

# Příručka pro sadu *artus*<sup>®</sup> Parvo B19 RG PCR Kit



24 (katalogové č. 4504263)

In vitro diagnostika pro kvantitativní stanovení

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

Červen 2018 – 1. verze



4504263, 4504265



1112933 CS



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO

R4

MAT

1112933 CS



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN je vedoucím poskytovatelem inovativních technologií přípravy vzorků a analýz, které umožňují izolaci a detekci obsahu jakéhokoliv biologického vzorku. Naše pokročilé, vysoce kvalitní produkty a služby Vám zajistí spolehlivý výsledek.

### **QIAGEN určuje standardy:**

- v purifikaci DNA, RNA a proteinů
- v analýzách nukleových kyselin a proteinů
- ve výzkumu microRNA a RNAi
- v automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich analýz.

Naší misí je umožnit Vám dosáhnout vynikajících výsledků a technických úspěchů. Více informací naleznete na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Obsah

<b>1. Obsah .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Skladování .....</b>	<b>5</b>
<b>3. Další potřebné vybavení .....</b>	<b>6</b>
<b>4. Všeobecná bezpečnostní opatření .....</b>	<b>6</b>
<b>5. Účel použití .....</b>	<b>6</b>
<b>6. Informace o původcích .....</b>	<b>7</b>
<b>7. Princip PCR s hodnocením v reálném čase .....</b>	<b>7</b>
<b>8. Popis produktu .....</b>	<b>7</b>
<b>9. Protokol .....</b>	<b>8</b>
9.1 Izolace DNA .....	8
9.2 Interní kontrola .....	10
9.3 Kvantifikace .....	11
9.4 Příprava PCR .....	12
9.5 Programování <i>přístroje Rotor-Gene Q</i> .....	16
<b>10. Vyhodnocení .....</b>	<b>20</b>
<b>11. Řešení problémů .....</b>	<b>22</b>
<b>12. Specifikace .....</b>	<b>24</b>
12.1 Analytická senzitivita .....	24
12.2 Specificita .....	25
12.3 Přesnost .....	26
12.4 Robustnost .....	28
12.5 Reprodukovatelnost .....	28
<b>13. Zvláštní pokyny pro použití produktu .....</b>	<b>28</b>
<b>14. Varování a bezpečnostní opatření .....</b>	<b>29</b>

<b>15. Řízení jakosti .....</b>	<b>29</b>
<b>16. Literatura .....</b>	<b>29</b>
<b>17. Vysvětlení symbolů .....</b>	<b>30</b>

## artus Parvo B19 RG PCR Kit

K použití s přístrojem Rotor-Gene Q.

### 1. Obsah

	Označení a obsah	Kat. č. 4504263 24 reakcí
<b>Modrá</b>	<i>Parvo B19 RG/TM Master</i>	2 x 12 rxns
<b>Červená</b>	<i>Parvo B19 RG/TM QS 1<sup>a</sup> 1 x 10<sup>5</sup> IU/μl</i>	1 x 200 μl
<b>Červená</b>	<i>Parvo B19 RG/TM QS 2<sup>a</sup> 1 x 10<sup>4</sup> IU/μl</i>	1 x 200 μl
<b>Červená</b>	<i>Parvo B19 RG/TM QS 3<sup>a</sup> 1 x 10<sup>3</sup> IU/μl</i>	1 x 200 μl
<b>Červená</b>	<i>Parvo B19 RG/TM QS 4<sup>a</sup> 1 x 10<sup>2</sup> IU/μl</i>	1 x 200 μl
<b>Červená</b>	<i>Parvo B19 RG/TM QS 5<sup>a</sup> 1 x 10<sup>1</sup> IU/μl</i>	1 x 200 μl
<b>Zelená</b>	<i>Parvo B19 RG/TM IC<sup>a</sup></i>	1 x 1000 μl
<b>Bílá</b>	<i>Voda (v kvalitě vhodné pro PCR)</i>	1 x 1000 μl

QS = Quantitation Standard (*Kvantifikační standard*)

IC = Internal Control (*Interní kontrola*)

### 2. Skladování

Komponenty přístroje *artus Parvo B19 RG PCR Kit* se skladují při teplotě  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  a jsou stabilní do data použitelnosti uvedeného na štítku. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení ( $> 2$  x), snižuje se tím senzitivita. Při nepravidelném používání by proto měly být reagenty alikvotovány. V případě, že je nutné komponenty skladovat při teplotě  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , skladujte je takto maximálně po dobu pěti hodin.

### 3. Další potřebné vybavení

- Laboratorní rukavice bez pudru
- Sada k izolaci DNA (viz **část 9.1 Izolace DNA**)
- Pipety (nastavitelné)
- Sterilní pipetovací špičky s filtrem
- Vířivý mixér (Vortex)
- Stolní centrifuga s rotorem pro 2 ml zkumavky
- *Přístroj Rotor-Gene Q* se softwarem verze 2.3 nebo vyšší
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, použití s rotorem o 72 jamkách (kat. č. 981103 nebo 981106)
- Chladicí blok (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, kat. č. 9018901)

### 4. Všeobecná bezpečnostní opatření

Uživatel by měl dbát na následující:

- Používejte sterilní pipetovací špičky s filtrem.
- Pozitivní materiál (vzorky, kontroly a amplifikáty) skladujte, izolujte a vkládejte do reakční směsi odděleně od všech ostatních reagentů.
- Všechny komponenty před počátkem testu úplně rozmrazte při pokojové teplotě.
- Následně komponenty řádně promíchejte a krátce centrifugujte.
- Pracujte rychle na ledu nebo v chladicím bloku (72jamkový plnicí blok).

### 5. Účel použití

Sada artus Parvo B19 RG PCR Kit je in vitro test amplifikace nukleových kyselin k detekci a kvantifikaci DNA parvoviru B19 v lidském séru nebo plazmě EDTA. Sada využívá polymerázovou řetězovou reakci (polymerase chain reaction, PCR) v reálném čase a je konfigurována k použití se sadou QIAamp UltraSens Virus Kit, minisadou QIAamp DNA Mini Kit a přístrojem Rotor-Gene Q.

Sada není určena k použití jako screeningový test krve / krevního produktu k detekci infekce parvovirem B19. Sada artus Parvo B19 RG PCR Kit je určena k in vitro diagnostickému použití zdravotnickými pracovníky.

## 6. Informace o původcích

Většina infekcí způsobených parvovirem B19 má bezpříznakový klinický průběh. Příznaky akutní infekce vyvolané parvovirem B19 jsou podobné chřipkovému onemocnění. Mohou také připomínat příznaky rubeoly (zarděnek) a zejména u dospělých symptomy revmatismu. U pacientů s hemolytickou anémií může být parvovirus B19 hlavní příčinou aplastické krize. Někdy byly zaznamenány vážné komplikace plodu, zejména po nákaze matky v druhém a třetím trimestru.

## 7. Princip PCR s hodnocením v reálném čase

Při diagnostikování pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se amplifikují specifické oblasti genomu původce. Detekce amplifikátu probíhá při PCR v reálném čase pomocí fluorescenčních barviv. Barviva jsou zpravidla vázaná na oligonukleotidové sondy, které se specificky vážou na PCR amplifikát. Detekce intenzity fluorescence v průběhu PCR v reálném čase umožňuje průkaz a kvantifikaci kumulujícího se produktu, aniž by bylo nutné po PCR znovu otevírat reakční zkumavky (Mackay, 2004).

## 8. Popis produktu

Sada *artus* Parvo B19 RG PCR Kit je systém k přímému použití určený k detekci DNA parvoviru B19 pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v *přístroji Rotor-Gene Q. Parvo B19 RG/TM Master* obsahuje reagentie a enzymy pro specifickou amplifikaci úseku 76 bp genomu parvoviru B19 a pro přímou detekci specifického amplikonu ve fluorescenčním kanálu Cycling A.Green (Cyklování A. Zelená) *přístroje Rotor-Gene Q*. Kromě toho sada *artus* Parvo B19 RG PCR Kit obsahuje druhý heterologní amplifikační systém pro průkaz potenciální inhibice PCR. Tento systém je detekován jako

*Interní kontrola (IC)* ve fluorescenčním kanálu Cycling A.Yellow (Cyklování A, Žlutá). Limit detekce analytické PCR parvoviru B19 (viz **část 12.1 Analytická senzitivita**) přitom není omezen. Spolu s produktem se dodávají externí pozitivní kontroly (*Parvo B19 RG/TM QS 1–5*), pomocí nichž lze zjistit množství patogenu ve vzorku. Prostudujte si **část 9.3 Kvantifikace**.

## 9. Protokol

### 9.1 Izolace DNA

DNA-izolační soupravy nabízejí různí výrobci. Množství vzorku k izolaci DNA závisí na použitém protokolu. Provedte izolaci DNA podle návodu výrobce. Doporučujeme následující izolační sady:

Vzorek	Izolační souprava	Katalogové číslo	Výrobce	Nosič RNA
Sérum, plazma	QIAamp® UltraSens® Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	obsažen
	QIAamp DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	neobsažena

- Užití **nosiče RNA** má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím pro výtěžek DNA/RNA. Pokud zvolená izolační sada nosičovou RNA neobsahuje, při izolaci nukleových kyselin z nebuněčných tělesných tekutin a materiálů s nízkým obsahem DNA/RNA (např. mozkomíšní mok) důrazně doporučujeme přidat nosič (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, kat. č. 27-4110-01). V takovém případě postupujte následovně:
  - Resuspendujte lyofilizovanou nosičovou RNA v elučním pufru (nepoužívejte lyzační pufr) izolační sady (např. pufr AE minisady QIAamp DNA Mini Kit) a ředěním vytvořte roztok o koncentraci 1 µg/µl. Tento roztok nosičové RNA rozdělte na alikvoty podle potřeby a skladujte je při teplotě –15 °C až –30 °C. Alikvot nosičové RNA opakovaně nerozmrazujte (> 2x).



- b) Na 100 µl lyzačního pufru použijte 1 µg nosičové RNA. Stanovuje-li například izolační protokol 200 µl lyzačního pufru, vložte 2 µl nosičové RNA (1 µg/µl) přímo do lyzačního pufru. Před začátkem každé izolace musí být připravena čerstvá směs lyzačního pufru a nosičové RNA (popř. i *Interní kontroly*, viz **část 9.2 Interní kontrola**) podle následujícího pipetovacího schématu:

Počet vzorků	1	12
Lyzační pufr	např. 200 µl	např. 2400 µl
Nosičová RNA (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>202 µl</b>	<b>2424 µl</b>
<b>Objem na izolaci</b>	<b>200 µl</b>	<b>po 200 µl</b>

- c) Čerstvě připravenou směs lyzačního pufru a nosičové RNA použijte ihned k izolaci. Skladování směsi není možné.
- Užití **nosiče RNA** má rozhodující význam pro efektivitu izolace a tím pro výtěžek DNA/RNA. Aby bylo dosaženo vyšší stability nosičové RNA dodávané spolu se sadou QIAamp UltraSens Virus Kit, doporučujeme následující postup, který se liší od údajů v uživatelské příručce pro izolační sadu:
    - a. Před prvním použitím izolační sady resuspendujte lyofilizovanou nosičovou RNA v 310 µl elučního pufru dodávaného se sadou (konečná koncentrace 1 µg/µl, nepoužívejte lyzační pufr). Tento roztok nosičové RNA rozdělte na alikvoty podle potřeby a skladujte je při teplotě  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Alikvot nosičové RNA opakovaně nerozmrazujte (> 2x).
    - b. Před začátkem každé izolace musí být připravena čerstvá směs lyzačního pufru a nosičové RNA (příp. i *Interní kontroly*, viz **část 9.2 Interní kontrola**) podle následujícího pipetovacího schématu:

Počet vzorků	1	12
Lyzační pufr AC	800 µl	9600 µl
Nosičová RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>805,6 µl</b>	<b>9667,2 µl</b>
<b>Objem na izolaci</b>	<b>800 µl</b>	<b>po 800 µl</b>

- c. Čerstvě připravenou směs lyzačního pufru a nosičové RNA použijte ihned k izolaci. Skladování směsi není možné.
- Aby bylo dosaženo maximální senzitivity sady *artus* Parvo B19 RG PCR Kit, doporučujeme eluovat DNA v 50 µl elučního pufru.
  - Sada **QIAamp UltraSens Virus Kit** umožňuje koncentrování vzorku. Pokud jako materiál vzorku nepoužíváte sérum ani plazmu, přidejte k vzorku alespoň 50 % (v/v) negativní lidské plazmy.
  - Izolace obsahuje promývací pufr s obsahem **etanolu**. Bezpodmínečně se ujistěte, aby byl před elucí proveden ještě jeden centrifugační krok (tři minuty, 13 000 ot/min) a tím se odstranily zbytky etanolu. Předejdete tak možným inhibicím PCR.
  - Sada *artus* Parvo B19 RG PCR Kit není vhodná pro izolační metody na základě **fenolu**.

**Důležité:** *Interní kontrolu* sady *artus* Parvo B19 RG PCR Kit lze použít přímo během procesu izolace (viz **část 9.2 Interní kontrola**).

## 9.2 Interní kontrola

Spolu s produktem se dodává *Interní kontrola (Parvo B19 RG/TM IC)*. Uživatel má tak možnost **kontrolovat jak izolaci DNA, tak případnou inhibici PCR** (viz Obr. 1). Pro tuto aplikaci přidejte k izolaci *Interní kontrolu* v poměru 0,1 µl na 1 µl elučního objemu. Používáte-li například sadu QIAamp UltraSens Virus Kit a DNA eluujete v 50 µl pufru AVE, měli byste na začátku přidat 5 µl *Interní kontroly*. Množství vkládané *Interní kontroly* závisí **pouze** na elučním objemu. *Interní kontrola* a nosičová RNA (viz **část 9.1 Izolace DNA**) by se měly přidávat pouze

- směsi lyzačního pufru a vzorku nebo
- přímo k lyzačnímu pufru.

*Interní kontrola* nesmí být přidána přímo ke vzorku. Při přidání k lyzačnímu pufru se musí dbát na to, aby byla směs *Interní kontroly*, lyzačního pufru a nosiče RNA čerstvě připravena a ihned použita (skladování směsi při pokojové teplotě nebo v lednici může již po několika hodinách vést k vynechání *Interní kontroly* a ke snížení efektivity izolace). *Interní kontrolu* a nosič RNA **nepipetujte** přímo do vzorku.

Volitelně lze *Interní kontrolu* použít **výhradně ke kontrole možné inhibice PCR** (viz Obr. 2). V tomto případě přidejte 2 µl *Interní kontroly* na jednu testovací směs přímo do 30 µl směsi *Parvo B19 RG/TM Master*. Pro každou PCR reakci použijte 30 µl takto vytvořeného Master Mixu\* a přidejte následně 20 µl izolátu. Jestliže připravujete jeden běh PCR pro více vzorků, zvyšte potřebná množství směsi *Parvo B19 RG/TM Master* a *Interní kontroly* podle počtu vzorků (viz **část 9.4 Příprava PCR**).

### 9.3 Kvantifikace

S *Kvantifikačními standardy* (*Parvo B19 RG/TM QS 1–5*) dodávanými spolu s produktem se zachází stejně jako s již izolovanými vzorky a přidávají se ve stejném objemu (20 µl). Chcete-li vytvořit v *přístroji Rotor-Gene Q* standardní křivku, použijte všech pět *Kvantifikačních standardů* a definujte je v okně menu *Edit Samples* (Upravit vzorky) jako standardy včetně odpovídajících koncentrací (viz uživatelskou příručku k přístroji *Rotor-Gene Q*). Takto vytvořenou standardní křivku lze použít také pro následné reakce, pokud je během aktuálního běhu uplatněn alespoň jeden standard s **jednou** definovanou koncentrací. K tomu je nutné dříve vytvořenou standardní křivku importovat (viz *uživatelskou příručku k přístroji Rotor-Gene Q*). Tato kvantifikační metoda však může vést k odchylkám ve výsledcích z důvodu variability u různých běhů PCR.

---

\*Zvýšení objemu podmíněné přidáním *Interní kontroly* je při přípravě PCR reakce opominuto. Senzitivita detekčního systému není omezena.

**Upozornění:** *Kvantifikační standardy* jsou definovány jako IU/μl. Pro přepočet hodnot získaných pomocí standardní křivky na IU/ml vzorku se používá následující vzorec:

$$\text{Výsledek ve vzorku (IU/ml)} = \frac{\text{Výsledek v eluátu (IU/}\mu\text{l)} \times \text{eluční objem (}\mu\text{l)}}{\text{Objem vzorku (ml)}}$$

Prosím povšimněte si, že se do výše uvedeného vzorce dosazuje zásadně původní objem vzorku. Toto se musí zohlednit, byl-li objem vzorku před izolací nukleových kyselin pozměněn (např. redukce objemu centrifugací nebo jeho zvýšení naplněním na objem požadovaný pro izolaci).

## 9.4 Příprava PCR

Ověřte, že je chladicí blok (příslušenství *přístroje Rotor-Gene Q*) předem vychlazen na +4 °C. Do chladicího bloku umístěte požadovaný počet zkumavek pro PCR. Dbejte na to, aby byl do každého běhu PCR zahrnut alespoň jeden *Kvantifikační standard* a jedna negativní kontrola (voda v kvalitě vhodné pro PCR (*Water, PCR grade*)). Chcete-li vytvořit standardní křivku, použijte u každého běhu PCR všechny *Kvantifikační standardy (Parvo B19 RG/TM QS 1–5)* dodávané spolu s produktem. Všechny reagentie se musí před začátkem testu zcela rozmrazit při pokojové teplotě, musí být dobře promíchány (opakovaný náběr pipetou a vypuštění pipety nebo krátký vortex) a následně centrifugovány.

Chcete-li *Interní kontrolu* použít jak **ke kontrole izolace DNA, tak případné inhibice PCR**, je třeba ji předem přidat k izolaci (viz **část 9.2 Interní kontrola**). V tomto případě používejte následující schéma pipetování (viz také schématický přehled na Obr. 1):

	Počet vzorků	1	12
1. Příprava Master Mixu	<i>Parvo B19 RG/TM Master</i>	30 µl	360 µl
	<i>Parvo B19 RG/TM IC</i>	0 µl	0 µl
	<b>Celkový objem</b>	<b>30 µl</b>	<b>360 µl</b>
2. Příprava PCR reakce	Master Mix	30 µl	po 30 µl
	Vzorek	20 µl	po 20 µl
	<b>Celkový objem</b>	<b>50 µl</b>	<b>po 50 µl</b>

Jestliže chcete *Interní kontrolu* použít **výhradně ke kontrole inhibice PCR**, je třeba ji přidat přímo do směsi *Parvo B19 RG/TM Master*. V tomto případě použijte následující schéma pipetování (viz také schématický přehled na Obr. 2):

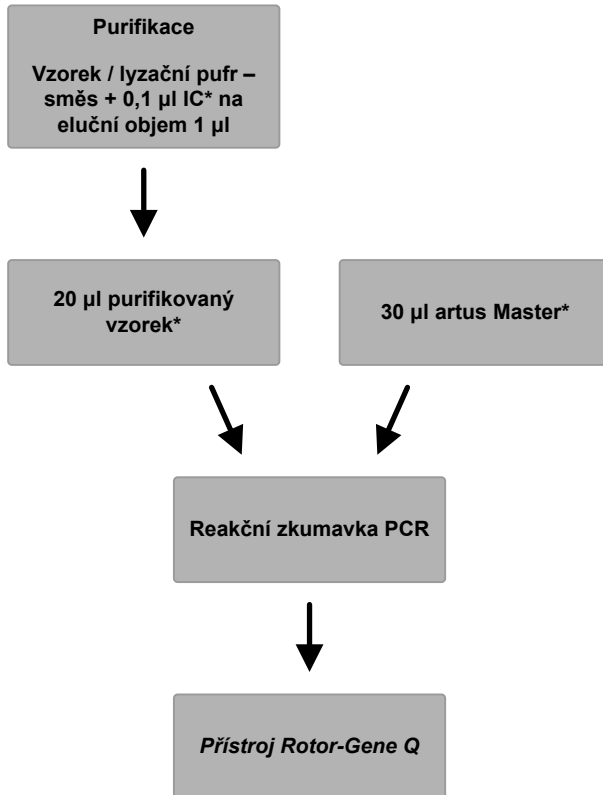
	Počet vzorků	1	12
1. Příprava Master Mixu	<i>Parvo B19 RG/TM Master</i>	30 µl	360 µl
	<i>Parvo B19 RG/TM IC</i>	2 µl	24 µl
	<b>Celkový objem</b>	<b>32 µl*</b>	<b>384 µl</b>
2. Příprava PCR reakce	Master Mix	30 µl	po 30 µl
	Vzorek	20 µl	po 20 µl
	<b>Celkový objem</b>	<b>50 µl</b>	<b>po 50 µl</b>

Odměřte pipetou do každé zkumavky PCR 30 µl směsi Master Mix. Následně přidejte do každé zkumavky 20 µl eluátu z izolace DNA a řádně směs promíchejte opakovaným náběrem a vypuštěním pipety. Obdobně musíte přidat 20 µl alespoň jednoho *Kvantifikačního standardu (Parvo B19 RG/TM QS 1–5)* jako pozitivní kontrolu a jako negativní kontrolu 20 µl vody v kvalitě vhodné pro PCR (*Water, PCR grade*). Uzavřete zkumavky PCR. Ujistěte se, že byl na rotor nasazen *Locking Ring* (Pojistný kroužek) (příslušenství *přístroje Rotor-Gene Q*) jako prevence nechtěného otevření zkumavek během běhu.

---

\*Zvýšení objemu podmíněné přidáním *Interní kontroly* je při přípravě PCR reakce opominuto. Senzitivita detekčního systému není omezena.

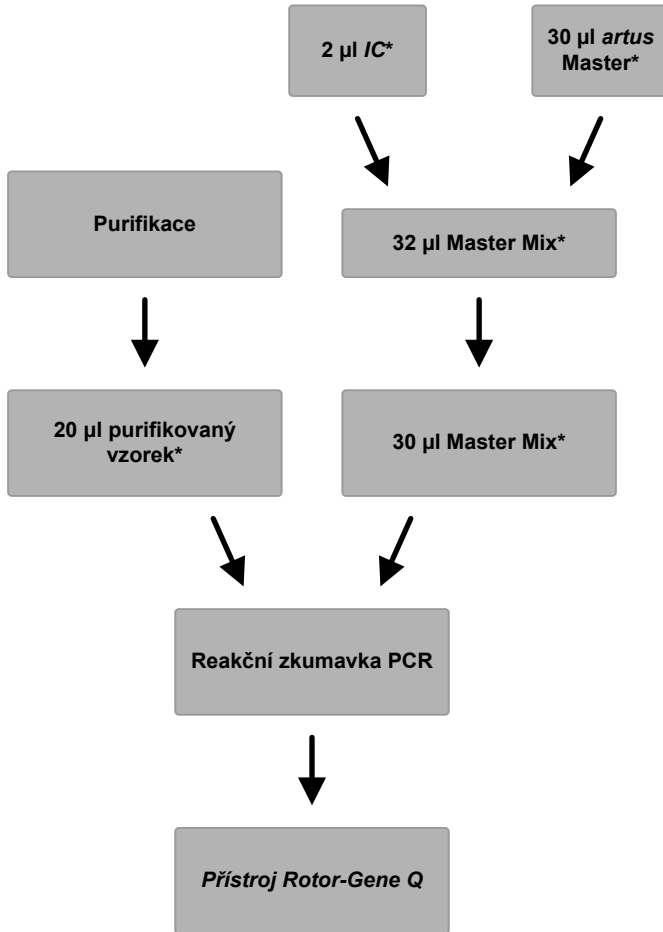
## Přidání *Interní kontroly* k izolaci



Obr. 1: Schéma pracovního postupu pro kontrolu izolace a inhibice PCR.

\*Při každém pipetovacím kroku je třeba bezpodmínečně dbát na to, aby byly používány roztoky dokonale roztáté, řádně promíchané a krátce centrifugované.

### Přidání *Interní kontroly* k *artus Master*



Obr. 2: Schéma pracovního postupu pro kontrolu inhibice PCR.

\*Při každém pipetovacím kroku je třeba bezpodmínečně dbát na to, aby byly používané roztoky dokonale roztáté, řádně promíchané a krátce centrifugované.

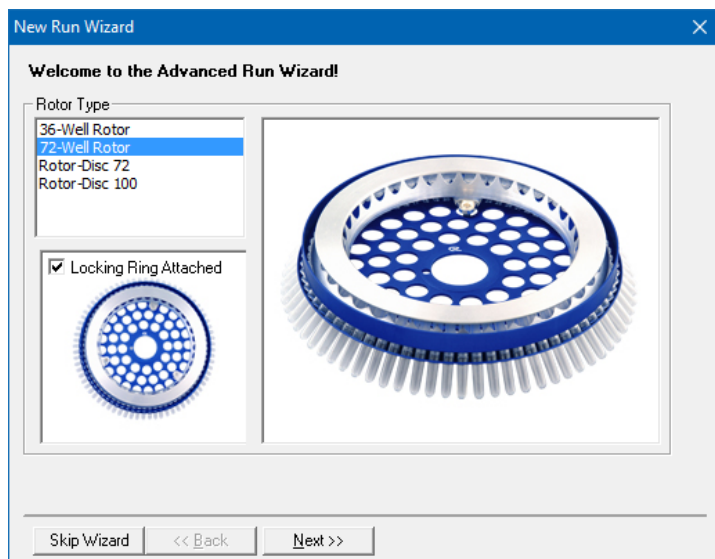
## 9.5 Programování přístroje Rotor-Gene Q

Pro detekci DNA parvoviru B19 vytvořte na přístroji Rotor-Gene Q teplotní profil na základě následujících pěti kroků (viz Obr. 4 - 7).

- |    |  |        |
|----|--|--------|
| A. | Nastavení obecných parametrů PCR             | Obr. 4 |
| B. | Počáteční aktivace enzymu pro Hot Start      | Obr. 5 |
| C. | Amplifikace DNA                              | Obr. 6 |
| D. | Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů | Obr. 7 |
| E. | Spuštění běhu přístroje Rotor-Gene Q         | Obr. 8 |

Veškeré údaje se vztahují na software přístroje Rotor-Gene verze 2.3. Podrobnosti k programování přístroje Rotor-Gene Q naleznete v uživatelské příručce přístroje Rotor-Gene Q.

Nejdříve zvolte „Empty Run“ (Prázdný cyklus) na kartě Advanced (Rozšířený) dialogovém okně „New Run“ (Nový cyklus). Na panelu „Rotor Type“ (Typ rotoru) vyberte „72-Well Rotor“ (Rotor se 72 jamkami), zaškrtněte pole „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen) a klikněte na „Next“ (Další).



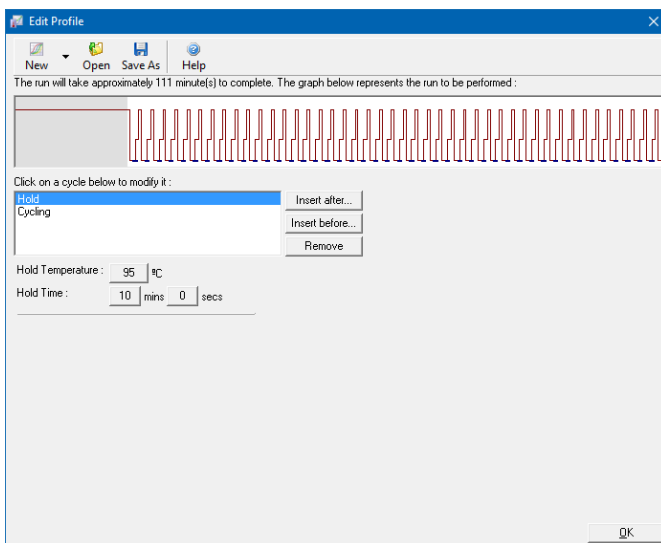
Obr. 3: Uvítací obrazovka průvodce novým cyklem.



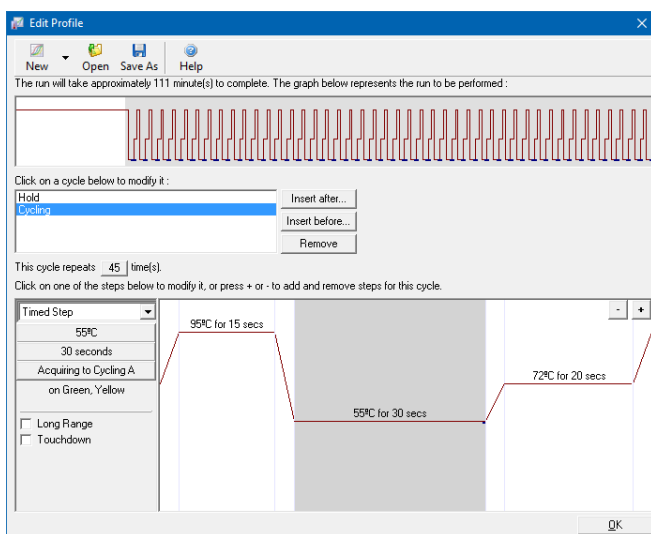
Poté do dalšího okna menu *New Run Wizard* (Průvodce novým cyklem) zadejte objem reakce PCR (viz obr. 4).

Obr. 4: Nastavení obecných parametrů PCR.

Teplotní profil se programuje aktivací tlačítka *Edit* (Upravit) v dalším okně menu *New Run Wizard* (Průvodce novým cyklem) (viz Obr. 5 a 6).

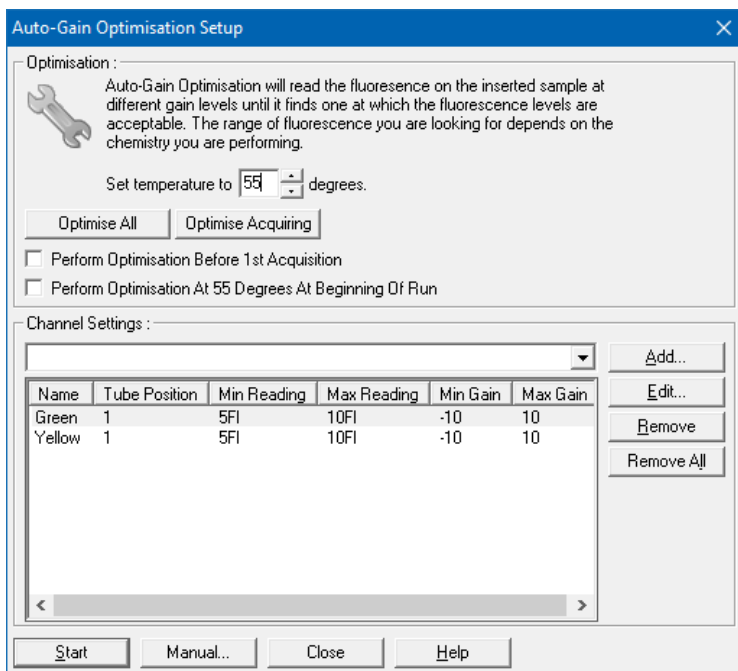


Obr. 5: Počáteční aktivace enzymu pro Hot Start.



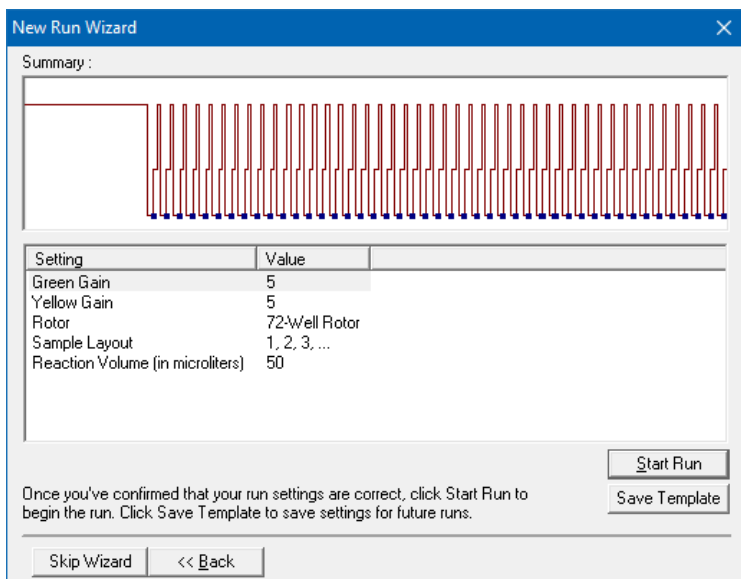
Obr. 6: Amplifikace DNA.

Měřicí rozsah fluorescenčních kanálů je třeba určit podle fluorescenční intenzity ve zkumavkách PCR. Toto nastavení se provádí v okně menu *Auto Gain Optimisation Setup* (Nastavení automatické optimalizace zisku), aktivace pod položkou *New Run Wizard* (Průvodce novým cyklem) v části *Gain Optimisation* (Optimalizace zisku). Kalibrační teplotu nastavte na reasociační (annealing) teplotu amplifikačního programu (viz Obr. 7), vyberte „Optimise Acquiring“ (Optimalizovat pořizování) a spusťte postup.



Obr. 7: Nastavení senzitivity fluorescenčních kanálů.

Hodnoty zisku stanovené automatickou optimalizací zisku se automaticky uloží a jsou uvedeny v seznamu v posledním okně menu programovací procedury (viz Obr. 8).



Obr. 8: Spuštění běhu přístroje Rotor-Gene Q.

## 10. Vyhodnocení

Vyhodnocení dat se provádí pomocí softwaru *Rotor-Gene* podle návodu výrobce (*Uživatelská příručka k přístroji Rotor-Gene Q*).

Může dojít k následujícím výsledkům:

1. Ve fluorescenčním kanálu Cycling A.Green (Cyklování A. Zelená) je detekován signál.

### **Výsledek analýzy je pozitivní: Vzorek obsahuje DNA parvoviru B19.**

V tomto případě je detekce signálu v kanálu Cycling A.Yellow (Cyklování A, Žlutá) podružná, protože vysoké výchozí koncentrace DNA parvoviru B19 (pozitivní signál v kanálu Cycling A.Green (Cyklování A. Zelená)) mohou vést k redukovanému až chybějícímu fluorescenčnímu signálu *Interní kontroly* v kanálu Cycling A.Yellow (Cyklování A, Žlutá) (kompetice).

2. Ve fluorescenčním kanálu Cycling A.Green (Cyklování A. Zelená) není detekován žádný signál. Současně se v kanálu Cycling A.Yellow (Cyklování A, Žlutá) objevuje signál *Interní kontroly*.

**Ve vzorku není prokazatelná žádná DNA parvoviru DNA B19. Lze jej proto považovat za negativní.**

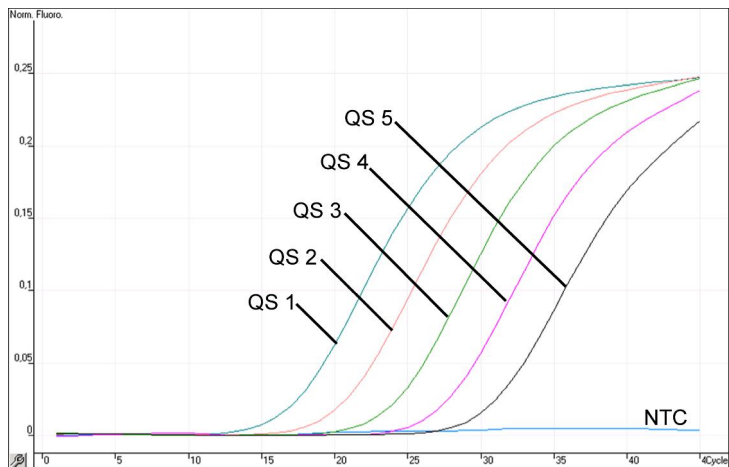
Při negativní PCR na parvovirus B19 vylučuje detekovaný signál *Interní kontroly* možnost inhibice PCR.

3. V kanálu Cycling A.Green (Cyklování A. Zelená) nebo v kanálu Cycling A.Yellow (Cyklování A, Žlutá) není detekován žádný signál.

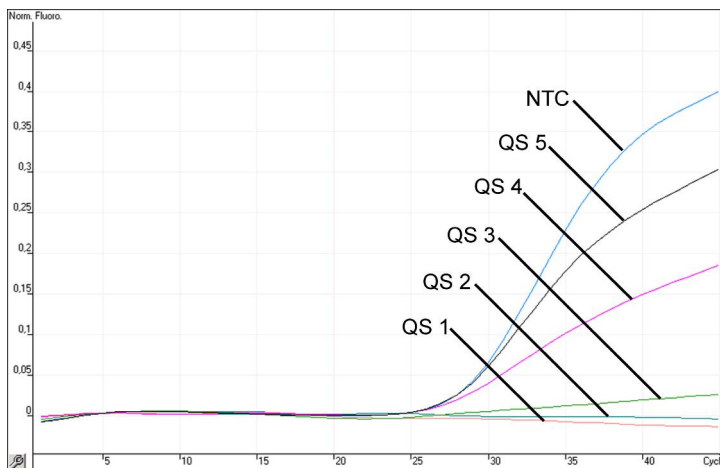
**Není možné učinit závěr.**

Pokyny týkající se zdrojů chyb a jejich odstranění jsou uvedeny v části 11. Řešení problémů.

Příklady pozitivních a negativních reakcí PCR jsou uvedeny na obrázcích Obr. 9 a Obr. 10.



Obr. 9: Detekce Kvantifikačních standardů (Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5) ve fluorescenčním kanálu Cycling A.Green (Cyklování A. Zelená). NTC: beztemplátová kontrola (negativní kontrola).



Obr. 10: Detekce *interní kontroly (IC)* ve fluorescenčním kanálu Cycling A.Yellow (Cyklování A, Žlutá) při současné amplifikaci *Kvantifikačních standardů (Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5)*. NTC: bezteplátová kontrola (negativní kontrola).

## 11. Řešení problémů

### Žádný signál u pozitivních kontrol (*Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5*) ve fluorescenčním kanálu Cycling A.Green (Cyklování A, Zelená):

- Fluorescenční kanál zvolený pro analýzu dat PCR neodpovídá protokolu.
  - K analýze dat zvolte pro analytickou PCR parvoviru B19 fluorescenční kanál A.Green a pro PCR *Interní kontroly* fluorescenční kanál A.Yellow
- Nesprávné naprogramování teplotního profilu *přístroje Rotor-Gene Q*.
  - Porovnejte teplotní profil s údaji protokolu (viz **část 9.5 Programování přístroje Rotor-Gene Q**).
- PCR reakce byla chybně sestavena.
  - Porovnejte svůj pracovní postup s pipetovacím schématem (viz **část 9.4 Příprava PCR**) a případně zopakujte PCR.
- Podmínky uchování jednoho nebo více komponentů sady neodpovídají pokynům uvedeným v **části 2. Skladování** nebo je sada *artus Parvo B19 RG PCR Kit* prošlá.

- Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

**Slabý nebo chybějící signál *Interní kontroly* ve fluorescenčním kanálu *Cycling A.Yellow* (Cyklování A, Žlutá) při současné nepřítomnosti signálu v kanálu *Cycling A.Green* (Cyklování A, Zelená):**

- Podmínky PCR neodpovídají protokolu.
  - Zkontrolujte podmínky PCR (viz výše) a popř. PCR zopakujte s opraveným nastavením.
- PCR byla inhibována.
  - Ujistěte se, že používáte námi doporučený postup izolace (viz **část 9.1 Izolace DNA**) a držte se přesně předpisů výrobce.
  - Přesvědčte se, že byl při izolaci DNA před elucí proveden dodatečný doporučený centrifugační krok k úplnému odstranění zbytků etanolu (viz **část 9.1 Izolace DNA**).
- Během izolace dochází k úbytku DNA.
  - Byla-li k izolaci přidána *Interní kontrola*, může nepřítomnost signálu *Interní kontroly* znamenat úbytek DNA během izolace. Ujistěte se, že používáte námi doporučený postup izolace (viz **část 9.1 Izolace DNA**) a držte se přesně předpisů výrobce.
- Podmínky uchovávání jednoho nebo více komponentů sady neodpovídají pokynům uvedeným v **části 2. Skladování** nebo je sada *artus Parvo B19 RG PCR Kit* prošlá.
  - Prosím zkontrolujte jak podmínky skladování, tak i dobu použitelnosti reagensů (viz štítek soupravy) a použijte popř. novou soupravu.

**Signály s negativními kontrolami ve fluorescenčním kanálu *Cycling A.Green* (Cyklování A, Zelená) analytického PCR.**

- Během přípravy PCR došlo ke kontaminaci.
  - Zopakujte PCR v replikátech s novými reagensy.
  - Uzavřete jednotlivé PCR zkumavky pokud možno ihned po vložení zkoumaného vzorku.
  - Pipetujte pozitivní kontroly zásadně jako poslední.

- Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.
- Během izolace dochází ke kontaminaci.
  - Zopakujte izolaci a PCR zkoumaných vzorků za užití nových reagensů.
  - Ujistěte se, že jsou pracovní plochy a přístroje pravidelně dekontaminovány.

Pokud se vyskytnou další otázky nebo problémy, kontaktujte prosím naši technickou podporu.

## 12. Specifikace

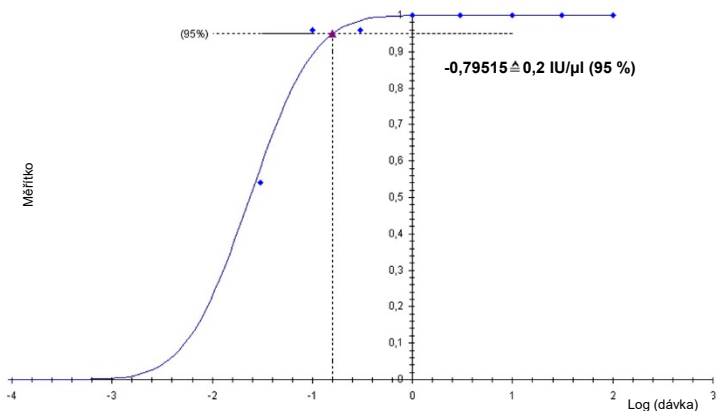
### 12.1 Analytická senzitivita

Pro určení analytické senzitivity sady *artus* Parvo B19 RG PCR Kit byla vytvořena řada ředění standardu od 100 po nominální 0,03 IU parvoviru B19\*/ $\mu\text{l}$ , která byla následně pomocí sady *artus* Parvo B19 RG PCR Kit analyzována. Testování probíhalo ve třech různých dnech v osmi replikátech. Výsledky byly zjištěny probitovou analýzou. Grafické znázornění probitové analýzy naleznete na Obr. 11. Analytický limit detekce sady *artus* Parvo B19 RG PCR Kit je 0,2 IU/ $\mu\text{l}$  ( $p = 0,05$ ). To znamená, že je s 95 % pravděpodobností detekováno 0,2 IU/ $\mu\text{l}$ .

---

\* Standardem je klonovaný produkt PCR, jehož koncentrace byla zjištěna pomocí absorpční a fluorescenční spektroskopie.





Obr. 11: Analytická senzitivita sady *artus* Parvo B19 RG PCR Kit.

## 12.2 Specifická

Specifická sady *artus* Parvo B19 RG PCR Kit je v první řadě zaručena výběrem primerů a sond, jakož i volbou přísných reakčních podmínek. Primery a sondy byly na základě sekvenční analýzy přezkoušeny na eventuální homologie se všemi sekvencemi publikovanými v genových bankách. Tím byly zajištěna detekovatelnost všech relevantních genotypů.

Specifická byla navíc validována pomocí šesti různých sérových vzorků negativních na parvovirus B19, které spolu s primery a sondami specifickými pro parvovirus B19 obsaženými ve směsi *Parvo B19 RG/TM Master* negenerovaly žádný signál.

K určení specifické sady *artus* Parvo B19 RG PCR Kit byla kontrolní skupina uvedená v následující tabulce (viz Tabulka 1) testována na křížovou reaktivitu. Žádný z testovaných původců nebyl reaktivní.

Tabulka 1: Testování specifity diagnostické soupravy pomocí potenciálně křížově reaktivních původců.

Kontrolní skupina	Parvovirus B19 (Cycling A.Green) (Cyklování A. Zelená)	Interní kontrola (Cycling A.Yellow) (Cyklování A, Žlutá)
Lidský herpesvirus 1 (Herpes simplex virus 1)	–	+
Lidský herpesvirus 2 (Herpes simplex virus 2)	–	+
Lidský herpesvirus 3 (Varicella zoster virus)	–	+
Lidský herpesvirus 5 (cytomegalovirus)	–	+
Lidský virus leukémie T-buněk 1	–	+
Lidský virus leukémie T-buněk 2	–	+

### 12.3 Přesnost

Údaje o přesnosti sady *artus* Parvo B19 RG PCR Kit umožňují stanovit celkovou variabilitu testovacího systému. Tato celková variabilita se skládá z **variabilita v rámci jednoho pokusu** (variabilita výsledků vzorků stejné koncentrace v rámci jednoho pokusu), **variabilita mezi různými pokusy** (variabilita výsledků rozboru generovaných na různých přístrojích stejného typu a provedených různými osobami v jedné laboratoři) a **variabilita mezi různými šaržemi** (variabilita výsledků rozboru za užití různých šarží). Přitom byla vždy vypočítána standardní odchylka, variance a koeficient variace jak pro specifickou PCR původce, tak i pro PCR *Interní kontroly*.

Údaje o přesnosti sady *artus* Parvo B19 RG PCR Kit byly stanoveny na základě *Kvantifikačního standardu* s nejnižší koncentrací (QS 5; 10 IU/μl). Experimenty byly provedeny formou osminásobných určení. Údaje o přesnosti byly vypočítány na základě hodnot Ct amplifikačních křivek (Ct: prahový cyklus (threshold cycle), viz Tabulka 2). Pomocí odpovídajících hodnot Ct byly navíc určeny údaje o přesnosti pro kvantitativní výsledky v IU/μl (viz Tabulka 3). Na základě těchto výsledků činí celkový statistický rozptyl libovolného vzorku uvedené koncentrace 1,66 % (Ct) a 17,65 % (konc.) pro průkaz *Interní*

kontroly 0,90 % (Ct). Tyto hodnoty se zakládají na souhrnu všech dílčích hodnot zjištěných variabilit.

Tabulka 2: Údaje o přesnosti na základě Ct hodnot.

	Směrodatná odchylna	Variance	Koeficient variace [%]
Variabilita v rámci jednoho pokusu: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0,22	0,05	0,75
Variabilita v rámci jednoho pokusu: <i>Interní kontrola</i>	0,18	0,03	0,80
Variabilita mezi různými pokusy: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0,32	0,10	1,11
Variabilita mezi různými pokusy: <i>Interní kontrola</i>	0,19	0,03	0,84
Variabilita mezi různými šaržemi: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0,38	0,14	1,47
Variabilita mezi různými šaržemi: <i>Interní kontrola</i>	0,21	0,04	0,92
Celková variabilita: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0,48	0,23	1,66
Celková variabilita: <i>Interní kontrola</i>	0,20	0,04	0,90

Tabulka 3: Údaje o přesnosti na základě kvantitativních hodnot (v IU/μl).

	Směrodatná odchylna	Variance	Koeficient variace [%]
Variabilita v rámci jednoho pokusu: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0,96	0,93	9,58
Variabilita mezi různými pokusy: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	1,33	1,78	13,22
Variabilita mezi různými šaržemi: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	2,27	5,17	22,20
Celková variabilita: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	1,79	3,21	17,65

## 12.4 Robustnost

Přezkoušení robustnosti slouží k stanovení celkové četnosti chyb sady *artus* Parvo B19 RG PCR Kit. 30 sérových vzorků negativních na parvovirus B19 bylo smíseno s 1 IU/μl elučního objemu kontrolní DNA parvoviru B19 (pětinásobná koncentrace analytického limitu senzitivity). Po extrakci pomocí minisady QIAamp DNA Mini Kit (viz **část 9.1 Izolace DNA**) byly tyto vzorky analyzovány s využitím sady *artus* Parvo B19 RG PCR Kit. Četnost chyb pro parvovirus B19 činila u všech vzorků 0 %. Na základě purifikace a analýzy 30 sérových vzorků negativních na parvovirus B19 byla kromě toho přezkoušena robustnost *Interní kontroly*. Celková četnost chyb činila 0 %. Inhibice nebyly pozorovány. Robustnost sady *artus* Parvo B19 RG PCR Kit činí tedy  $\geq 99$  %.

## 12.5 Reprodukovatelnost

Údaje o reprodukovatelnosti jsou pořizovány za účelem pravidelného hodnocení výkonnosti sady *artus* Parvo B19 RG PCR Kit a výkonnostního srovnání s ostatními produkty. Tyto údaje jsou získávány na základě účastí v uznávaných programech pro výkonnostní hodnocení.

## 13. Zvláštní pokyny pro použití produktu

- Všechny reagentie se smí používat výhradně pro diagnostiku in vitro.
- Produkt by měli používat pouze pracovníci, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v metodice diagnostiky in vitro.
- Přesné dodržování protokolu je bezpodmínečně nutné k dosažení optimálních výsledků PCR.
- Dbejte na konec doby použitelnosti uvedený na balení a na štítcích jednotlivých komponent. Nepoužívejte reagentie s prošlou trvanlivostí.
- U některých sekvencí souvisejících s genotypem 3 nelze uváděnou výkonnost zaručit. Vzhledem k mutacím ve vazebné oblasti primerů/sond by mohlo dojít k výraznému snížení senzitivity (Baylis a Buchheit, 2009).

- V ojedinělých případech mohou mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu, které jsou pokryty primery a/nebo sondami soupravy, vést k nedostatečné kvantifikaci nebo k selhání detekce přítomnosti viru. Validita a účinnost testu jsou pravidelně kontrolovány.

## 14. Varování a bezpečnostní opatření

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v odpovídajících bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online v pohodlném a kompaktním formátu PDF na stránkách [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro každou sadu QIAGEN® a pro každou komponentu těchto sad.

Odpad ze vzorků a rozborů likvidujte podle místních bezpečnostních předpisů.

## 15. Řízení jakosti

V souladu se systémem managementu jakosti společnosti QIAGEN certifikovaným podle norem ISO byla každá šarže sady *artus* Parvo B19 RG PCR Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena jednotná kvalita produktu.

## 16. Literatura

Baylis SA, Buchheit KH. A proficiency testing study to evaluate laboratory performance for the detection of different genotypes of parvovirus B19. *Vox Sang.* 2009; 97 (1): 13 – 20.

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (3): 190 – 212.

## 17. Vysvětlení symbolů



Použijte do



Číslo šarže



Výrobce



Katalogové číslo



Číslo materiálu



Příručka



Prostředek zdravotnické techniky pro in vitro diagnostiku



Díly



Obsahuje



Počet



Globální číslo obchodní položky GTIN



<N>

Obsahuje reagentie dostačující pro <N> testů



Teplotní rozmezí



Další informace viz návod k použití

**QS**

*Kvantifikační standard*

**IC**

*Interní kontrola*

## artus Parvo B19 RG PCR Kit

Ochranné známky a odmítnutí odpovědnosti  
QIAGEN®, QIAamp®, artus®, Rotor-Gene®, UltraSens® (QIAGEN Group).

Historie revizí dokumentu	
R4 06/2018	Toto je verze 4 příručky sady artus Parvo RG PCR Kit. Změny oproti předchozí verzi zahrnují přidání prohlášení ohledně předpokládaného použití, odstranění části diagnostického vyhodnocení, odstranění zmínky o 36jamkovém rotoru a 0,2ml zkumavkách a aktualizaci popisu přístroje a softwaru Rotor-Gene Q na verze, které jsou v současnosti dostupné.

Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, a to i v případě, že takto nejsou výslovně označeny, nejsou považovány za zákonem nechráněné.

artus Parvo B19 RG PCR Kit je diagnostická sada označená značkou CE v souladu s evropskou směrnicí 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro. Produkt není dostupný ve všech zemích.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo příručce uživatele. Příručky a uživatelské návody sady QIAGEN jsou k dispozici na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com), nebo si je lze vyžádat u Technických služeb QIAGEN nebo svého lokálního distributora.

Koupe tohoto produktu opravňuje kupujícího k jeho užití k provedení diagnostických služeb pro humánní in vitro diagnostiku. Tímto se neuděluje žádný jiný obecný patent nebo licenci jiného druhu než toto specifické právo k používání vyplývající z nákupu.

### Omezená licenční smlouva

Použití tohoto produktu znamená, že jakýkoliv kupující či uživatel sady artus Parvo B19 RG PCR Kit souhlasí s následujícími podmínkami:

1. Sada artus Parvo B19 RG PCR Kit může být používána výlučně v souladu s *Příručkou pro sadu artus Parvo B19 RG PCR Kit* a pouze s komponenty obsaženými v sadě. QIAGEN neposkytuje žádnou licenci v rámci kteréhokoliv svého duševního vlastnictví k použití nebo zařazení přiložených komponentů sady ke komponentům, které nejsou v sadě zahrnuty, s výjimkou případů uvedených v *Příručce pro sadu artus Parvo B19 RG PCR Kit* a dodatečných protokolech dostupných na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Mimo výslovně uvedenou licenci QIAGEN neposkytuje žádnou záruku, že tato souprava a/nebo její použití neporušuje práva třetích stran.
3. Tato sada a její díly jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepřepřerovat ani opakovaně prodávat.
4. QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že neposkytne a nepovolí nikomu jinému provádět žádné kroky, které by mohly vést nebo by usnadnily jakékoliv shora zakázané činnosti. QIAGEN může zákazy tohoto Omezeného licenčního ujednání prosadit u každého soudu a vyžadovat úhradu všech vyšetřovacích a soudních poplatků, vč. poplatků za advokáta, v rámci jakéhokoliv postupu k prosazení tohoto Omezeného licenčního ujednání nebo jakýchkoliv jiných práv duševního vlastnictví vztahujících se na tuto soupravu a/nebo její komponenty.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení viz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)





[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

**Australia** ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

**Austria** ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

**Belgium** ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

**Brazil** ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

**Canada** ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**China** ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

**Denmark** ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

**Finland** ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

**France** ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

**Germany** ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

**Hong Kong** ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

**Ireland** ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

**Italy** ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

**Japan** ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

**Korea (South)** ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

**Luxembourg** ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

**Mexico** ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

**The Netherlands** ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

**Norway** ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

**Singapore** ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

**Spain** ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

**Sweden** ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

**Switzerland** ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

**UK** ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

**USA** ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

1112933 CS



Sample & Assay Technologies