

artus® Parvo B19 RG PCR Kit 안내서



24(카탈로그 번호: 4504263)

시험관 내 정량적 진단

Rotor-Gene® Q 기기와 함께 사용

2018 6 월 – 버전 1



4504263, 4504265



1112933 KO-KR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, 독일

R4

MAT

1112933 KO-KR



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN 는 모든 생물학 검체 콘텐츠의 격리와 탐지를 가능하게 하는 혁신적인 검체 및 분석 기술을 제공하는 선도 업체입니다. 당사가 제공하는 고품질의 선진 제품 및 서비스를 통해 검체에서 결과 달성까지 성공적으로 수행할 수 있습니다.

QIAGEN 이 기준을 설립한 분야:

- DNA, RNA 및 단백질 정제
- 핵산 및 단백질 분석
- microRNA 연구 및 RNAi
- 검체 및 분석 기술의 자동화

저희의 사명은 고객들이 큰 성공을 거두고 난관을 극복할 수 있도록 지원하는 것입니다. 보다 자세한 정보는 www.qiagen.com 을 방문하십시오.

목차

1. 목차	5
2. 보관법	5
3. 추가로 필요한 물질 및 장치	6
4. 일반적 주의사항	6
5. 용도	7
6. 병원균 정보	7
7. 실시간 PCR 의 원리	8
8. 제품 설명	8
9. 프로토콜	9
9.1 DNA 분리	9
9.2 내부 대조군	12
9.3 정량화	13
9.4 PCR 준비	14
9.5 Rotor-Gene Q 기기의 프로그래밍	19
10. 데이터 분석	25
11. 문제해결	27
12. 사양	29
12.1 분석 민감도	29

12.2	특이성.....	30
12.3	정밀도.....	31
12.4	완건성.....	33
12.5	재현성.....	34
13.	제품 사용 상의 제한.....	34
14.	경고 및 예방조치	35
15.	정도 관리	35
16.	참고 문헌	35
17.	기호 설명	36

artus Parvo B19 RG PCR Kit

Rotor-Gene Q 기기와 함께 사용함.

1. 목차

	라벨 내용물	카탈로그 번호 4504263 24 개 반응
파란색	<i>Parvo B19 RG/TM Master</i>	2 x 12 개 반응
빨간색	<i>Parvo B19 RG/TM QS 1^o 1 x 10⁵ IU/μl</i>	1 x 200μl
빨간색	<i>Parvo B19 RG/TM QS 2^o 1 x 10⁴ IU/μl</i>	1 x 200μl
빨간색	<i>Parvo B19 RG/TM QS 3^o 1 x 10³ IU/μl</i>	1 x 200μl
빨간색	<i>Parvo B19 RG/TM QS 4^o 1 x 10² IU/μl</i>	1 x 200μl
빨간색	<i>Parvo B19 RG/TM QS 5^o 1 x 10¹ IU/μl</i>	1 x 200μl
녹색	<i>Parvo B19 RG/TM IC^o</i>	1 x 1000μl
흰색	<i>물(PCR 등급)</i>	1 x 1000μl

QS = Quantitation Standard(정량 표준)

IC = Internal Control(내부 대조군)

2. 보관법

artus Parvo B19 RG PCR Kit 구성품은 -15°C 에서 -30°C 사이에 보관해야 하고 라벨에 기재된 유통기한 날짜 전까지 안정적입니다. 반복적인 해동 및 동결 (>2 x)은 민감도를 떨어뜨릴 수 있으므로 피해야 합니다. 시약을 간헐적으로만

사용하면, 부분표본으로 냉동해야 합니다. +4°C 에서 5 시간 넘게보관하면 안 됩니다.

3. 추가로 필요한 물질 및 장치

- 1 회용 비분말 장갑
- DNA 분리 키트(제 9.1 절 DNA 분리 참조)
- 피펫(조정형)
- 필터를 갖춘 멸균 피펫 팁
- 보텍스 믹서
- 2ml 반응 튜브용 로터 포함 데스크탑 원심분리기
- *Rotor-Gene Q* 기기(소프트웨어 버전 2.3 이상)
- Strip Tubes and Caps, 0.1ml(카탈로그 번호 981103 또는 981106)
- 냉각 블록(Loading Block 72 x 0.1ml Tubes, 카탈로그 번호 9018901)

4. 일반적 주의사항

사용자는 언제나 다음 사항에 주의를 기울여야 합니다.

- 항상 필터가 있는 멸균 피펫 팁을 사용합니다.
- 기타 모든 시약에서 별도로 양성 물질(검체, 대조물질, 앰플리콘)을 보관, 추출한 다음 이를 공간적으로 분리된 시설의 시약 혼합물에 첨가합니다.
- 분석을 시작하기 전에 모든 구성품을 실온에서 완전히 해동합니다.
- 해동되면 구성품을 혼합하여 잠시 원심분리합니다.

- 얼음이나 냉각 블록(72 웰 로딩 블록)에서 신속하게 작업합니다.

5. 용도

artus Parvo B19 RG PCR Kit 는 인간의 혈청 또는 EDTA 혈장에서 파보 바이러스 B19 DNA 를 검출하고 정량화하는 시험관 내 핵산 증폭 검사입니다. 키트는 실시간 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 활용하며, QIAamp UltraSens Virus Kit, QIAamp DNA Mini Kit, Rotor-Gene Q 기기 등과 함께 사용할 수 있도록 구성되었습니다.

키트는 파보 바이러스 B19 감염의 혈액/혈액 제제 선별 검사로 사용하기 위한 것이 아닙니다. artus Parvo B19 RG PCR Kit 는 의료 전문가의 시험관 내 진단 용도로 사용하기 위한 것입니다.

6. 병원균 정보

파보 바이러스 B19 감염은 대부분 임상적 증상이 없습니다. 파보 바이러스 B19 급성 감염의 증상은 독감과 유사하지만 풍진(독일 홍역)의 증상과 유사하기도 하며, 특히 성인의 경우에는 류머티즘의 증상과 유사합니다. 파보 바이러스 B19 는 용혈성 빈혈 환자에서 골수 무형성 위기의 주요 원인입니다. 특히 제 2 및 제 3 석달 동안의 모체 감염 후에 심각한 태자 합병증이 관찰되기도 합니다.

7. 실시간 PCR 의 원리

중합효소연쇄반응법(PCR)의 병원균 진단은 병원균 게놈의 특정 부위를 증폭하는 방법을 바탕으로 합니다. 실시간 PCR 에서는 형광 염료를 사용하여 증폭된 산물을 탐지합니다. 이는 일반적으로 확장된 산물에 특히 고정되는 올리고뉴클레오티드 프로브에 연결되어 있습니다. PCR 실행 중에 (실시간으로) 형광 강도를 모니터링함으로써 PCR 실행 후에 반응 튜브를 다시 개봉할 필요 없이 누적되는 물질을 탐지하여 정량화할 수 있습니다(Mackay, 2004).

8. 제품 설명

artus Parvo B19 RG PCR Kit 는 *Rotor-Gene Q* 기기에서 중합효소 연쇄반응(PCR)을 사용하여 파보 바이러스 B19 DNA 를 검출하는 사용이 간편한 시스템입니다. *Parvo B19 RG/TM Master* 에는 파보 바이러스 B19 게놈의 76 bp 부위를 증폭하고 *Rotor-Gene Q* 기기의 형광성 채널인 Cycling A. Green(녹색 A. 사이클링)의 특정 앰플리콘을 직접 검출하기 위한 시약과 효소가 들어 있습니다. 또한, *artus Parvo B19 RG PCR Kit* 에는 PCR 억제 가능성을 파악하기 위해 이차 이중 증폭 시스템이 포함되어 있습니다. 이것은 형광성 채널 Cycling A. Yellow(노란색 A. 사이클링)에서 내부 대조군(*Internal Control, IC*)으로 검출됩니다. 분석 파보 바이러스 B19 PCR 의 검출 한계(제 12.1 절 분석 민감도 참조)는 감소하지 않습니다. 외부 양성 대조군(*Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5*)이 공급되어 병원균 부하를 결정할 수 있습니다. 자세한 내용은 제 9.3 절 정량화를 참조하십시오.

9. 프로토콜

9.1 DNA 분리

DNA 분리 키트를 제공하는 제조업체는 많습니다. DNA 분리 절차에 사용되는 검체 양은 사용하는 프로토콜에 따라 다릅니다. DNA 분리 작업은 제조업체의 지침에 따라 수행하십시오. 권장하는 분리 키트는 다음과 같습니다.

검체 재료	핵산 분리 키트	카탈로그 번호	제조업체	운반체 RNA
혈청, 혈장	QIAamp® UltraSens® Virus Kit(50)	53 704	QIAGEN	포함됨
	QIAamp DNA Mini Kit(50)	51 304	QIAGEN	포함되지 않음

- 운반체 RNA**의 사용은 추출 효율성, 따라서 DNA/RNA 산출량에 중요합니다. 선택된 분리 키트에 운반체 RNA 가 없는 경우에는 세포 유리형 체액과 DNA/RNA 함량이 낮은 물질(예: CSF)에서 핵산을 추출할 때 운반체(RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, 카탈로그 번호 27-4110-01)를 추가할 것을 강력히 권장한다는 것에 유의하십시오. 이 경우에 다음과 같이 진행하십시오.
 - 추출 키트의 용출 완충액을 사용하여(예를 들어, QIAamp DNA Mini Kit 의 완충액 AE; 용균 완충액을 사용하지 말 것) 동결 건조된 운반체 RNA 를 재현탁하고 1µg/µl 농도의 희석액을 준비합니다. 이

운반체 RNA 용액을 수요에 맞는 여러 분취 검체로 나눈 후에 -15°C와 -30°C 사이에서 보관합니다. 운반체 RNA 분취 검체의 반복 해동(3회 이상)을 피합니다.

- b) 100µl의 용균 완충액 당 1µg의 운반체 RNA를 사용합니다. 예를 들어 추출 프로토콜에서 200µl의 용균 완충액을 제안하면 2µl의 운반체 RNA(1µg/µl)를 직접 용균 완충액에 추가합니다. 각 추출 작업을 시작하기 전에 다음과 같은 피펫팅 방법에 따라 용균 완충액과 운반체 RNA(및 적절한 경우에 내부 대조균: 제 9.2 절 내부 대조균참조)의 혼합액을 신선하게 준비해야 합니다.

검체 개수	1	12
용균 완충액	예를 들어, 200µl	예를 들어, 2,400µl
운반체 RNA(1µg/µl)	2µl	24µl
총 용적	202µl	2,424µl
추출 당 용적	200µl	각 200µl

- c) 신선하게 준비한 용균 완충액 및 운반체 RNA의 혼합액을 즉시 추출에 사용합니다. 혼합액의 보관은 가능하지 않습니다.
- **운반체 RNA**의 사용은 추출 효율성, 따라서 DNA/RNA 산출량에 중요합니다. QIAamp UltraSens Virus Kit와 함께 제공되는 운반체 RNA의 안정성을 높으려면 추출 키트의 사용자 매뉴얼과 다른 다음과 같은 절차를 권장합니다.

- a. 추출 키트를 처음 사용하기 전에 동결 건조된 운반체 RNA 를 키트와 함께 제공되는 용출 완충액 310 μ l(1 μ g/ μ l 의 최종 농도; 용균 완충액을 사용하지 말 것)에서 재현탁합니다. 이 운반체 RNA 용액을 수요에 맞는 여러 분취 검체로 나눈 후에 -15°C 와 -30°C 사이에서 보관합니다. 운반체 RNA 분취 검체의 반복 해동(3 회 이상)을 피합니다.
- b. 각 추출 작업을 시작하기 전에 다음과 같은 피펫팅 방법에 따라 용균 완충액과 운반체 RNA(및 적절한 경우에 내부 대조균. 제 **9.2 절 내부 대조균** 참조)의 혼합액을 신선하게 준비해야 합니다.

검체 개수	1	12
용균 완충액 AC	800 μ l	9,600 μ l
운반체 RNA(1 μ g/ μ l)	5.6 μ l	67.2 μ l
총 용적	805.6μl	9,667.2μl
추출 당 용적	800μl	각 800μl

- c. 신선하게 준비한 용균 완충액 및 운반체 RNA 의 혼합액을 즉시 추출에 사용합니다. 혼합액의 보관은 가능하지 않습니다.
- *artus Parvo B19 RG PCR Kit* 의 가장 높은 민감도를 달성하려면 50 μ l 의 용출 완충액에서 DNA 를 용출할 것을 권장합니다.
 - **QIAamp UltraSens Virus Kit** 는 검체 농축이 가능합니다. 혈청이나 혈장 이외의 검체 물질을 사용하는 경우에는 인간 음성 혈장의 50%(v/v) 이상을 검체에 추가합니다.

- **에탄올**을 함유하는 세척 완충액으로 분리 프로토콜을 실시하는 경우에는 용출 작업으로 나머지 에탄올을 제거하기 전에 추가 원심 분리 단계(3 분, 13,000rpm)를 수행합니다. 이렇게 하면 PCR 억제 발생을 막을 수 있습니다.
- *artus* Parvo B19 RG PCR Kit 는 **페놀** 기반의 분리 방법으로 사용해서는 안 됩니다.

중요: *artus* Parvo B19 RG PCR Kit 의 **내부 대조군**은 분리 절차에서 직접 사용할 수 있습니다(제 9.2 절 **내부 대조군** 참조).

9.2 내부 대조군

내부 대조군(*Parvo B19 RG/TM IC*)이 공급됩니다. 이를 통해 사용자는 **DNA 분리 절차를 통제할 수 있을 뿐만 아니라 PCR 억제 발생도 확인할 수 있습니다**(그림 1 참조). 이 용도로 사용하려면 **내부 대조군**을 분리 검체에 1µl 용출 용적 당 0.1µl의 비율로 추가합니다. 예를 들어 QIAamp UltraSens Virus Kit 를 사용하면 DNA 가 50µl 완충액 AVE 에서 용출됩니다. 따라서 5µl 의 **내부 대조군**을 초기에 추가해야 합니다. 사용하는 **내부 대조군**의 양은 용출 용적에 따라서만 달라집니다. **내부 대조군** 및 운반체 RNA(제 9.1 절 **DNA 분리** 참조)는 반드시

- 용균 완충액과 검체 물질의 혼합액에 추가하거나,
- 용균 완충액에 직접 추가해야 합니다.

표준 곡선을 가져오기 해야 합니다(*Rotor-Gene Q 사용자 매뉴얼* 참조). 그러나 이 정량화 방법은 상이한 PCR 실행 간의 변산도로 인해 결과가 다를 수 있습니다.

주의: 정량 표준은 IU/μl 로 정의합니다. 다음 방정식은 표준 곡선을 사용하여 결정한 값을 검체 물질의 IU/ml 로 변환하는 데 적용해야 합니다.

$$\text{검체 물질의 결과(IU/ml)} = \frac{\text{용출물의 결과(IU/}\mu\text{l)} \times \text{용출 용량}(\mu\text{l})}{\text{검체 용량(ml)}}$$

원칙적으로, 위의 방정식에는 초기 검체 용량을 입력해야 한다는 것에 유의하십시오. 검체 용량이 핵산 추출 이전에 변경된 경우(예: 원심 분리로 용량을 줄이거나 분리에 필요한 용량을 보충하여 용량을 늘리는 경우)에 고려해야 할 사항입니다.

9.4 PCR 준비

냉각 블록(*Rotor-Gene Q* 기기의 부속품)을 +4°C 로 사전에 냉각해 두어야 합니다. 원하는 PCR 튜브 개수를 냉각 블록에 넣으세요. 각 PCR 을 실행할 때마다 1 개 이상의 정량 표준뿐만 아니라 1 개의 음성 대조군(물, PCR 등급)이 포함되어야 합니다. 표준 곡선을 생성하려면 PCR 을 실행할 때마다 공급된 정량 표준(*Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5*)을 모두 사용하세요. 매번 사용 전에 모든 시약을 완전히 녹이고, 혼합하고(위/아래 피펫팅 반복 또는 빠르고 격렬하게 흔들기), 짧게 원심분리시켜야 합니다.

내부 대조균을 사용하여 DNA 분리 절차를 모니터링하고 PCR 억제 여부를 확인하려면 이미 분리 검체에 추가되었다는 것에 유의하세요(제 9.2 절 내부 대조균참조). 이 경우에는 다음과 같은 피펫팅 방법을 사용하세요(도해 개요는 그림 1 참조).

		검체 개수	1	12
1. 마스터 믹스 준비	Parvo B19 RG/TM Master		30µl	360µl
	Parvo B19 RG/TM IC		0µl	0µl
	총 용적		30µl	360µl
2. PCR 분석 준비	마스터 믹스		30µl	각 30µl
	검체		20µl	각 20µl
	총 용적		50µl	각 50µl

내부 대조균을 PCR 억제 여부를 확인하는 데만 사용하려면 Parvo B19 RG/TM Master 에 직접 추가해야 합니다. 이 경우에는 다음과 같은 피펫팅 방법을 사용하세요(도해 개요는 그림 2 참조).

		검체 개수	1	12
1. 마스터 믹스 준비	Parvo B19 RG/TM Master		30µl	360µl
	Parvo B19 RG/TM IC		2µl	24µl
	총 용적		32µl*	384µl
2. PCR 분석 준비	마스터 믹스		30µl	각 30µl
	검체		20µl	각 20µl
	총 용적		50µl	각 50µl

마스터 믹스 30µl를 피펫으로 각 PCR 튜브에 분주합니다. 다음에 용출된 검체 DNA의 20µl를 각 튜브에 추가한 후에 피펫을 상하로 여러 번 저어서 잘 혼합합니다. 따라서 1개 이상의 정량 표준(Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5) 20µl을 양성 대조군으로, 물(물, PCR 등급) 20µl을 음성 대조군으로 사용해야 합니다. PCR 튜브를 닫습니다. 잠금 링(Rotor-Gene Q 기기 부속품)이 로터 상단에 위치하여 실행 중 튜브가 실수로 개봉되지 않도록 주의하십시오.

* PCR 분석을 준비할 때 내부 대조군의 추가로 증가된 용적은 무시합니다. 검출 시스템의 민감도가 떨어지지 않습니다.

정제 절차에 내부 대조균 추가

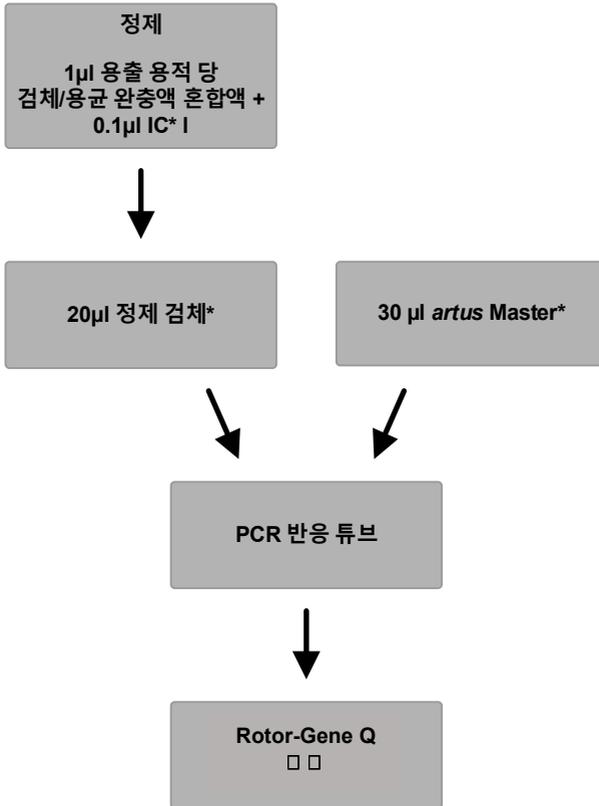


그림 1: 정제 절차와 PCR 억제를 모두 관리하는 도해 워크플로.

*용액을 완전히 해동하고 잘 혼합한 다음에 짧게 원심분리해 주십시오.

내부 대조군을 artus Master 에 추가

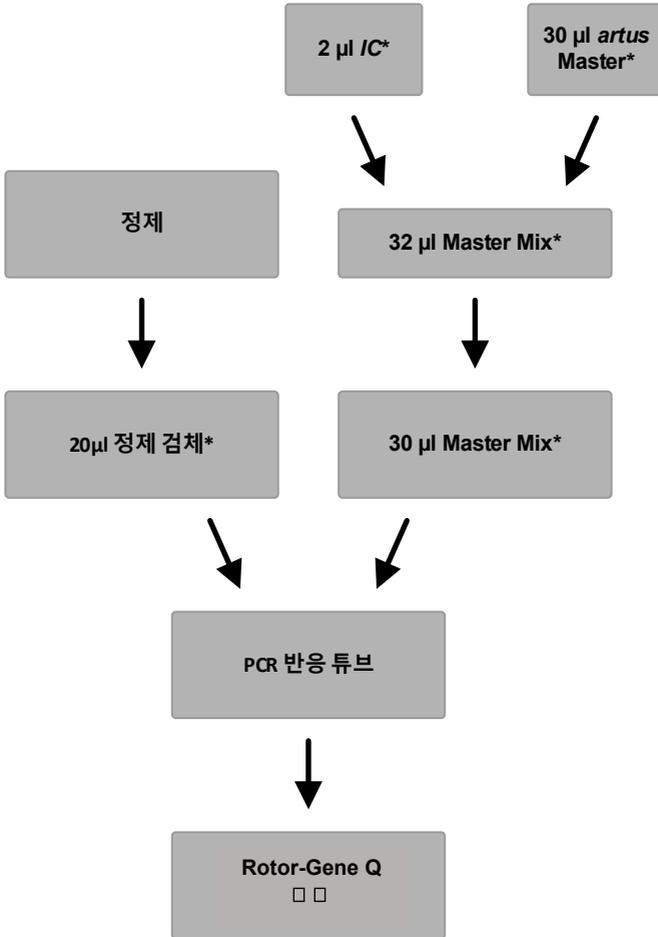


그림 2: PCR 억제를 관리하는 도해 워크플로.

*용액을 완전히 해동하고 잘 혼합한 다음에 짧게 원심분리해 주십시오.

9.5 Rotor-Gene Q 기기의 프로그래밍

Parvo B19 DNA 를 검출하려면 다음과 같은 5 개 단계(그림 4-7 참조)에 따라 *Rotor-Gene Q* 기기에서 온도 프로필을 작성하세요.

- | | |
|----------------------------------|------|
| A. 일반 분석 매개변수의 설정 | 그림 4 |
| B. Hot Start 효소의 초기 활성화 | 그림 5 |
| C. DNA 의 증폭 | 그림 6 |
| D. 형광성 채널 민감도의 조정 | 그림 7 |
| E. <i>Rotor-Gene Q</i> 기기 실행의 시작 | 그림 8 |

모든 사양은 *Rotor-Gene* 소프트웨어 버전 2.3 의 사양입니다. *Rotor-Gene Q* 기기의 프로그래밍에 대한 자세한 내용은 *Rotor-Gene Q* 사용자 매뉴얼을 참조하십시오.

먼저 "New Run"(새 실행) 대화상자의 고급 탭에서 "Empty Run"(빈 실행)을 선택하세요. "Rotor Type"(로터 유형) 패널에서 "72-Well Rotor"(72 웰 로터)를 선택하고 "Locking Ring Attached"(잠금 링 부착) 상자를 확인 표시한 다음에 "Next"(다음)을 클릭합니다.

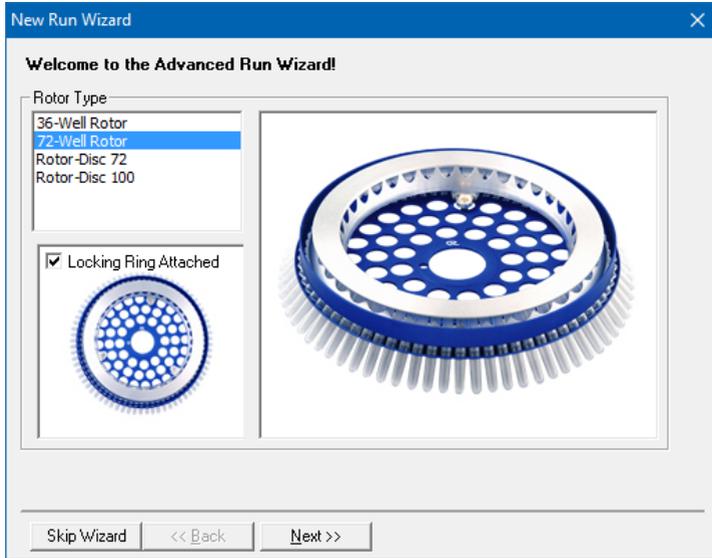


그림 3: 새 실행 마법사 환영 화면.

다음에 다음 메뉴 창 "New Run Wizard"(새 실행 마법사)에서 PCR 반응 용적을 입력합니다(그림 4 참조).

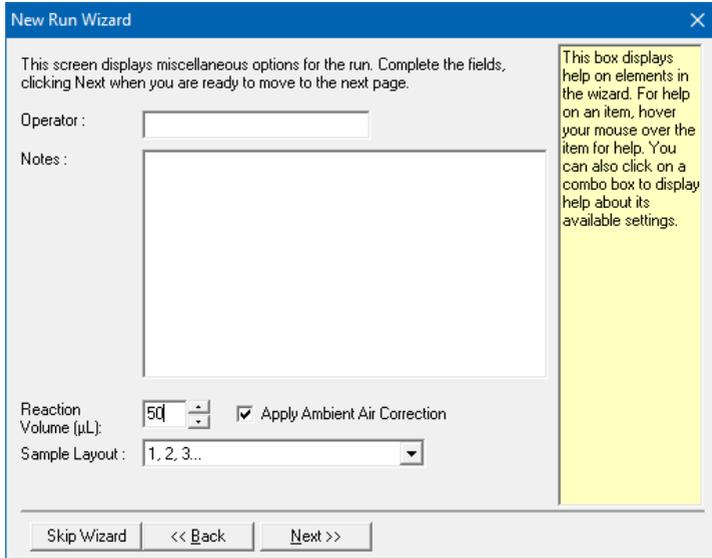


그림 4: 일반 분석 매개변수의 설정.

온도 프로파일의 프로그래밍은 다음 "New Run Wizard"(새 실행 마법사) 메뉴 창에서 "Edit"(편집) 버튼을 활성화하여 수행합니다(그림 5 및 6 참조).

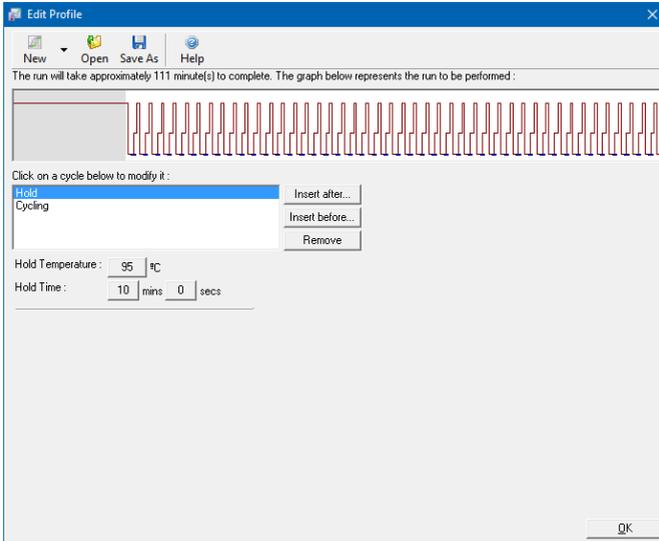


그림 5: Hot Start 효소의 초기 활성화.

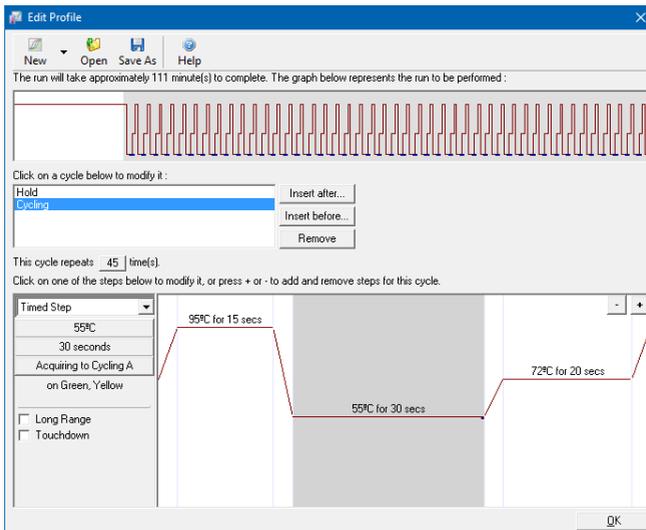


그림 6: DNA의 증폭.

형광 채널의 검출 범위는 PCR 튜브의 형광 강도에 따라 결정해야 합니다. 이 조정은 "Auto Gain Optimisation Setup"(자동 게인 최적화 설정)("Gain Optimisation"(게인 최적화) 아래 "New Run Wizard"(새 실행 마법사) 메뉴 창에서 활성화) 메뉴 창에서 수행합니다. 교정 온도를 증폭 프로그램의 결합 온도로 설정하고(그림 7 참조) "Optimise Acquiring"(취득 최적화)을 선택한 후에 절차를 시작합니다.

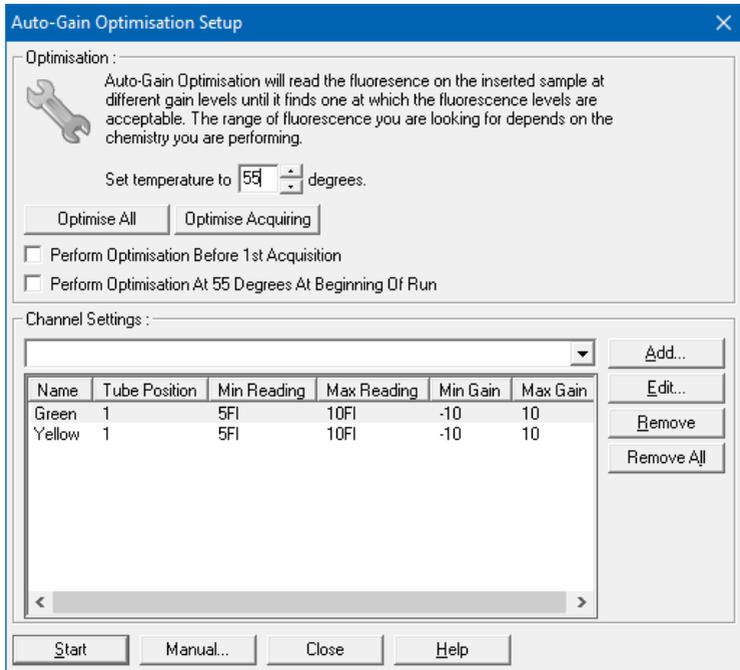


그림 7: 형광성 채널 민감도의 조정.

자동 게인 최적화로 결정된 게인 값은 자동으로 저장되며, 프로그래밍 절차의 최종 메뉴 창에 나열됩니다(그림 8 참조).

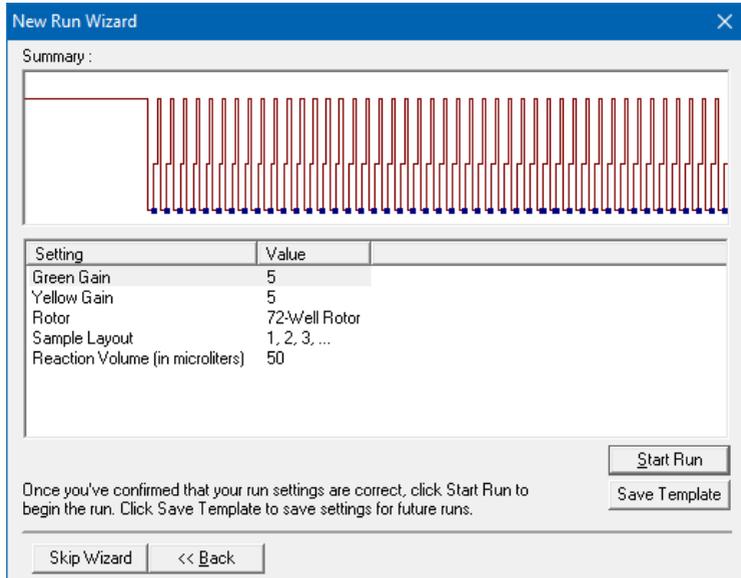


그림 8: Rotor-Gene Q 기기 실행의 시작.

10. 데이터 분석

데이터 분석은 제조업체의 지침(*Rotor-Gene Q 사용자 매뉴얼*)에 따라 *Rotor-Gene* 소프트웨어를 사용하여 수행합니다.

발생 가능한 결과는 다음과 같습니다.

1. 형광성 채널 Cycling A. Green(녹색 A. 사이클링)에서 신호가 검출됩니다.

분석 결과가 양성입니다: 검체에 파보 바이러스 B19 DNA 가 있습니다.

이 경우, 파보 바이러스 B19 DNA(Cycling A.Green(녹색 A. 사이클링) 채널의 양성 신호)의 높은 초기 농도로 인해 Cycling A.Yellow(노란색 A. 사이클링) 채널(경쟁)에서 *내부 대조군* 형광 신호가 약하거나 없을 수 있기 때문에 Cycling A.Yellow(노란색 A. 사이클링) 채널의 신호 검출이 필요하지 않습니다.

2. 형광성 채널 Cycling A. Green(녹색 A. 사이클링)에서 신호가 검출되지 않습니다. 동시에 *내부 대조군*의 신호가 Cycling A. Yellow(노란색 A. 사이클링) 채널에 표시됩니다.

검체에서 파보 바이러스 B19 DNA 를 검출할 수 없습니다. 음성으로 판단할 수 있습니다.

음성 파보 바이러스 B19 PCR 의 경우에 내부 대조군의 신호가 검출되면 PCR 억제 가능성이 없습니다.

3. Cycling A. Green(녹색 A. 사이클링) 또는 Cycling A. Yellow(노란색 A. 사이클링) 채널에서 어떤 신호도 검출되지 않습니다.

어떤 결과로도 결론을 내릴 수 없습니다.

오류 원인과 해결책에 대한 정보는 제 11 절 **문제해결**에서 볼 수 있습니다.

양성 및 음성 PCR 반응의 사례가 그림 9 및 그림 10에 나와 있습니다.

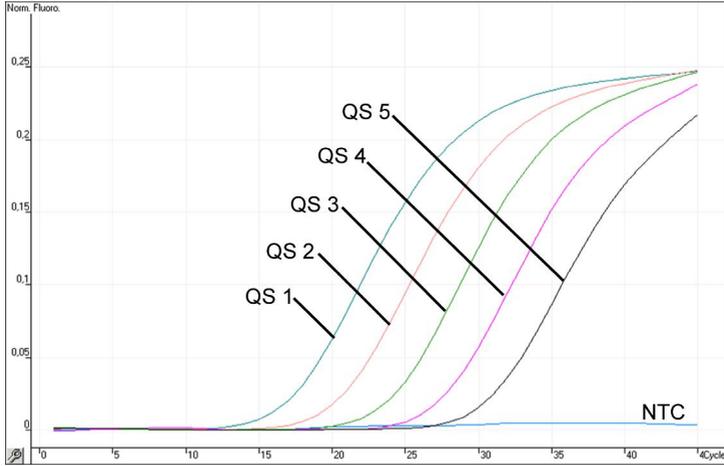


그림 9: 형광성 채널 Cycling A. Green(녹색 A. 사이클링)에서 정량 표준(*Parvo B19 RG/TM QS 1 - 5*)을 검출. NTC: non-template control (비템플릿 대조군) (음성 대조군).

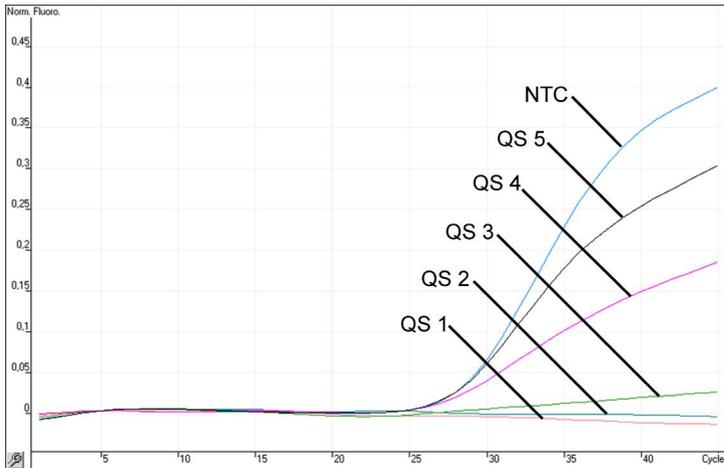


그림 10: *정량 표준(Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5)*의 동시 증폭을 통해 Cycling A. Yellow(노란색 A. 사이클링) 형광성 채널에서 *내부 대조군(IC)*을 검출. NTC: 비템플릿 대조군(음성 대조군).

11. 문제해결

형광성 채널 Cycling A. Green(녹색 A. 사이클링)의 양성

대조군(*Parvo B19 RG/TM QS 1 – 5*)에서 검출된 신호가 없습니다:

- PCR 데이터 분석에 선택된 형광성 채널이 프로토콜에 부합되지 않습니다.
 - 데이터를 분석하려면 분석 파보 바이러스 B19 PCR의 경우에는 채널 A.Green을, *내부 대조군* PCR의 경우에는 채널 A. Yellow를 선택하세요.
- *Rotor-Gene Q* 기기의 온도 프로파일 프로그래밍이 잘못되었습니다.
 - 온도 프로필을 프로토콜과 비교합니다(제 9.5 절 *Rotor-Gene Q* 기기의 *프로그래밍* 참조).
- PCR 반응의 구성이 잘못되었습니다.
 - 피펫팅 방법(제 9.4 절 *PCR 준비* 참조)을 통해 작업 단계를 점검하고 필요한 경우에 PCR을 반복합니다.
- 한 개 이상의 키트 구성품의 보관 조건이 제 2 절 *보관법*에 제공된 지침에 부합되지 않습니다. 또는 *artus Parvo B19 RG PCR Kit*의 유통기한이 만료되었습니다.
 - 시약의 보관 조건과 유통기한 날짜(키트 라벨 참조)를 확인해 보고 필요한 경우에 새 키트를 사용합니다.

형광성 채널 **Cycling A. Yellow**(노란색 A. 사이클링)에 **내부 대조균**의 신호가 약하거나 없으며, **Cycling A.Green**(녹색 A. 사이클링)에도 신호가 없습니다.

- PCR 조건이 프로토콜에 부합되지 않습니다.
 - PCR 조건(상기 참조)을 확인해 보고 필요한 경우에 설정을 수정하여 PCR 을 반복하십시오.
- PCR 이 억제되었습니다.
 - 권장되는 분리 방법(제 **9.1 절 DNA 분리 참조**)을 사용하고 제조업체의 지침을 엄격히 준수하십시오.
 - 용출 전에 DNA 분리 작업에서 권장되는 추가 원심분리 단계를 수행하여 잔류 에탄올을 제거했는지 확인하세요(제 **9.1 절 DNA 분리 참조**).
- 추출 과정 중 DNA 가 유실되었습니다.
 - 추출 과정에서 **내부 대조균**을 추가했는데 내부 대조균의 신호가 없으면 추출 과정에서 DNA 가 유실되었다는 것을 의미합니다. 권장되는 분리 방법(제 **9.1 절 DNA 분리 참조**)을 사용하고 제조업체의 지침을 엄격히 준수하십시오.
- 한 개 이상의 키트 구성품의 보관 조건이 제 **2 절 보관법**에 제공된 지침에 부합되지 않습니다. 또는 *artus Parvo B19 RG PCR Kit* 의 유통기한이 만료되었습니다.
 - 시약의 보관 조건과 유통기한 날짜(키트 라벨 참조)를 확인해 보고 필요한 경우에 새 키트를 사용합니다.

분석 PCR 의 형광성 채널 Cycling A. Green(녹색 A. 사이클링)에서 음성 대조군에 신호 발생

- PCR 준비 중에 오염이 발생했습니다.
 - 새 시약으로 복제물을 대상으로 PCR 을 반복합니다.
 - 가능하다면, 검사할 검체를 추가한 직후에 PCR 튜브를 닫습니다.
 - 마지막으로 양성 대조군 피펫팅 작업을 엄격하게 수행합니다.
 - 반드시 작업 공간과 기기의 오염을 정기적으로 제거합니다.
- 추출 과정 중 오염되었습니다.
 - 새 시약을 사용하여 검사할 검체를 다시 추출하고 PCR 합니다.
 - 반드시 작업 공간과 기기의 오염을 정기적으로 제거합니다.

다른 질문이 있거나 문제가 발생한 경우에는 당사의 기술 서비스 팀에 문의해 주세요.

12. 사양

12.1 분석 민감도

artus Parvo B19 RG PCR Kit 의 분석 민감도를 결정하기 위해 표준 희석 시리즈를 100 에서 공칭 0.03 파보 바이러스 B19 IU*/ μ l 로 설정하고 *artus Parvo B19 RG PCR Kit* 로 분석했습니다. 검사는 3 일 동안 8 개의 복제물로 수행했습니다. 결과는 프로빗 분석으로 결정되었습니다. 프로빗 분석 그래프가 그림 그림 11 에 나와 있습니다. *artus Parvo B19 RG PCR Kit* 의 분석 검출

*표준은 복제된 PCR 산물로서, 그 농도는 흡광도 및 형광 분광법으로 결정했습니다.

한계는 0.2IU/μl 입니다($p = 0.05$). 이는 0.2IU/ml 가 검출될 가능성이 95%임을 의미합니다.

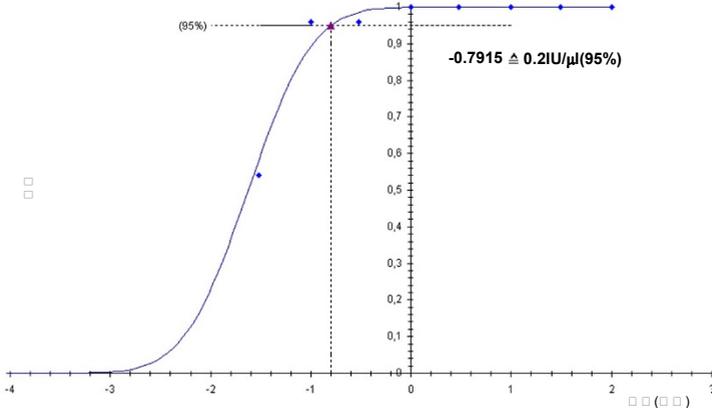


그림 11: *artus Parvo B19 RG PCR Kit*의 분석 민감도.

12.2 특이성

*artus Parvo B19 RG PCR Kit*의 특이성은 프라이머와 프로브 선택뿐만 아니라 엄격한 반응 조건 선택을 통해 가장 우선적으로 보장됩니다. 프라이머와 프로브는 유전자 은행에서 발행한 모든 서열에 대한 상동 가능성을 서열 비교 분석으로 확인했습니다. 따라서 관련 유전자형의 검출 가능성이 보장되었습니다.

특이성은 또한 6 가지의 각기 다른 파보 바이러스 B19 음성 혈청 검체로 검증했습니다. 검체는 *Parvo B19 RG/TM Master*에 포함된 B19 특정 프라이머 및 프로브에서 어떤 신호도 생성하지 않았습니다.

artus Parvo B19 RG PCR Kit의 특이성을 결정하기 위해 다음 표(표 1 참조)에 나열된 대조균을 검사하여 교차 반응성을 확인했습니다. 검사한 병원균 중 어떠한 것도 반응하지 않았습니다.

표 1: 잠재적 교차 반응성 병원균을 사용한 키트 특이성 검사

대조균	파보 바이러스 B19 (Cycling A.Green) (녹색 A. 사이클링)	내부 대조균 (Cycling A.Yellow) (노란색 A. 사이클링)
사람 헤르페스 바이러스 1 (단순 헤르페스 바이러스 1)	-	+
사람 헤르페스 바이러스 2 (단순 헤르페스 바이러스 2)	-	+
사람 헤르페스 바이러스 3 (수두 대상포진 바이러스)	-	+
사람 헤르페스 바이러스 5 (거대세포 바이러스)	-	+
사람 T 세포 백혈병 바이러스 1	-	+
사람 T 세포 백혈병 바이러스 2	-	+

12.3 정밀도

artus Parvo B19 RG PCR Kit의 정밀도 데이터로는 분석의 충분산을 결정할 수 있습니다. 충분산은 **분석항목 내 변산도**(한 실험에서 동일한 농도의 검체들로 얻은 여러 결과의 변산도), **분석항목 간 변산도**(한 검사실에서 각기 다른 실험자가 동일한 유형의 각기 다른 기구로 수행하여 생성된 분석항목으로 얻은 여러 결과의 변산도), **배치 간 변산도**(다양한 배치를 사용한 분석항목으로 얻은

여러 결과의 변산도)로 구성됩니다. 획득한 데이터를 사용하여 병원균 특이 PCR 및 내부 대조군 PCR 에 대한 표준 편차, 분산, 변동 계수를 측정했습니다.

artus Parvo B19 RG PCR Kit 의 정밀도 데이터는 최저 농도(QS 5; 10IU/μl)의 정량 표준을 사용하여 수집했습니다. 검사는 8 개의 복제물로 수행했습니다. 정밀도 데이터는 증폭 곡선의 Ct 값을 토대로 계산했습니다(Ct: 사이클 임계값, 표 2 참조). 또한, 정량 결과의 정밀도 데이터(IU/μl)는 해당 Ct 값을 사용하여 결정했습니다(표 3 참조). 이러한 결과를 바탕으로 할 때, 언급된 농도의 모든 특정 검체가 생성하는 전체 통계 분포는 1.66%(Ct) 또는 17.65%(농도)이며, 내부 대조군 검출의 경우에는 0.90%(Ct)입니다. 이 값들은 측정된 변산도에 대한 모든 단일 값들의 총계를 토대로 합니다.

표 2: Ct 값을 토대로 한 정밀도 데이터

	표준 편차	분산	변동 계수[%]
분석항목 내 변산도: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0.22	0.05	0.75
분석항목 내 변산도: <i>내부 대조군</i>	0.18	0.03	0.80
분석항목 간 변산도: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0.32	0.10	1.11
분석항목 간 변산도: <i>내부 대조군</i>	0.19	0.03	0.84
배치 간 변산도: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0.38	0.14	1.47
배치 간 변산도: <i>내부 대조군</i>	0.21	0.04	0.92
총분산:	0.48	0.23	1.66

<i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>			
총분산: 내부 대조군	0.20	0.04	0.90

표 3: 정량 결과에 기초한 정밀도 데이터(1IU/μl)

	표준 편차	분산	변동 계수[%]
분석항목 내 변산도: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0.96	0.93	9.58
분석항목 간 변산도: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	1.33	1.78	13.22
배치 간 변산도: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	2.27	5.17	22.20
총분산: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	1.79	3.21	17.65

12.4 완전성

완전성 검증으로는 *artus artus Parvo B19 RG PCR Kit*의 총 실패율을 결정할 수 있습니다. 혈청의 30 파보 바이러스 B19 음성 검체에 파보 바이러스 B19 대조군 DNA의 1IU/μl 용출 용적(분석 민감도 한계의 5 배 농도)을 혼합했습니다. QIAamp DNA Mini Kit(제 9.1 절 DNA 분리 참조)를 사용하여 추출한 후에 이 검체를 *artus Parvo B19 RG PCR Kit*로 분석했습니다. 모든 파보 바이러스 B19 검체에서 실패율이 0%였습니다. 이와 더불어 파보 바이러스 B19 음성 혈청 검체 30 개의 정제 및 분석을 통해 내부 대조군의 완전성을 평가했습니다. 총 실패율은 0%였습니다. 역제는 관찰되지 않았습니다. 따라서 *artus Parvo B19 RG PCR Kit*의 완전성은 ≥99%입니다.

12.5 재현성

재현성 데이터는 *artus Parvo B19 RG PCR Kit* 의 정기 성능 평가와 더불어 다른 제품과의 효율성 비교도 허용합니다. 이러한 데이터는 확립된 능숙도 프로그램에 참여하여 확보합니다.

13. 제품 사용 상의 제한

- 모든 시약은 시험관 내 진단용으로만 사용할 수 있습니다.
- 본 제품은 시험관 내 진단 절차에 대해 특별히 교육받고 훈련받은 사람이 사용해야 합니다.
- 최적의 PCR 결과를 얻기 위해 사용자 설명서를 엄격하게 준수해야 합니다.
- 모든 구성품의 포장 상자와 라벨에 인쇄되어 있는 유통기한 날짜에 주의를 기울여야 합니다. 유통기한이 만료된 구성품은 사용하지 마십시오.
- 유전자형 3 에 관련되는 일부 서열의 경우에는 라벨 표시 효능을 보장할 수 없습니다. 프라이머/프로브 결합 부위의 돌연변이로 인해 민감도가 상당히 떨어질 수 있습니다(Baylis and Buchheit, 2009).
- 드물지만, 키트의 프라이머 및/또는 프로브에 가려져 있는 바이러스 유전체의 고도 보존 부위 내 돌연변이로 인해 보유 바이러스가 정량 미만이거나 바이러스 보유 여부를 감지하지 못할 수 있습니다. 분석항목 설계의 타당성과 성능은 주기적으로 개정됩니다.

14. 경고 및 예방조치

화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용합니다. 자세한 정보는 적절한 안전 보건 자료(safety data sheets, SDS)를 참조하십시오. 안전 보건 자료는 www.qiagen.com/safety에서 편리하고 용량이 작은 온라인 PDF 형식으로 사용할 수 있으며 여기에서 각 QIAGEN® 키트 및 키트 구성품에 대한 SDS를 찾아서 보고 인쇄할 수 있습니다.

검체 및 분석항목 폐기물은 현지 안전 규정에 따라 폐기합니다.

15. 정도 관리

QIAGEN ISO 인증 품질 관리 시스템에 따라, *artus Parvo B19 RG PCR Kit*의 각 로트는 제품 품질의 일관성을 보장하기 위해 사전 결정된 사양에 대해 검사됩니다.

16. 참고 문헌

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. 기호 설명

	사용 기한
	배치 코드
	제조업체
	카탈로그 번호
	재료 번호
	안내서
	시험관 내 진단용 의료 기구
	구성품
	용기
	수
	국제 거래 단위 번호
	<N>회 검사에 충분한 양을 포함
	온도 제한
	사용 지침 참조
QS	정량 표준
IC	내부 대조군

artus Parvo B19 RG PCR Kit

상표 및 권리 포기

QIAGEN®, QIAamp®, artus®, Rotor-Gene®, UltraSens® (QIAGEN Group).

문서 개정 이력	
R4 06/2018	이 자료는 artus Parvo RG PCR Kit의 안내서 제 4 개정판입니다. 이전 버전에서 개정된 사항은 용도 규정의 추가, 진단 평가 절의 삭제, 36 웰 로터 및 0.2ml 튜브 규정의 삭제, Rotor-Gene Q 기기와 소프트웨어 설명을 현재 제공되는 버전에 맞게 업데이트한 내용 등입니다.

이 문서에 사용된 등록된 이름, 상표 등은 별도로 표시되지 않은 경우에도 법적 보호를 받는 것으로 간주됩니다.

artus Parvo B19 RG PCR Kit는 유럽 시험관 내 진단 지침 98/79/유럽 공동체에 따라 CE 마크 인증을 받은 진단 키트입니다. 모든 국가에서 사용 가능하지 않습니다.

최신 라이선스 정보 및 제품별 면책 사항은 각 QIAGEN 키트 안내서 또는 사용자 설명서를 참조하십시오. QIAGEN 키트 안내서와 사용자 설명서는 www.qiagen.com에서 확인하거나 QIAGEN 기술 서비스 또는 현지 배포자가 요청할 수 있습니다.

이 제품은 사람을 대상으로 한 시험관 내 진단을 위한 진단 서비스의 성능에 이 제품을 사용할 구매자가 구매할 수 있습니다. 이로써 구매 시 이 특정 사용 권한 외에는 어떠한 일반 특허 또는 다른 종류의 라이선스도 부여되지 않습니다.

한정 라이선스 계약

본 제품을 사용함으로써 artus Parvo B19 RG PCR Kit에 대한 모든 제품 구입자 또는 제품 사용자의 협약을 준수합니다.

1. artus Parvo B19 RG PCR Kit는 artus Parvo B19 RG PCR Kit *안내서*에 따라서만 그리고 키트의 구성품으로만 사용할 수 있습니다. QIAGEN은 artus Parvo B19 RG PCR Kit *안내서*와 www.qiagen.com의 추가 프로토콜에 명시된 경우를 제외하고는, 소유하고 있는 그 지적 재산권에 따라 본 키트에 동봉된 구성품을 본 키트에 포함되지 않은 구성품과 함께 사용하거나 이에 통합할 수 있는 어떤 라이선스도 허가하지 않습니다.
2. 명시적으로 설명한 라이선스 이외에 QIAGEN은 본 키트 및/또는 본 키트의 사용이 제 3자의 권한을 침해하지 않음을 보증하지 않습니다.
3. 본 키트 및 해당 구성품은 1 회용으로 라이선스가 부여되며 재사용, 재정비 또는 재판매할 수 없습니다.
4. QIAGEN은 명시적으로 설명한 경우 이외에 명시 또는 암시한 다른 라이선스는 명확히 부인합니다.
5. 키트 구입자 및 사용자는 위에서 금한 행위를 유도하거나 촉진할 수 있는 단계를 취하거나 이를 허용하지 않는 데 동의합니다. QIAGEN은 모든 법정에서 이와 같은 제한된 라이선스 협약의 금지를 시행할 수 있으며, 키트 및/또는 해당 구성요소에 관련하여 본 제한된 라이선스 협약 또는 지적 재산권을 시행하기 위한 어떤 행동에서든 변호사 비용을 포함하여 조사 및 법정 비용을 회수할 수 있습니다.

라이선스 조항의 업데이트에 대해서는 www.qiagen.com을 참조합니다.

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 KO-KR



Sample & Assay Technologies