

Kupní smlouva
č. j. KRPB-227759-14/ČJ-2018-0600VZ

Čl. I.
Smluvní strany

Kupující:

Česká republika – Krajské ředitelství policie Jihomoravského kraje

se sídlem: Kounicova 24, 611 32 Brno

zastoupená:

IČ:

DIČ:

bankovní spojení:

číslo účtu:

kontaktní osoba:

e – mail:



CNB, pobočka Brno



(dále jen „kupující“) na straně jedné

Prodávající:

obchodní firma: DYNEX TECHNOLOGIES, spol. s.r.o.

sídlo: Vodičkova 791/41, 110 00 Praha 1

zastoupená:

IČ:

DIČ:

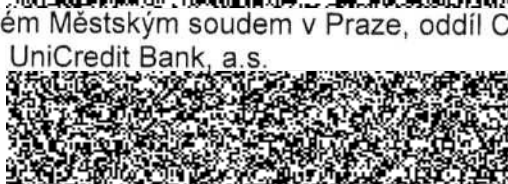
zapsaná v OR vedeném Městským soudem v Praze, oddíl C, vložka 15914

bankovní spojení:

číslo účtu:

kontaktní osoba:

e – mail:



na straně druhé (dále jen jako „prodávající“)

uzavírají ve smyslu ustanovení § 2079 a násl. zák. č. 89/2012 Sb., Občanského zákoníku,
v platném znění (dále jen „Občanský zákoník“), tuto

kupní smlouvu

Čl. II.

Předmět smlouvy

2.1. Předmětem plnění je **nákup 1 ks Real Time PCR a 1 ks pipetovacího robotu**, a to včetně dopravy do místa plnění, viz Produktový list v Příloze č. 2 této kupní smlouvy.

Základní technické parametry Real Time PCR:

- Přístroj pro kvantifikaci/analýzu nukleových kyselin (DNA/RNA/proteinů) na principu real-time PCR
- Minimální kapacita přístroje: 36 reakčních zkumavek
- Možnost rozšíření kapacity přístroje na alespoň 100 reakčních zkumavek
- Součástí dodávky musí být PC/notebook se softwarem a příslušenstvím potřebným k ovládání přístroje a analýze
- Řídící SW kompatibilní min. s Windows7, bezplatné aktualizace/upgrade software, možnost instalovat řídící SW na libovolný počet počítačů (bez omezení počtem licencí, bezplatné), řídící SW umožňující analýzu získaných hrubých dat pro: absolutní kvantifikaci, relativní kvantifikaci, analýza 2 standardních křivek, delta/delta Ct, komparativní kvantifikace,
- Řídící SW musí umožňovat import standardních křivek mezi jednotlivými analýzami
- Možnost importu dat k analýze do software a exportu výsledků ve formě textového souboru
- Minimální teplotní přesnost: $\pm 0,5$ °C
- Vysoká well-to-well uniformita s maximální odchylkou (SD): $\pm 0,02$ °C
- Minimální rozsah teplot: 35 - 99 °C
- Rychlost ohřevu: nastavitelná alespoň do 15 °C/s
- Rychlost chlazení: nastavitelná alespoň do 20 °C/s
- Senzitivita při kvantifikaci < 1 pg/ μ l
- Přístroj musí umožňovat multiplex PCR - současnou detekci minimálně 5 různých fluoroforů
- Přístroj musí umožňovat detekci těchto fluoroforů: FAM, SYBR Green, JOE, VIC, HEX, TET, Cy3, ROX, Texas Red, Cy5, Quasar 705, LightCycler Red705
- Pro ekonomické zpracování menšího počtu testů přístroj musí umožňovat analýzu vzorků i v jednotlivých PCR zkumavkách
- Přístroj musí umožňovat programovat své vlastní protokoly a analýzy
- Pevný zdroj světla LED s doživotní zárukou funkčnosti, detektor s automatickou nebo nastavitelnou citlivostí, bez nutnosti kalibrace
- Certifikace pro forenzní aplikace
- Výrobce autorizovaná aplikační podpora pro real-time PCR analýzy

Základní technické parametry na pipetovací robot pro přípravu vzorků ke kvantifikaci DNA:

- Jednokanálový pipetovací robot validovaný výrobcem pro použití ve forenzních aplikacích
- Přístroj musí být dodán s PC/notebookem vč. ovládacího software, který umožní vizuální simulaci pracovního prostoru
- Pipetovací robot musí být kompatibilní s následujícím spotřebním materiálem: ABI MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, LightCycler 96 Capillary Rack,

Light Cycler 480 96-Well Plate, MagNa Pure LC 32-Well Plate, 384-Well Plate, 1,5 ml zkumavky, 2 ml zkumavky, 5 ml zkumavky, 0,2 ml zkumavky, 0,5 ml zkumavky, COBAS TaqMan® 48 Plates, 16 tube-rack Cepheid Smartcycler – Jedná se o běžně používaný plast při následné kvantifikaci amplifikaci DNA

- Přístroj musí být schopen detekovat výšku hladiny pomocí konduktivních špiček s filtrem, opakované použití špiček při pipetování stejné reagentie (důvodem je dosažení přesnosti a ověření množství pipetovaných reagentii)
- Minimální pipetované množství je 1 µl
- Možnost sériového ředění s různými poměry ředění a poolování vzorku (používané pro qPCR)
- Možnost připravovat několik různých PCR reakcí (pro použití spotřebního materiálu více výrobců)
- Dodání pipetovacího robota včetně validace a návrhu workflow pro celý proces kvantifikace DNA
- Software musí být součástí dodávky a musí být schopen upozornit na problémy při pipetování, a zda došlo během pipetování k neočekávané chybě.
- SW musí obsahovat protokol pro normalizaci koncentrace DNA (DNA koncentraci je nutné normalizovat před dalším zpracováním – automatizované řešení zamezí chybám lidského operátora).
- SW lze instalovat neomezeně na více PC (neomezená uživatelská licence).
- Systém umožňuje tzv. sledovatelnost podle nařízení FDA 21 CFR Část 11 (elektronický záznam a elektronický podpis), s cílem dokumentovat sledovatelnost prováděných činností (nutnost dle ISO 17025:2017)
- Sběr použitých špiček mimo přístroj – nedochází ke kumulaci zdrojů kontaminace uvnitř pracovního prostoru.
- Integrovaná UV lampa pro dekontaminaci vnitřního prostoru robota. Integrovaný HEPA filtr (ochrana obsluhy přístroje při práci s potenciálně infekčním biologickým materiálem a naopak minimalizace kontaminace)
- Maximální šířka 55 cm (vzhledem k omezeným prostorům laboratoří)

2.2. Obecné požadavky:

2.2.1. Z důvodu omezeného prostoru laboratoří nesmí kompletní přístrojová sestava včetně PC přesahovat rozměr 170 x 75 cm.

2.2.2. Součástí dodávky bude uvedení přístrojů do provozu, validace a proškolení všech pracovníků oddělení genetiky.

2.2.3. Přístroje budou dodány nové, nepoužité, s rokem výroby 2017 a novější.

2.2.4. S dodáním přístroje prodávající provede validaci nebo budou dodány podrobné validační protokoly, dle kterých se provede validace pracovníkem kupujícího. Validační plán předložený prodávajícím v zadávacím řízení je součástí Přílohy č. 3 této kupní smlouvy.

2.3. Dodávka bude realizována při splnění všeobecných dodacích podmínek ve smyslu ustanovení § 2079 a násl. zákona č. 89/2012 Sb., občanský zákoník (dále jen „Občanský zákoník“).

Čl. III.

Kupní cena

3.1. Kupní cena je sjednána dohodou smluvních stran podle § 2 zák. č. 526/1990 Sb., o cenách, v platném znění, a dle cenové nabídky prodávajícího ze dne 25. 10. 2018 (viz

Příloha č. 1). Kupní cena dle Přílohy č. 1 je považována za cenu nejvýše přípustnou a nepřekročitelnou s výjimkou změny zákonné sazby DPH a zahrnující cenu za dopravu do místa plnění a další náklady související s dodávkou předmětu plnění.

3.2. Celková cena bez DPH: 1 233 595,- Kč

Celková cena vč. DPH: 1 492 650,- Kč

DPH činí: 21%

slovy: jedenmiliončtyřístadevadesátdvatisícšestsetpadesátkorunčeských.

Čl. IV.

Platební podmínky

4.1. Kupující zaplatí do 21 kalendářních dnů po obdržení daňového dokladu od prodávajícího kupní cenu za odebrané zboží, a to převodem na účet prodávajícího.

Čl. V.

Fakturace

5.1. Prodávající současně se zbožím předá kupujícímu dodací list, list, popř. daňový doklad.

5.2. V případě, že nebude daňový doklad předán se zbožím, je prodávající povinen ho zaslat na adresu kupujícího nejpozději do 5 dnů od data splnění dodávky.

5.2. Daňový doklad musí obsahovat především tyto údaje:

1. Číslo daňového dokladu a kupní smlouvy
2. Název a sídlo prodávajícího a kupujícího
3. Den vystavení a splatnosti daňového dokladu
4. Přesný název předmětu smlouvy a jeho množství
5. Strukturu platby
6. Datum dodání zboží
7. Číslo účtu, na který má být placeno.

5.3. Prodávající je povinen daňový doklad zaslat na níže uvedenou adresu kupujícího:

Krajské ředitelství policie Jihomoravského kraje
Oddělení materiálně-technického zabezpečení



Kounicova 24

611 32 Brno

nebo elektronicky na e-mail kupujícího  z e-mailu
prodávajícího 

5.4. Kupující je oprávněn před datem splatnosti vrátit daňový doklad, který neobsahuje požadované náležitosti, není doložen kopií potvrzeného dodacího listu, který obsahuje jiné cenové údaje nebo jiný druh plnění, než dohodnuté ve smlouvě s tím, že doba splatnosti nového (opraveného) daňového dokladu začíná znovu běžet ode dne jeho doručení kupujícímu.

5.5. Jestliže je prodávající dle zveřejnění správcem daně v registru plátců ke dni uskutečnění zdanitelného plnění nespolehlivým plátcem DPH, je kupující oprávněn provést zajišťovací úhradu DPH na účet příslušného finančního úřadu a uhradit prodávajícímu pouze základ daně, tento postup je považován za splnění závazku kupujícího.

Čl. VI.

Dodací podmínky, místo plnění

6.1. Za datum splnění dodávky se považuje den podpisu dodacího listu pověřeným pracovníkem kupujícího.

6.2. Prodávající je povinen dodat zboží řádně, v obvyklé kvalitě, jakosti, druhu a množství dle smlouvy a při dodržení obchodních podmínek sjednaných ve smlouvě.

6.3. Prodávající současně se zbožím předá kupujícímu dodací list, záruční list potvrzený prodávajícím, popř. daňový doklad.

6.4. **Doba plnění:** do 14. prosince 2018

6.5. **Místem plnění:** KŘP Jmk, Kounicova 24, 611 32 Brno

6.6. **Kontaktní osoby pro převzetí zboží:**



Čl. VII.

Záruční a servisní podmínky

7.1. Kupující je povinen při převzetí zboží provést ihned jeho fyzickou přejímku a neprodleně reklamovat případnou nekompletnost, či zjevné vady zboží. Vady zboží zjištěné až po převzetí zboží kupující reklamuje písemně u prodávajícího bez zbytečného odkladu po jejich zjištění.

7.2. Nároky z vad se vyřizují dle volby kupujícího v souladu s ust. § 2106 - § 2112 Občanského zákoníku. Záruku na předmět plnění poskytuje prodávající v **délce 26 měsíců**, která počíná běžet od převzetí zboží kupujícím.

7.3. Dostupnost servisu – do 48 hod. od nahlášení (objednání) opravy. V případě neschopnosti odstranit závadu do 48 hod. na místě, je kupující oprávněn požadovat odvoz přístroje a zapůjčení náhradního.

7.4. Prodávající garantuje, že poskytuje aplikační podporu pro řešení vzniklých problémů na straně kupujícího a současně v rámci této podpory navrhne optimalizaci pro laboratoř kupujícího.

7.5. Vzhledem k charakteru laboratoře budou velké servisní zásahy do přístrojů prováděny na místě mimo budovu KŘP Jmk, a to ve specializované servisní laboratoři výrobce či certifikovaného distributora – DYNEX TECHNOLOGIES, spol. s r.o., Lidická 977, 273 43 Buštěhrad.

Čl. VIII.

Přechod vlastnického práva

8.1. Vlastnické právo k předmětu smlouvy přechází na kupujícího předáním zboží způsobem uvedeným v Čl. VI. této smlouvy.

Čl. IX.

Sankce

Smluvní strany si ujednaly tyto sankce za nesplnění povinností:

- 9.1. V případě prodlení s dodáním zboží řádně a včas zaplatí prodávající smluvní pokutu ve výši 100 Kč a to za každý i započatý den prodlení.
- 9.2. V případě neuhrazení daňového dokladu (faktury) kupujícím v termínu uvedeném ve smlouvě má prodávající právo na úroky z prodlení ve výši 100 Kč z fakturované částky vč. DPH, a to za každý i započatý den prodlení.
- 9.3 Zaplacením smluvní pokuty není dotčen nárok kupujícího na náhradu škody v částce převyšující zaplacenou smluvní pokutu.
- 9.4. Smluvní pokuta a úrok z prodlení jsou platné do 30 dnů od data doručení písemné výzvy k jejich zaplacení oprávněnou osobou.

Čl. X.

Odpovědnost za škodu

- 10.1. Prodávající odpovídá za škodu způsobenou vadným plněním ze smlouvy v rozsahu stanoveném českým právním řádem.
- 10.2. Prodávající odpovídá vůči kupujícímu za plnění svých smluvních závazků pouze a výlučně v rozsahu uvedeném ve smlouvě.

Čl. XI.

Odstoupení od smlouvy a sankce

- 11.1. Prodávající a kupující jsou oprávněni odstoupit od smlouvy při podstatném porušení smlouvy, a pokud tento úmysl oznámí oprávněná strana druhé straně do 10 dnů od podstatného porušení povinností.
- 11.2. Podstatným porušením smlouvy se rozumí, jestliže strana porušující smlouvu věděla nebo mohla vědět, že druhá strana při takovém porušení nebude mít zájem na takovém plnění smlouvy.
- 11.3. Za podstatné porušení smlouvy se považuje:
- a) prodlení prodávajícího s dodáním zboží řádně a včas a kupující se přitom na tomto prodlení nijak nepodílel. Za prodlení prodávajícího s dodáním zboží se považuje opakované nedodání zboží ve stanoveném termínu,
 - b) kupující nesplní své finanční závazky vůči prodávajícímu a nebude schopen poskytnout takové záruky, že je splní v náhradní lhůtě,
 - c) prodávající může také odstoupit od smlouvy, jestliže kupující neposkytne nutné protiplnění a tím způsobí neschopnost provést určitý úkon. Odstoupení je však přípustné tehdy, když prodávající dohodl s kupujícím písemně novou přiměřenou lhůtu ke splnění závazku a ta uplynula,
 - d) nesplnění kvantitativních a kvalitativních požadavků kupujícího,
 - e) prodávající se stane nespolehlivým plátcem DPH dle zákona č. 235/2004 Sb., o dani z přidané hodnoty, ve znění pozdějších předpisů.

Čl. XII.

Závěrečná ustanovení

12.1. Tato smlouva nabývá platnosti dnem jejího podpisu smluvními stranami a účinnosti dnem uveřejnění v registru smluv.

12.2. Tato smlouva je vyhotovena ve dvou stejnopisech, z nichž jeden stejnopis obdrží prodávající a jeden stejnopis kupující.

12.3. Tuto smlouvu je možno měnit pouze formou písemných dodatků oboustranně potvrzených smluvními stranami, pokud v této smlouvě není stanoveno jinak.

12.4. K zániku smlouvy může dojít:

a) dohodou smluvních stran,

b) odstoupením jednou ze smluvních stran,

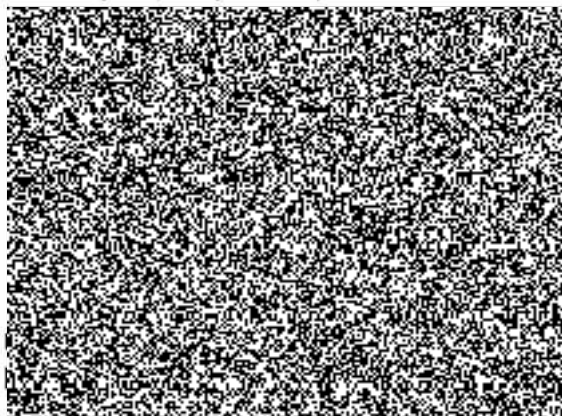
12.5. Každá ze smluvních stran prohlašuje, že tuto smlouvu uzavírá svobodně a vážně, že považuje obsah smlouvy za určitý a srozumitelný a že jsou jí známy veškeré skutečnosti, jež jsou pro uzavření smlouvy rozhodující.

12.6. Strany vyslovují souhlas se zveřejněním (případně jiným zpřístupněním) této smlouvy, jakož dalších skutečností souvisejících se smluvním vztahem založeným touto smlouvou, a to jak v režimu zák. č. 106/1999 Sb., o svobodném přístupu k informacím, tak případně podle jiných předpisů.

12.7. Tato smlouva podléhá uveřejnění dle zák. č. 340/2015 Sb., o zvláštních podmínkách účinnosti některých smluv, uveřejňování těchto smluv a o registru smluv (zákon o registru smluv). K uveřejnění v registru smluv zašle smlouvu kupující. Strany prohlašují, že smlouva neobsahuje žádné skutečnosti, které by nebylo možno poskytnout jako informace podle zák. č. 106/1999 Sb., případně jiných předpisů, zejména důvěrné údaje, utajované informace nebo obchodní tajemství, a v důsledku toho by se neuveřejňovaly podle zákona o registru smluv.

12.8. Pokud není v této smlouvě stanoveno jinak, řídí se právní vztahy z ní vyplývající právním řádem České republiky, zejména Občanským zákoníkem.

12.9. Tato kupní smlouva obsahuje 7 (slovy: sedm) stran textu a tři přílohy, které celkem obsahují 9 (slovy: devět) stran textu.



POLICIE ČESKÉ REPUBLIKY
KRAJSKÉ ŘEDITELSTVÍ POLICIE
JIHOMORAVSKÝHO KRAJE
611 02 BRNO, KOUNICOVA 24



V Praze dne 9.11.2018

X
ol. s r.o.
udem v Praze
hrad

Příloha č. 1 k č. j. KRPB-227759-3/ČJ-2018-0600VZ**Krycí list**

Název veřejné zakázky malého rozsahu: „Nákup Real Time PCR a pipetovacího robota“.

A. Identifikační údaje dodavatele:

právní osoba:

Obchodní firma nebo název: DYNEX TECHNOLOGIES, spol. s r.o.	
Sídlo: Vodičkova 791/41, 110 00 Praha 1	
Právní forma: spol. s ručením omezeným	
	
Bankovní spojení: UniCredit Bank, Praha	číslo účtu: 
Kontaktní osoba: 	tel: 
E-mail pro účely odeslání daňového dokladu (faktury) elektronicky: 	

B. Nabídková cena (nejvýše přípustná):

Předmět veřejné zakázky	Cena bez DPH	DPH v %	Cena včetně DPH
Real Time PCR – 1ks	673 150,- Kč	21 %	814 511,50 Kč
Pipetovací robot – 1ks	560 445,- Kč	21 %	678 138,50 Kč
Cena celkem	1 233 595,- Kč	21 %	1 492 650,- Kč

C. Délka záruční doby:

Požadovaná minimální délka záruční doby:	Dodavatelem nabídnutá délka záruční doby:
24 měsíců od dodání	26 měsíců od dodání

D. Servisní středisko/a dodavatele – adresa DYNEX TECHNOLOGIES, spol. s r.o.,
Lidická 977, 273 43 Buštěhrad

E. Dostupná aplikační podpora (doplň dodavatel) - ano ne

Prohlášení dodavatele:

Dodavatel prohlašuje, že předmět plnění dodá v souladu se všemi podmínkami, které jsou uvedeny v této výzvě, předmět plnění dodá dle specifikace a prohlášení s obchodními podmínkami pro návrh smlouvy.

27.10.2018

datum

razítko

jednatelka společnosti DYNEX TECHNOLOGIES, spol. s r.o.

TEC
Zapsaná v obchodním

Kontaktní osoba:

E-mail:

PRODUKTOVÝ LIST**Rotor-Gene Q**

Přístroj pro spolehlivou a vysoce přesnou kvantifikaci lidské, lidské – mužské DNA na principu Real-Time PCR. Termoregulace probíhá prostřednictvím vyhřívání vzduchu uvnitř, nebo vhánění chladného vzduchu do reakční komory. Konstrukce přístroje zajišťuje extrémně vysokou teplotní uniformitu a rychlost změny teploty v komoře. Přístroj umožňuje programovat vlastní protokoly a analýzy. Součástí dodávky je notebook s řídícím a vyhodnocovacím softwarem.

**QIAgility**

Jedná se o plně automatický pipetovací robot. Přístroj nabízí minimalizaci manuálních pipetovacích kroků a tím minimalizovat potenciální riziko lidské chyby, případně kontaminace. Přístroj umožňuje pipetovat do všech dostupných formátů, přičemž použité špičky jsou vyhazovány mimo pracovní prostor přístroje. Přístroj je dodáván s notebookem s nainstalovaným řídícím a programovacím softwarem. Přístroj je vybaven UV světlem pro dekontaminaci vnitřního prostředí.



Výrobce: QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Německo
<https://www.qiagen.com/cz/>

Validační Plán

Pro interní validaci kvantifikačního kitu
Investigator® Quantiplex® Pro RGQ



Odbor kriminalistické techniky a expertiz, Brno, CZ

Verze 1.0

10/2018

Sample to Insight



Obsah

Obsah	
Obecné informace.....	3
Účel.....	3
Předpoklady validačního plánu.....	3
Přehled Přístrojů.....	4
Přehled validačních studií.....	4
Sensitivita a Linearita.....	5
Limit detekce.....	5
Opakovatelnost a Reprodukovatelnost.....	6
Robustnost.....	6
Studie směsných vzorků.....	7
Kontaminační studie.....	8
Studie homogenity.....	8
Postup pro DNA kvantifikaci.....	9
Odkazy.....	14

Obsah

Obecné informace

Účel

Tento dokument obsahuje plán interních validačních studií, které jsou doporučeny pro validaci kvantifikačního kitu Investigator® Quantiplex® Pro RGQ¹ pro forenzní použití.

Studie uvedené v tomto dokumentu jsou navrženy tak, aby validovaly Investigator® Quantiplex® Pro RGQ Kit s ohledem na kvantifikaci srovnávacích vzorků a vzorků z míst trestných činů. Jednotlivé validační studie a počty vzorků splňují nebo překračují odborná doporučení týkající se vnitřní validace procesů ve forenzní DNA analýze. Validace bude provedena v souladu s požadavky či doporučeními:

- ENFSI²
- ISO/IEC 17025:2017³

Předpoklady validačního plánu

Studie navržené v tomto validačním plánu musí splňovat následující požadavky:

- Veškeré pipety a měřidla použité ve validačních studiích musí být zkalibrovány a bez závad.
- Veškeré přístroje použité ve validačních studiích musí být zkalibrovány a bez závad. Systém RotorGene Q 5plex HRM Real Time PCR⁴ a QIAgility⁵ budou kalibrovány před započatím validace.
- Veškerý spotřební materiál použitý k validacím nesmí být proexpirován.

Přehled přístrojů

Vzorky musí být během validací zpracovávány a analyzovány v souladu s příslušným manuálem QIAGEN Investigator® Quantiplex® Pro RGQ nebo v případě potřeby budou zpracovány či analyzovány validovanými postupy laboratoře. Během validací bude použit následující workflow:

- Kvantifikační set-up - QIAgility
- Kvantifikace - RotorGene Q 5plex HRM + Investigator® Quantiplex® Pro RGQ Kit
- Amplifikace - ABI ProFlex Thermal Cycler⁶ + amplifikační kit
- Kapilární elektroforéza - 3500 Genetic Analyzer⁷

Přehled validačních studií

Tabulka 1 uvádí přehled studií, jejich popis, typ a počet vzorků, které budou zpracovány během validace kvantifikačního kitu Quantiplex Pro RGQ.

Table 1 - Validační studie

Studie	Popis vzorků ve studii	Typ vzorků
Senzitivita a linearita	Mužská DNA, 7 ředících kroků; triplikáty (Celkově 31 vzorků, NTC a standardy jsou zahrnuty)	Mužská DNA z dodaného evaluačního kitu
Limit Detekce	Kontrolní DNA, 5 ředících kroků v poměru 1:5, triplikáty; (Celkově 15 vzorků)	Kontrolní DNA z amplifikačního kitu
Kontaminační studie	Vzorky a NTC na 72-RGQ ringu ve vzoru, ve kterém se střídají pozice těchto vzorků (Celkově 15 vzorků)	Kontrolní DNA z amplifikačního kitu
Opakovatelnost a Reprodukovatelnost	Vzorky ze studie senzitivity zpracované 2x operátorem č. 1 a jednou operátorem č. 2 (Celkově 50 vzorků, NTC a standardy jsou zahrnuty)	Mužská DNA z dodaného evaluačního kitu
Robustnost (Tolerance k inhibitorům)	Izolovaná DNA smíchaná s inhibitory (kys. huminová, hydrogenfosforečnan vápenatý). Degradovaná mužská DNA, duplikáty (Celkově 12 vzorků)	Inhibitory a degradovaná DNA z dodaného evaluačního kitu
Studie směsných vzorků	Směs mužské a ženské DNA v různých poměrech až do poměru 1:2 500 000; triplikáty (Celkově 18 vzorků)	Směs mužské a ženské DNA z dodaného evaluačního kitu
Test homogenity	Data ze vzorků z kontaminační studie	Kontrolní DNA z amplifikačního kitu

Standardní křivky budou sledovány v každém runu, R2, sklon a y-intercept parametry budou stanoveny a posouzeny pro každou standardní křivku.

Validační studie

Následující část popisuje validační studie a jednotlivé parametry, které budou sledovány a analyzovány během validace:

Sensitivita a Linearita

Tato studie posuzuje rozsah koncentrací vzorků schopných produkovat spolehlivé výsledky koncentrace vstupní DNA. Linearita sleduje korelaci Ct hodnot a naměřených výsledků koncentrace DNA.

Vstupním materiálem do této studie bude mužská DNA o známé koncentraci (100 ng/μl) z dodaného evaluačního kitu, která bude naředěna do 7 vzorků, ředění v poměru 1:5 a vzorky budou vyhodnoceny v triplikátu.

Posuzovaná kritéria:

- Linearita musí být prokázána korelací Ct hodnot a naměřenou koncentrací DNA
- Bude zjištěna nejnižší opakovaně naměřená koncentrace DNA vzorků z ředící řady.
- Bude definována směrodatná odchylka naměřených hodnot

Limit detekce

Tato studie definuje mez detekce pro validovaný workflow. Tato studie definuje korelaci mezi výsledky kvantifikace a DNA profilem danou odlišnou citlivostí mezi kvantifikačním a amplifikačním kitem. Při DNA analýze LT-DNA dochází k ovlivnění výsledného DNA profilu stochastickými efekty. V takových případech budou alikvoty stejného vzorku obsahovat různé kopie/fragменты cílové molekuly DNA. Stochastické efekty mohou vést k dropoutu alely/lokusu nebo diferenciální amplifikaci heterozygotních alel, která ovlivní poměr výšky píků (PHR).

Vstupním materiálem do této studie bude 5 vzorků ředící série kontrolní DNA z amplifikačního kitu, která bude naředěna do 5ti vzorků, ředění v poměru 1:5 a vzorky budou vyhodnoceny v triplikátu.

Posuzovaná kritéria:

- Výsledky této studie definují kvantitativní rozsah vstupního množství DNA, ze kterých budou stanoveny úplné DNA profily.
- Limit detekce bude definován jako kvantita DNA, pod kterou se v testovaných vzorcích objeví dropouty alel nebo lokusů nebo alely jsou pod validovaným analyzačním prahem.
- Pro každou ředící řadu bude definován PHR a bude stanovena koncentrace, kde PHR v heterozygotním lokusu je ještě v toleranci 70% výšky menšího píku k většímu.

Opakovatelnost a Reprodukovatelnost

Studie opakovatelnosti posoudí odchylky v měření, pokud jedna osoba zpracovává stejný vzorek pomocí stejného postupu na stejném přístroji. Reprodukovatelnost vyhodnotí odchylky v měření, když dva nebo více lidí zpracuje stejný vzorek pomocí stejného postupu na stejném přístroji.

Vzorky budou analyzovány v různých dnech a různými operátory. Během studie bude zpracován jeden soubor nejméně 5ti vzorků pocházejících ze stejného zdroje nejméně třikrát. Dvě dávky zpracuje operátor 1 (testování opakovatelnosti metody) a jednu dávku operátor 2 druhý den (testování reprodukovatelnosti metody). Výsledná naměřená kvantita všech vzorků bude podrobena analýze za účelem stanovení očekávatelné směrodatné odchylky v měření při opakování a při reprodukci.

Vstupním materiálem do této studie bude 5 replikátů jednoho vzorku ředící řady kontrolní DNA z amplifikačního kitu a vzorky budou vyhodnoceny v triplikátech.

Posuzovaná kritéria:

- Bude definována směrodatná odchylka naměřených hodnot, kterou lze očekávat při opakování a reprodukci dat.

Robustnost

Tato studie posuzuje robustnost chemie Quantiplex® Pro RGQ v odolnosti vůči možným inhibitorům přítomným ve vzorcích vyizolované DNA a jeho schopnost spolehlivě kvantifikovat množství i degradované vstupní DNA.

Vstupním materiálem do této studie bude uměle degradovaná DNA a mužská DNA o známé koncentraci z dodaného evaluačního kitu, která bude smíchána s níže uvedenými inhibitory v daných koncentracích. Vzorky budou vyhodnoceny v triplikátu.

Inhibitor 1 (Kyselina huminová 500 ng/μl)

Inhibitor 2 (Kyselina huminová 660 ng/μl)

Inhibitor 3 (Kyselina huminová 800 ng/μl)

Inhibitor 4 (Hydrogenfosforečnan vápenatý 70 mM)

DNA 1 (Mužská DNA 300 bp degradovaná)

DNA 2 (Mužská DNA 150 bp degradovaná)

Posuzovaná kritéria:

- Výsledky této studie budou použity k vyhodnocení rezistence kvantifikačního kitu vůči inhibitorům a také ke schopnosti kitu detekovat úroveň degradace vzorku.
- V analyzovaných vzorcích musí být detekována koncentrace lidské DNA (Human target).
- V analyzovaných vzorcích musí být detekován rozdíl mezi naměřenými koncentracemi v Human a Degradation fragmentech.

Studie směsných vzorků

Tento test vyhodnotí schopnost kvantifikačního kitu Quantiplex® Pro RGQ detekovat mužskou DNA ve směsi s převažující frakcí ženské DNA, což je běžná situace u vzorků spojených se sexuálními trestnou činností. Vzorky směsí mužské a ženské DNA budou kvantifikovány a pro validaci výsledků z této studie bude sledován Male target, který je specifický pro mužskou DNA.

Vstupním materiálem do této studie budou směsné vzorky mužské a ženské DNA o známém poměru z dodaného evaluačního kitu. Vzorky budou vyhodnoceny v triplikátech. Poměr mužské ku ženské frakci v jednotlivých vzorcích je uveden níže:

Mix 1 (Směs 1:10 000) Směs 2.5 pg/μl Mužské DNA + 100 pg/μl Ženské DNA

Mix 2 (Směs 1:200 000) Směs 0.5 pg/μl Mužské DNA + 100 ng/μl Ženské DNA

Mix 3 (Směs 1:400 000) Směs 0.5 pg/μl Mužské DNA + 200 ng/μl Ženské DNA

Mix 4 (Směs 1:1 000 000) Směs 0.25 pg/μl Mužské DNA + 250 ng/μl Ženské DNA

Mix 5 (Směs 1:2 000 000) Směs 0.1 pg/μl Mužské DNA + 200 ng/μl Ženské DNA

Mix 6 (Směs 1:2 500 000) Směs 0.1 pg/μl Mužské DNA + 250 ng/μl Ženské DNA

Posuzovaná kritéria:

Výsledky této studie budou použity k vyhodnocení schopnosti Quantiplex Pro RGQ kitu detekovat mužskou DNA ve směsi s převažující frakcí ženské DNA. Bude určen poměr, ve kterém byla opakovaně detekována mužská DNA v Male targetu.

are
imí
Právo

s r.o.

Kontaminační studie

Kontaminační studie posuzuje čistotu workflow se zaměřením na detekci a vyhodnocení možné kontaminace, která by ohrozila integritu výsledků. Vzorky mužské DNA o známé koncentraci a NTC budou zpracovány v 72-pozicovém RGQ ringu ve vzoru, kde se za sebou střídají pozice s DNA a NTC. Pokud bude detekována DNA v NTC pozici v koncentraci nad definovaným limitem detekce workflow, tyto vzorky budou amplifikovány, pro detekci možného zdroje kontaminace.

Vstupním materiálem do této studie bude kontrolní DNA z amplifikačního kitu.

Posuzovaná kritéria:

- NTC pozice budou analyzovány na možnou přítomnost kontaminace nad úrovní limitu detekce workflow.

Studie homogenity

Studie homogenity hodnotí variabilitu a odchylku měření v 72-pozicovém RGQ ringu. Stanovené hodnoty u vzorků o známé koncentraci DNA z kontaminační studie jsou analyzovány a je u nich definována střední hodnota a směrodatná odchylka.

Vstupním materiálem do této studie budou naměřené koncentrace DNA z kontaminační studie.

Posuzovaná kritéria:

- Homogenita měření bude dána směrodatnou odchylkou naměřených hodnot.

Postup pro DNA kvantifikaci

Metoda uvedená na následujících stránkách popisuje protokol pro kvantifikaci DNA pomocí kvantifikačního kitu Investigator® Quantiplex® Pro RGQ, jehož použití ve forenzní akreditované laboratoři je tímto plánem validováno.

Pro namíchání reakční směsi, přípravu standardní řady a rozplnění vzorků do 72 RGQ ringu bude použit pipetovací automat QIAgility. Pro detekci a měření bude použit přístroj RotorGene Q 5plex HRM Real Time PCR. Pro analýzu dat se použije software QIAGEN Q-Rex, který je dodáván společně s přístrojem

Postup

1. Před použitím důkladně promíchejte jednotlivé reagenty, aby se zabránilo lokalizovaným koncentracím.
2. QIAgility připraví ředící řadu standardů, viz. tabulka níže

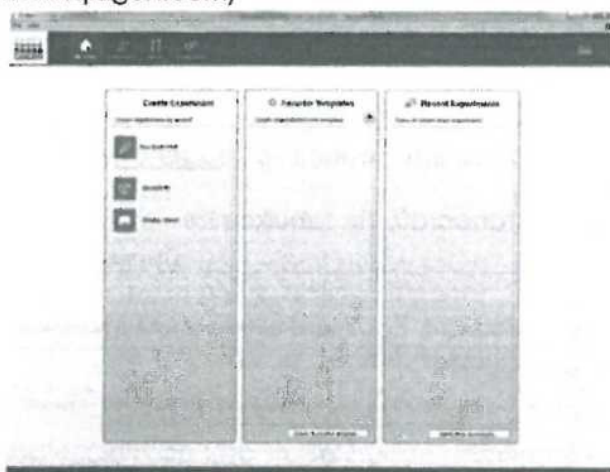
Serial dilution of Control DNA (ng/μl)	Control DNA (μl)	Quantitect Nucleic Acid Dilution Buffer (μl)
50	Undiluted DNA	–
1.8519	5	130
0.0686	5	130
0.0025	5	130

3. Rozmrazte nebo vyjměte z lednice vzorky určené ke kvantifikaci. Všechny vzorky před použitím důkladně promíchejte, aby se zabránilo lokalizovaným koncentracím.
4. QIAgility připraví reakční mix, viz. tabulka níže. Reakční mix obsahuje všechny komponenty potřebné pro PCR kromě templátové DNA (vzorku) a RNase-free vody. Míchání reakčního mixu se obvykle provádí při pokojové teplotě (15-25 °C). Nicméně je doporučeno nechat reagenty, vzorky a M1 standardy v chladicím stojánu.

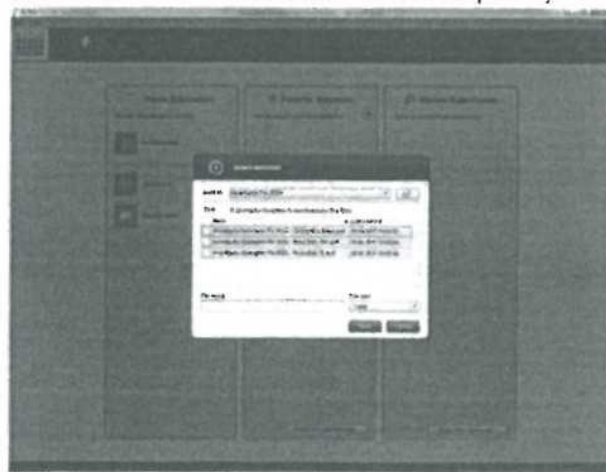
Tabulka 7. Master mix for DNA quantification

Component	Volume per 20 μl reaction	Final concentration
Quantiplex Pro Reaction Mix	9 μl	1x
Quantiplex Pro Primer Mix	9 μl	1x
Total volume of master mix	18 μl	–

5. QIAgility rozplní 18 µl reakčního mixu a 2 µl standardů a vzorků do příslušných pozic v 72 RGQ ringu.
6. Umístěte uzavřený 72 RGQ ring do příslušného rotoru v Rotor-Gene Q Splex a připevněte zajišťovací kroužek.
Pokud používáte mikrozkušavky ve stripech, nepoužitá místa v rotoru by měla být naplněna prázdnými stripovými mikrozkušavkami.
7. Otevřete software Q-Rex 1.0 a přihlaste se jako uživatel nebo jako správce (další podrobnosti o tom, jak provést první přihlášení v Q-Rex softwaru, o uživatelských rolích nebo o tom, jak přidat nové uživatele, viz Q-Rex Software User Manual, který byl dodán spolu s přístrojem nebo je k dispozici na adrese www.qiagen.com)

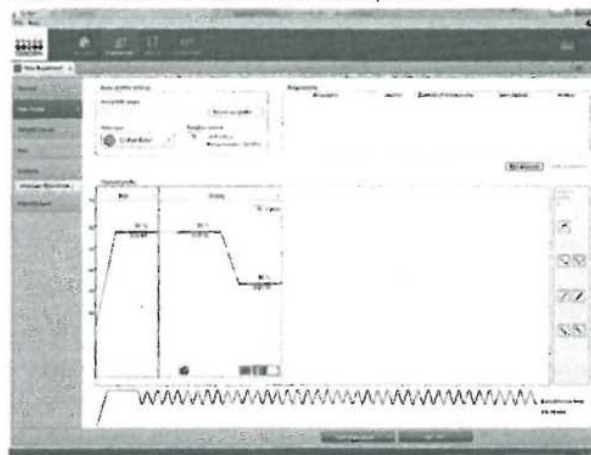


8. Zvolte možnost Create from other template).



9. Vyhledejte uložené soubory šablon Quantiplex Pro RGQ pro manuální nastavení a vyberte správný soubor šablon Quantiplex Pro RGQ pro 0,1 ml stripey, Rotor-Disc 72 nebo Rotor-Disc 100.

10. Klikněte na levé straně na "Run profile"



Do pole Poznámky můžete přidat všechny další potřebné informace (např. Číslo šarže kitu, expiraci atd.), které se mají zadat pro běh.

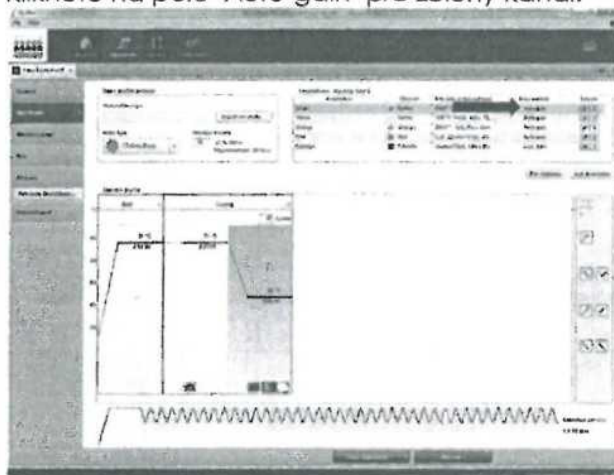
11. Potvrďte typ Rotoru, objem reakční směsi a zkontrolujte teplotní PCR profil. Klikněte na teplotní PCR profil (je již přednastavený v templátu, pro kontrolu je uvedený níže) do oblasti nad barevným symbolem fotoaparátu. Zobrazí se nastavení, ve které části PCR, jsou měřena data.

Step	Time	Temperature	Number of cycles	Comment
Initial activation step	3 min	95°C	—	PCR requires an initial incubation at 95°C to activate the DNA polymerase.
Two-step cycling:			40	
Denaturation	5 s	95°C		
Combined annealing/extension	10 s	60°C		Perform fluorescence data collection using the green, yellow, orange, red and crimson channels with auto-gain optimization, specified in table 6.

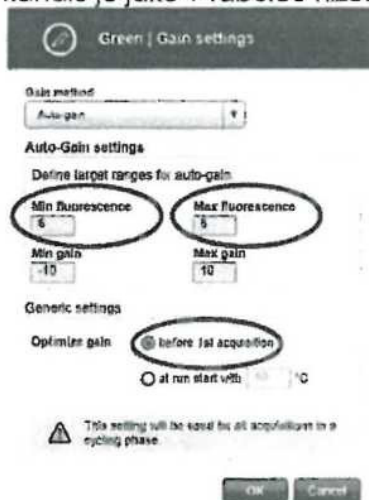
kteří
inim
by
Prati
ed

pl. s r.o.

12. Klikněte na pole "Auto-gain" pro zelený kanál.



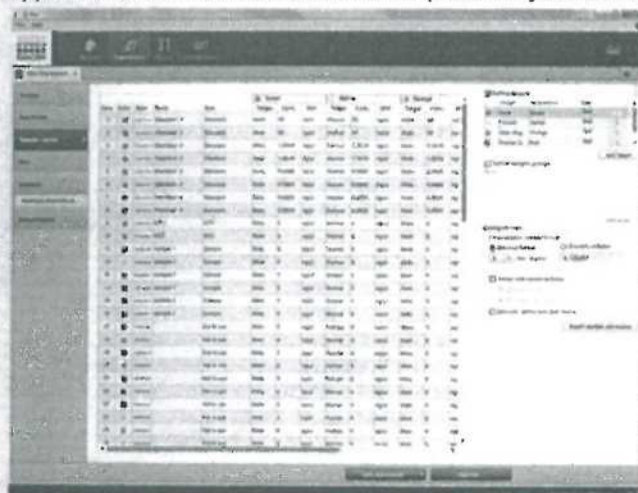
13. Potvrďte, že je vybrán "Auto-gain" (viz obrázek výše) a nastavení zeleného kanálu je jako v tabulce níže.



14. Zkontrolujte přednastavení templátu dle tabulky níže. "Optimize Gain zisk" by měl být vybrané Before 1st acquisition pro všechny barevné kanály.

Channel	Min. fluorescence	Max. fluorescence	Optimize gain
Green	6	8	Before 1st acquisition
Yellow	6	8	Before 1st acquisition
Orange	2	4	Before 1st acquisition
Red	6	8	Before 1st acquisition
Crimson	5	7	Before 1st acquisition

15. Klikněte na levé straně na "Sample Layout". Potvrďte nebo vyplňte označení a typ příslušných vzorků. Typ vzorku lze nastavit / změnit kliknutím na pole vpravo "Type". Pozice vzorků, které se nepoužívají, musí být označeny jako "Not in use".



16. Spusťte Rotor-Gene kliknutím na tlačítko "Start run".
 17. Vyhodnocení dat proveďte podle dodaného manuálu ke kvantifikačního kitu Investigator® Quantiplex® Pro RGQ.

Odkazy

1. Investigator® Quantiplex® Pro RGQ Handbook 02/2018 (QIAGEN)
2. ENFSI Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process (Issue 001, November 2010)
3. ISO/IEC 17025:2017 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
4. Rotor-Gene Q User Manual 02/2012 (QIAGEN)
5. QIAgility Handbook 06/2013 (QIAGEN)
6. Applied Biosystems ProFlex® PCR System User Guide 06/2016 (APPLIED BIOSYSTEMS)
7. Applied Biosystems 3500/3500XL Genetic Analyzer User Guide 06/2010 (APPLIED BIOSYSTEMS)

