procedura di estrazione raccomandata (vedere "Estrazione del DNA", pag. 10) e seguire scrupolosamente le istruzioni del produttore. |
| d) Le condizioni di conservazione per uno o più componenti del kit non corrispondevano alle istruzioni | Controllare le condizioni di conservazione (vedere "Conservazione e manipolazione dei reagenti," pag. 8) e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e, se necessario, utilizzare un nuovo kit. |
| e) Il kit <i>artus M. tuberculosis</i> RG PCR è scaduto | Controllare le condizioni di conservazione (vedere "Conservazione e manipolazione dei reagenti," pag. 8) e la data di scadenza dei reagenti (vedere etichetta del kit) e, se necessario, utilizzare un nuovo kit. |

Segnali con i controlli negativi nel canale di fluorescenza Cycling Green o Cycling A.FAM della PCR analitica

Commenti e suggerimenti

a) Si è verificata una contaminazione durante la preparazione della PCR	Ripetere la PCR in replicati con reagenti non ancora utilizzati. Se possibile, chiudere le provette per PCR subito dopo l'aggiunta del campione da testare. Accertarsi di avere pipettato i controlli positivi per ultimi. Verificare che l'area di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.
b) Si è verificata una contaminazione durante l'estrazione.	Ripetere l'estrazione e la PCR dei campioni da analizzare con reagenti non ancora utilizzati. Verificare che l'area di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.

In caso di dubbi o problemi contattare il QIAGEN Technical Services.

Controllo di qualità

In conformità con il sistema di gestione per la qualità di QIAGEN certificato ISO, ogni lotto del kit *artus M. tuberculosis RG PCR* è stato testato in base a specifiche prestabilite per garantire la costante qualità del prodotto.

Limiti della metodica

- L'uso di tutti i reagenti è riservato esclusivamente alla diagnostica in vitro.
- L'utilizzo è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle procedure della diagnostica in vitro.
- Per ottenere risultati ottimali della PCR è necessario attenersi rigorosamente al protocollo.
- Rispettare le date di scadenza dei singoli componenti, riportate sulla confezione e sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti.
- Sebbene accada raramente, eventuali mutazioni nelle regioni altamente conservate del genoma batterico coperte dai primer e/o dalla sonda del kit possono essere causa di sotto-

quantificazione o di una mancata individuazione dei batteri. La validità e le prestazioni del kit vengono revisionate ad intervalli regolari.

Caratteristiche delle prestazioni

Sensibilità analitica

Per determinare la sensibilità analitica del kit *artus M. tuberculosis* RG PCR, è stata preparata una serie di diluizioni standard da 10 al valore nominale di 0,003 e da 10 al valore nominale di 0,05 equivalenti di genoma di *M. tuberculosis*/µl, poi analizzate rispettivamente sul Rotor-Gene 6000 e sul Rotor-Gene 3000 in combinazione con il kit *artus M. tuberculosis* RG PCR. I test sono stati eseguiti in 3 giornate diverse su 8 replicati. I risultati sono stati determinati mediante un'analisi probit. La Figura 10 illustra graficamente l'analisi probit sul Rotor-Gene 6000. Il limite di rilevabilità analitica del kit *artus M. tuberculosis* RG PCR in combinazione con il Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 e il Rotor-Gene 3000 è pari rispettivamente a 0,23 copie/µl ($p = 0,05$) e 0,9 copie/µl ($p = 0,05$). Ciò significa che la probabilità di rilevare 0,23 copie/µl o 0,9 copie/µl è pari al 95%.

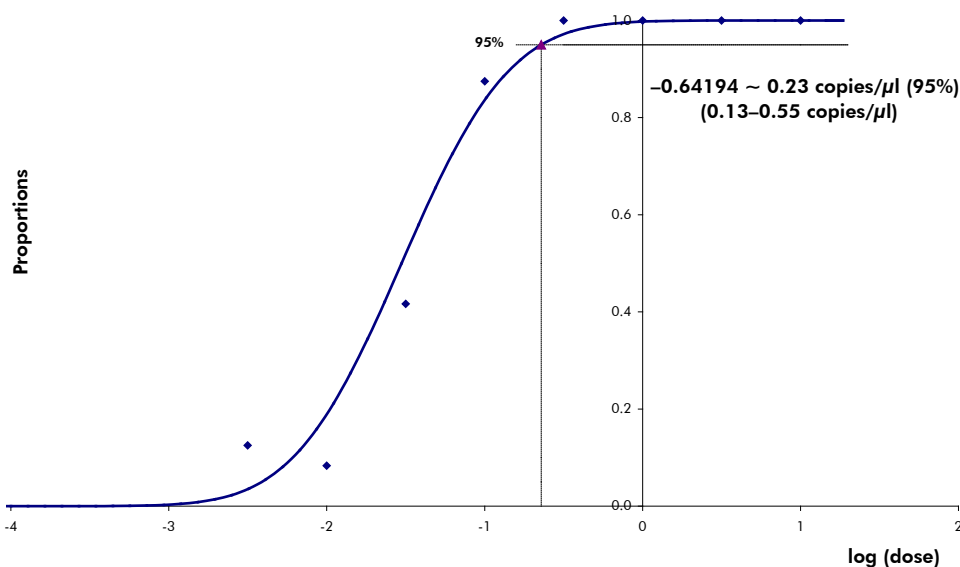


Figura 10. Analisi probit: *M. tuberculosis* (Rotor-Gene 6000). Sensibilità analitica del kit *artus M. tuberculosis* RG PCR su Rotor-Gene 6000.

Specificità

La specificità del kit *artus M. tuberculosis* RG PCR viene garantita in primo luogo dalla scelta dei primer e delle sonde, nonché dalle condizioni stringenti di reazione. I primer e le sonde sono stati controllati per accertare eventuali omologie con tutte le sequenze pubblicate nelle banche genetiche mediante analisi comparativa delle sequenze. La rilevabilità di tutti i componenti del complesso *M. tuberculosis* è stata così garantita.

Inoltre, la specificità è stata convalidata con 90 diversi campioni negativi del complesso *M. tuberculosis* (30 campioni di espettorato, 30 di BAL e 30 di secrezioni bronchiali). Questi campioni non hanno generato segnali con i primer e le sonde specifici per il complesso *M. tuberculosis*, inclusi nel *M. tuberculosis* RG Master.

Per determinare la specificità del kit *artus M. tuberculosis* RG PCR, è stato testato il gruppo di controllo indicato nella tabella 1 per rilevare una potenziale cross-reattività. Nessuno dei patogeni testati è risultato reattivo.

Tabella 1. Analisi della specificità del kit con patogeni potenzialmente cross-reattivi

Gruppo di controllo	<i>M. tuberculosis</i> (Cycling Green o Cycling A.FAM)	Controllo interno (Cycling Yellow o 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>	–	+

Gruppo di controllo	<i>M. tuberculosis</i> (Cycling Green o Cycling A.FAM)	Controllo interno (Cycling Yellow o Cycling A.JOE)
<i>Enterococcus faecalis</i>	–	+
<i>Enterococcus faecium</i>	–	+
<i>Escherichia coli</i>	–	+
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i>	–	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	–	+
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	–	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	–	+
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <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 malmoense</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>	–	+

Gruppo di controllo	<i>M. tuberculosis</i> (Cycling Green o Cycling A.FAM)	Controllo interno (Cycling Yellow o Cycling A.JOE)
<i>Nocardia brasiliensis</i>	–	+
<i>Nocardia farcinia</i>	–	+
<i>Nocardia oitidiscaviarum</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>	–	+

Precisione

I dati sulla precisione del kit *artus M. tuberculosis* RG PCR sono stati raccolti mediante gli strumenti Rotor-Gene e consentono di determinare la varianza totale del test. La varianza totale è composta dalla variabilità intra-test (variabilità di risultati multipli di campioni con la stessa concentrazione in uno stesso esperimento), dalla variabilità inter-test (variabilità di risultati multipli del test generati su strumenti differenti dello stesso tipo da operatori differenti in uno stesso laboratorio) e dalla

variabilità inter-lotto (variabilità di risultati multipli del test ottenuti con lotti diversi). I dati ottenuti sono stati utilizzati per determinare la deviazione standard, la varianza e il coefficiente di variazione per il patogeno specifico e il controllo interno di PCR.

Questi dati sono stati ottenuti per il kit *artus M. tuberculosis RG PCR* sulla base dello standard di quantificazione alla minima concentrazione (QS 4; 30 copie/ μ l). I test sono stati effettuati con 8 replicati. I dati di precisione sono stati calcolati sulla base dei valori C_T delle curve di amplificazione (C_T : ciclo soglia, vedere Tabella 2). Inoltre, i dati di precisione per i risultati quantitativi in copie/ μ l sono stati stabiliti utilizzando i corrispondenti valori C_T (Tabella 3). Sulla base di questi risultati, lo scarto statistico generale di un dato campione alla concentrazione menzionata è pari a 1,26% (C_T) o 14,64% (copie/ μ l), e a 1,57% (C_T) per la rilevazione di IC. Questi valori si basano sulla totalità dei singoli valori delle variabilità stabilite.

Tabella 2. Dati sulla precisione basati sui valori C_T

	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-assay: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0,10	0,01	0,32
Variabilità intra-assay: Controllo interno	0,13	0,02	0,45
Variabilità inter-assay: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0,24	0,06	0,78
Variabilità inter-assay: Controllo interno	0,29	0,08	0,95
Variabilità inter-lotto: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0,39	0,15	1,28
Variabilità inter-lotto: Controllo interno	0,66	0,43	2,16
Varianza totale: M. tuberculosis RG/TM QS 4	0,38	0,15	1,26
Varianza totale: Controllo interno	0,48	0,23	1,57

Tabella 3. Dati di precisione sulla base dei risultati quantitativi (in copie/μl)

	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-assay: M. tuberculosis RG/TM QS 4	1,97	3,90	6,56
Variabilità inter-assay: M. tuberculosis RG/TM QS 4	3,93	15,43	13,00
Variabilità inter-lotto: M. tuberculosis RG/TM QS 4	5,51	30,41	18,09
Varianza totale: M. tuberculosis RG/TM QS 4	4,44	19,69	14,64

Robustezza

Il controllo della robustezza serve per determinare la percentuale totale di errore del kit *artus M. tuberculosis RG PCR*. A un totale di 30 campioni, ciascuno di espettorato, BAL e secrezione bronchiale, negativi al complesso *M. tuberculosis*, sono state aggiunte 3 copie/μl di volume di eluizione di DNA controllo di *M. tuberculosis* (all'incirca 3 volte la concentrazione del limite di sensibilità analitica). Dopo estrazione con il kit QIAamp DNA Mini (vedere "Estrazione del DNA," pag. 10), questi campioni sono stati analizzati con il kit *artus M. tuberculosis RG PCR*. Sul totale dei campioni di *tuberculosis*, la percentuale di errore era pari allo 0%. Inoltre, la robustezza di IC è stata valutata mediante purificazione e analisi dei campioni di espettorato, BAL e secrezione bronchiale negativi al complesso *M. tuberculosis* (30 ciascuno). La percentuale totale di errore era pari allo 0%. Non sono state riscontrate inibizioni di alcun genere. La robustezza del kit *artus M. tuberculosis RG PCR* è pertanto risultata $\geq 99\%$.









Riproducibilità


I dati di riproducibilità vengono rilevati per effettuare una valutazione continua delle prestazioni del kit *artus M. tuberculosis RG PCR* e anche per un confronto con altri prodotti. Questi dati sono ottenuti dalla partecipazione a programmi di valutazione consolidati.

Riferimenti bibliografici

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

Simboli

Simbolo	Definizione
	Data di scadenza
	Codice del lotto
	Produttore
	N° di catalogo
	Numero di materiale
	Marchio CE per la Conformità Europea
	Dispositivo medico per diagnostica in vitro
	Contenuto sufficiente per <N> test

Simbolo	Definizione
COMP	Componenti
CONT	Contiene
NUM	Numero
GTIN	Codice GTIN
	Limite di temperatura
QS	Standard di quantificazione
IC	Controllo interno
Mg-Sol	Soluzione di magnesio

Informazioni per l'ordine

Prodotto	Contenuto	Cat n.
<i>artus M. tuberculosis</i> RG PCR Kit (24)	Per 24 reazioni: Master, soluzione di Mg, 4 standard di quantificazione, controllo interno, acqua (grado PCR)	4555263
<i>artus M. tuberculosis</i> RG PCR Kit (96)	Per 96 reazioni: Master, soluzione di Mg, 4 standard di quantificazione, controllo interno, acqua (grado PCR)	4555265
Kit QIAamp DNA Mini – per l'estrazione del DNA genomico, mitocondriale, batterico, parassita o virale		
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Per 50 preparazioni del DNA: 50 colonne QIAamp Mini Spin, proteinasi K QIAGEN, reagenti, tamponi, provette di raccolta (2 ml)	51304
Rotor-Gene Q MDx e accessori		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Termociclatore per real-time PCR a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio; installazione e addestramento non inclusi	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Termociclatore per real-time PCR a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio; installazione e addestramento non inclusi	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Strumento per real-time PCR a 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio; installazione e addestramento non inclusi	9002042

Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Strumento per real-time PCR a 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Termociclatore per real-time PCR a 2 canali (verde, giallo), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio; installazione e addestramento non inclusi	9002002
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Termociclatore per real-time PCR a 2 canali (verde, giallo), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Termociclatore per real-time PCR e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 2 canali (verde, giallo) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio; installazione e addestramento non inclusi	9002012
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Termociclatore per real-time PCR e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 2 canali (verde, giallo) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Blocco in alluminio per setup manuale della reazione con pipetta a un canale in 72 provette x 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Blocco in alluminio per setup manuale della reazione in una serie standard 8 x 12 con 96 provette da 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strisce di 4 provette e tappi per 1000 reazioni	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strisce di 4 provette e tappi per 10.000 reazioni	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 provette a parete sottile per 1000 reazioni	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 provette a parete sottile per 1000 reazioni	981008

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili nel sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di QIAGEN Technical Services o al proprio distributore locale.

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

I marchi, i nomi registrati ecc. utilizzati nel presente documento, anche se non contrassegnati specificamente come tali, vanno considerati protetti dalla legge.

Il kit artus M. tuberculosis RG PCR è un dispositivo di diagnostica contrassegnato CE secondo la Direttiva Europea 98/79/CE concernente i dispositivi medico-diagnostici in vitro. Non disponibile in tutti i paesi.

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili nel sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di QIAGEN Technical Services o al proprio distributore locale.

L'acquisto di questo prodotto ne consente l'uso all'acquirente per l'esecuzione di servizi per la diagnostica umana in vitro. Con il presente non si concede nessun brevetto generico o licenza di altro tipo in aggiunta agli specifici diritti di utilizzo garantiti dall'acquisto.

Contratto di Licenza Limitato per il kit artus M. tuberculosis RG PCR

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del prodotto dei seguenti termini:

1. Questo prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al presente manuale e soltanto con i componenti contenuti nel kit. QIAGEN non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'aggiunta dei componenti del kit ad altri componenti non contenuti nel kit, ad eccezione di quanto descritto nei protocolli forniti insieme al prodotto, nel presente manuale e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati forniti da utenti QIAGEN per altri utenti QIAGEN. Tali protocolli non sono stati completamente testati ed ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non garantisce in alcun modo che non violino i diritti di terze parti.
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, QIAGEN non garantisce in alcun modo che questi kit e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Il presente kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per l'impiego monouso e non possono essere riutilizzati, ripristinati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit concordano nel non consentire a nessuno di intervenire o consentire ad altri di realizzare o contribuire a realizzare azioni proibite. QIAGEN può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di Licenza Limitato e recupererà tutte le spese di indagine e spese legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di Licenza Limitato o qualsiasi diritto di proprietà intellettuale correlato al kit e/o ai suoi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, consultare il sito www.qiagen.com.

HB-0058-007 151031225 © 2007–2015 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

