راهنمای کیت

Parvovirus B19 RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۰

جهت تشخیص و کمیت سنجی DNA پارووویروس B19

به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

24 (Cat# ParvoRQ24)

48 (Cat# ParvoRQ48)

96 (Cat# ParvoRQ96)

NG-WI-ASL-55-100

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه..... ۳
۲. حیطه کاربرد..... ۳
۳. اطلاعات زمینه ای..... ۳
۴. اساس آزمایش..... ۴
۵. محتویات کیت..... ۴
۶. مدل های بسته بندی..... ۵
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت..... ۵
۸. محدودیت کاربرد..... ۵
۹. سایر موارد مورد نیاز..... ۶
۱۰. احتیاط و نکات لازم..... ۶
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن..... ۷
۱۲. عوامل مزاحم..... ۷
۱۳. کنترل داخلی..... ۸
۱۴. استخراج DNA..... ۹
۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش..... ۹
۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها..... ۱۰
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۱۰
۱۸. تنظیم دستگاه StepOne..... ۱۲
۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۱۲

۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene ۱۳
۲۱. آنالیز نتایج StepOne ۱۴
۲۲. محاسبه تیتر ویروس ۱۷
۲۳. محدوده خطی ۱۷
۲۴. میزان حساسیت ۱۸
۲۵. روش امحاء ۱۸
۲۶. پشتیبانی فنی ۱۸
۲۷. اطلاعات تماس ۱۸
۲۸. منابع ۱۹
۲۹. توضیحات برچسب ۱۹

۱. مقدمه

کیت Parvovirus B19 RQ جهت تشخیص و کمیت سنجی DNA ویروس Parvovirus B19 به روش Real-time PCR طراحی شده است. در این روش، DNA به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس این کیت حاوی سری ثانویه‌ای از پرایمرها و پروب جهت شناسایی یک توالی سنتتیک به عنوان کنترل داخلی می‌باشد. کنترل داخلی از گزارش منفی کاذب ناشی از استخراج نامناسب و یا مهار PCR جلوگیری می‌کند. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

۲. حیطه کاربرد

کیت Parvovirus B19 RQ امکان بررسی نمونه بیمار را جهت تشخیص و کمیت سنجی DNA ویروس Parvovirus B19 با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

پارووویروس (Parvovirus B19) ویروسی از خانواده پارووویریده (parvoviridae) با ژنومی متشکل از DNA تک رشته‌ای، دارای کپسید و فاقد پوشش است. این ویروس عامل اریتم عفونی (Erythema infectiosum) یا بیماری پنجم (Fifth Disease) می‌باشد. این بیماری بیشتر در کودکان شایع است و معمولا علایم خفیفی مانند بثورات پوستی روی گونه ها دارد. انتقال ویروس عمدتا از طریق قطرات تنفسی است و همچنین در دوران بارداری نیز از طریق جفت به جنین منتقل می‌شود. از آنجایی که عفونت در زمان بارداری می‌تواند منجر به بروز مشکلات جدی برای

جنین و حتی سقط آن شود، تشخیص آن در زنان باردار دارای اهمیت زیادی است.

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی عامل عفونی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می‌شود. طی این واکنش بخشی از ژنوم عامل عفونی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می‌شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب‌های فلورسنت قابل تشخیص می‌گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می‌توان وجود عامل عفونی را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش‌هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز برطرف می‌شود.

۵. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک فلش کارت و مواد زیر می‌باشد:

برچسب	محتوا	حجم
PV-B19 Mix	میکس آماده برای PCR*	۳۶۰ میکرولیتر
PV1	استاندارد ۱: صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
PV2	استاندارد ۲: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
PV3	استاندارد ۳: یک هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
PV4	استاندارد ۴: صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
PV5	استاندارد ۵: ده کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
Internal Ctrl	کنترل داخلی	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* ۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست وچهار، چهل و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می باشد.

۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰- درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه‌ای و آموزش‌دیده طراحی شده است.
- تمامی مراحل کار بایستی مطابق دفترچه راهنمای کامل کیت انجام شود و هرگونه تغییری در آن منجر به بروز خطا در نتایج می‌گردد.
- از محتویات کیت نباید پس از گذشت تاریخ انقضای درج شده روی کیت استفاده نمود.
- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرار گیرد.
- این کیت تنها برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده و برای تشخیص طبی (IVD) مورد تایید نمی‌باشد.

۹. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۱۰. احتیاط و نکات لازم

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می‌باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود را، به ویژه سمپلر، داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.

- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- پیش از باز کردن درپوش لوله های درون کیت، آن‌ها را کاملاً ذوب نموده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن‌ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ‌های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش با این کیت، پلاسمای خون محیطی (peripheral blood) یا سرم می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می‌تواند EDTA یا سیترات باشد.

نمونه در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد برای ۴۸ ساعت قابل نگهداری است و برای زمان های طولانی تر می‌باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر یا پائین تر نگهداری شود. در چنین شرایطی نمونه تا چندین هفته پایدار بوده و تیتر ویروس در آن ثابت می‌ماند.

حداقل نمونه توصیه شده برای آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما یا سرم می‌باشد که نیازمند نیم میلی‌لیتر خون کامل می باشد.

۱۲. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می‌شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود.

همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی‌باشد. مقادیر بالای بیلی‌روبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی‌کند.

۱۳. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، این کیت حاوی کنترل داخلی می‌باشد.

کنترل داخلی را می‌توانید در مرحله استخراج استفاده نموده یا آن را صرفاً در مرحله PCR به PV-B19 Mix اضافه نمایید. در حالت اول، کنترل داخلی علاوه بر بررسی مهار واکنش، نشانگر کیفیت استخراج نیز می‌باشد. برای استفاده در مرحله استخراج، کنترل داخلی را پس از افزودن بافر lysis به نمونه، اضافه کنید. میزان مورد نیاز از کنترل داخلی ده درصد حجم حلال نهایی (elution buffer) می‌باشد. یعنی در صورتی که DNA را نهایتاً در ۱۰۰ میکرولیتر بافر حل می‌کنید، ۱۰ میکرولیتر از کنترل داخلی را به مخلوط نمونه و بافر Lysis اضافه نمایید. توجه داشته باشید که کنترل داخلی نباید مستقیماً به نمونه بیمار (یعنی پیش از افزودن بافر lysis) اضافه شود، زیرا کارآیی خود را از دست خواهد داد.

در صورتی که کنترل داخلی را به PV-B19 Mix اضافه می‌نمایید، تنها می‌توانید مهار واکنش PCR را بررسی کنید. به این منظور به ازای هر واکنش PCR، یک میکرولیتر از کنترل داخلی را به PV-B19 Mix اضافه نمایید. به طور مثال برای ۱۰ واکنش به ۱۵۰ میکرولیتر از میکس، ۱۰ میکرولیتر کنترل داخلی اضافه کنید و مخلوط حاصل را مطابق توضیحات بخش ۱۵ استفاده نمایید.

در صورت موفق بودن استخراج و واکنش PCR، کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۸ تا ۳۲ در دستگاه Rotor-

Gene و ۲۸ تا ۳۴ در دستگاه StepOne می‌شود.

۱۴. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه از روش‌ها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. استفاده از کیت های زیر را توصیه می‌شود:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat# 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampUltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آن‌ها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، پنج لوله برای استانداردها و یک لوله برای کنترل منفی (آب) نیز در نظر بگیرید.

در صورتی که کنترل داخلی را در حین استخراج وارد کرده اید، به هر لوله مستقیماً ۱۵ میکرولیتر از PV-B19 Mix اضافه کنید.

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به PV-B19 Mix اضافه نمایید، مطابق توضیحات بخش ۱۳ کنترل داخلی را به میکس افزوده و ۱۵ میکرولیتر از مخلوط حاصل را به هر لوله منتقل کنید.

در پایان ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده، استاندارد یا آب به هر لوله اضافه کنید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه *StepOne* لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت Parvovirus B19 RQ جهت کار با دستگاه‌های Rotor-Gene و StepOne و MIC طراحی شده است.

۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

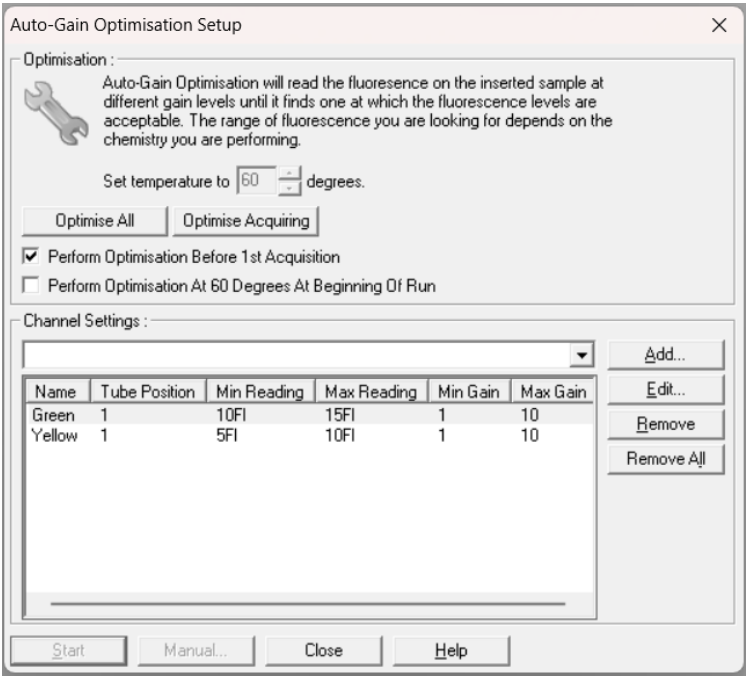
فایل تمپلیت Parvovirus B19 را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل PV-B19 0.1 یا PV-B19 0.2 را با توجه به نوع لوله استفاده شده انتخاب کنید.

نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منوی نرم افزار، گزینه View، سپس Gain Optimisation را انتخاب کنید.

در پنجره باز شده در Auto-Gain Optimisation Setup ابتدا گزینه Optimise Acquiring را بزنید. تنظیمات را دقیقا مطابق تصویر صفحه بعد برای هر دو کانال انجام دهید. Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید

تیوب شماره یک باید حاوی میکس Parvovirus باشد).

گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید.



سپس در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود. در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای استانداردها standard را انتخاب کنید. سپس غلظت استانداردها را در ستون سمت راست با عنوان given concentration وارد کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۸. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل فلش کارت همراه کیت را انتخاب کنید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت).
از منوی سمت چپ Plate Setup سپس دکمه Assign Targets and samples را انتخاب کنید. استانداردها و کنترل منفی به همراه چند نمونه از پیش تعریف شده اند. آن‌ها را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این‌کار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می‌توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز می‌توانید اضافه کنید و نام نمونه ها را مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۹. تنظیم سایر دستگاه‌ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه‌های Real-Time PCR استفاده می‌کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود. PV-B19 Mix موجود در کیت حاوی ROX می‌باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. سپس آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. سپس در منوی Analysis مجددا Quantitation و سپس Yellow را کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید.

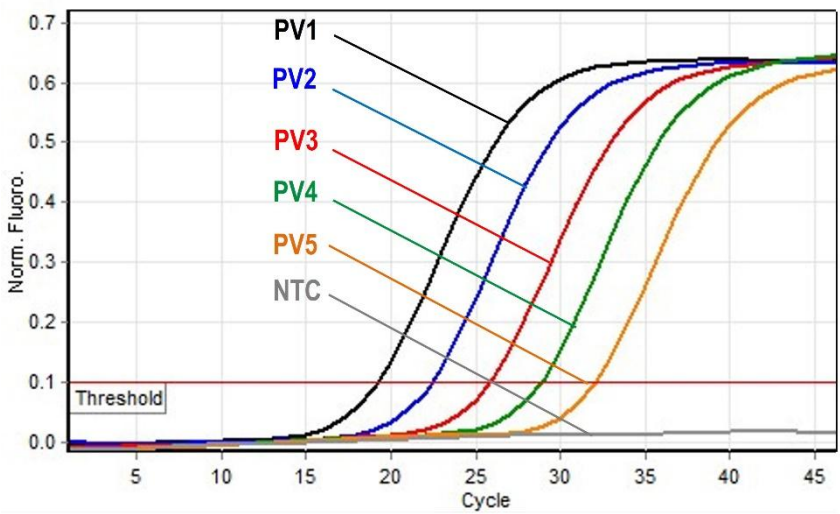
برای مشاهده نمودار مورد انتظار استانداردهای مثبت و کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.

توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **Parvovirus-B19** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **کنترل داخلی** می‌باشد.

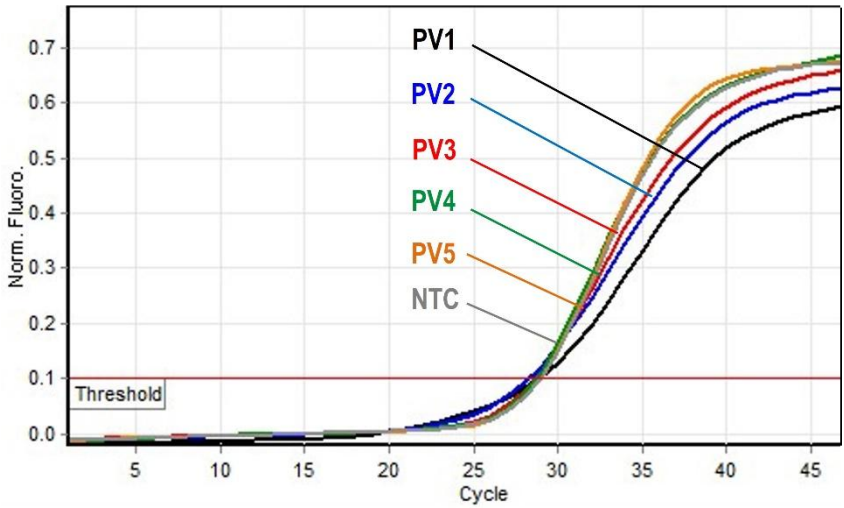
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می‌شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می‌باشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد می‌توان آن را **مثبت** تلقی نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال سبز منفی باشد ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۲ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.



شکل ۱. منحنی استانداردهای PV-B19 در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه روتورژن

۲۱. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. آستانه (threshold) را برای PV-B19/FAM روی ۰/۱ و برای IC/VIC روی ۰/۰۵ قرار دهید.

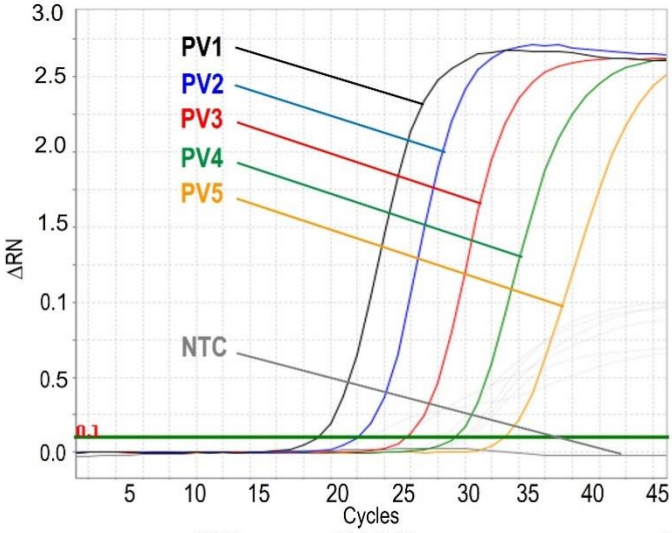
برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی وکنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.

توجه داشته باشید که افزایش **تابش PV-B19/FAM** مربوط به **Parvovirus-B19** و افزایش **تابش IC/VIC** حاصل از **کنترل داخلی** می‌باشد.

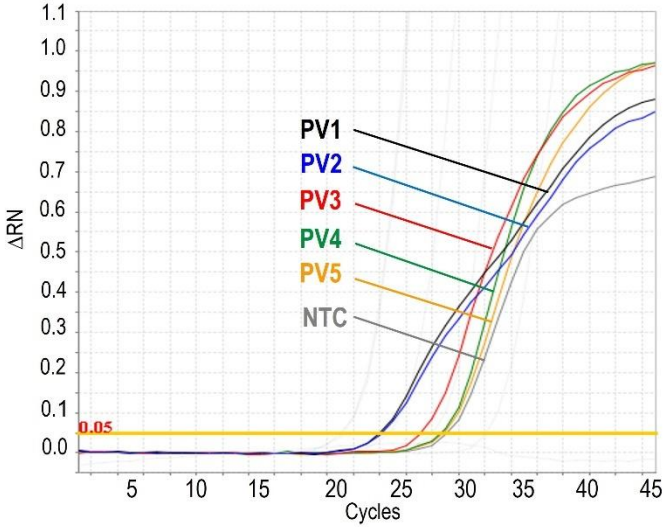
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب میشود و CT آن در صورت وجود فاقد ارزش می‌باشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال PV-B19/FAM مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال IC/VIC می‌توان آن را **مثبت** تلقی نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال PV-B19/FAM منفی باشد ولی در کانال IC/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۴ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال PV-B19/FAM و IC/VIC منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.



شکل ۳. منحنی استانداردهای PV-B19 در کانال FAM دستگاه استپ وان



شکل ۴. منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه استپ وان

خلاصه تفسیر نتایج آزمایش را می‌توانید در جدول زیر مشاهده نمایید.

Green	Yellow	Result
+	+/-	Positive
-	+	Negative
-	-	Inconclusive

۲۲. محاسبه تیتر ویروس

هر کیت حاوی پنج استاندارد با غلظت مشخص می‌باشد که با استفاده از آنها منحنی استاندارد رسم شده و تیتر ویروس در نمونه بیمار معین می‌شود. استانداردهای کیت با واحد کپی در میکرولیتر مشخص شده اند. برای تبدیل نتایج به صورت کپی در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result(copy/ml)} = \frac{\text{Result (copy/µl)} \times \text{elution volume (µl)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

به طور مثال چنانچه ۲۰۰ میکرولیتر نمونه استخراج و DNA حاصل در ۵۰ میکرولیتر بافر حل شود، نتایج باید در عدد ۲۵۰ ضرب شوند تا به کپی در میلی لیتر (copy/ml) تبدیل شوند.

۲۳. محدوده خطی

محدوده خطی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده و شامل بازه ده میلیون کپی در میکرولیتر تا ده کپی در میکرولیتر می‌باشد.

۲۴. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده است و معادل چهار کپی در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتر ویروس در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیتر نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

۲۵. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیک یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیما به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه های عفونی آزمایشگاه را در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

۲۶. پشتیبانی فنی

برای ارتباط با بخش پشتیبانی فنی می توانید با شماره تلفن و یا آدرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۷. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

آدرس: تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com
وبسایت: www.novingene.com

۲۸. منابع

- Bale Jr, J.F., 2014. Measles, mumps, rubella, and human parvovirus B19 infections and neurologic disease. Handbook of clinical neurology, 121, pp.1345-1353.
- Kerr, J.R., 2006. Parvoviruses. London: Hodder Arnold ; New York.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Rogo, L.D., Mokhtari-Azad, T., Kabir, M.H. and Rezaei, F., 2014. Human parvovirus B19: a review. Acta Virol, 58(3), pp.199-213.
- Ugai, S., Aizawa, Y., Kanayama, T. and Saitoh, A., 2018. Parvovirus B19: a cause of sepsis like syndrome in an infant. Pediatrics, 141(6).

۲۹. توضیحات برچسب

RUO	جهت مصارف پژوهشی		تولید کننده		دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید
LOT	کدبهر (شماره بچ)	Σ	تعداد <n> آزمون کافی		تاریخ انقضاء
REF	شماره کاتالوگ	SN	شماره سریال	-10°C -30°C	محدوده دمایی

برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.com مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

Parvovirus B19
RQ Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.0

For Real-Time PCR Detection and Quantitation of Parvovirus B19
For Research Use Only

Σ 24 (Cat# ParvoRQ24)
Σ 48 (Cat# ParvoRQ48)
Σ 96 (Cat# ParvoRQ96)
NG-WI-ASL-55-100

RUO

NovinGene ParsVira
No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Novin Gene

Table of Contents

1. Introduction 3
2. Intended Use 3
3. Background Information 3
4. Test Principle 4
5. Kit Contents 4
6. Packaging models 4
7. Storage and Stability 5
8. Product Use Limitations 5
9. Additionally Required Materials 5
10. General Precautions 6
11. Specimen, Storage and Transport 6
12. Interfering Substances 7
13. Internal Control (IC) 7
14. DNA Isolation 8
15. PCR Protocol 8
16. Devices and software 9
17. Programming Rotor-Gene 9
18. Programming StepOne 10
19. Programming Other Machines 11

20. Data Analysis: Rotor-Gene 11
21. Data Analysis: StepOne 14
22. Quantitation 16
23. Linear Range 16
24. Sensitivity 17
25. Disposal Method 17
26. Technical Support 17
27. Contact Information 17
28. References 17
29. Symbols 18

1. Introduction

Parvovirus B19 RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting and quantifying Parvovirus B19 DNA. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit. This Mix also contains a different series of primers and probe for detecting a synthetic DNA sequence. The kit supplies this synthetic DNA sequence as an Internal Control (IC). The IC can be used either during DNA extraction or in the PCR reaction to prevent false negative results due to failure in the above steps.
This kit is intended for Research Use Only!

2. Intended Use

Parvovirus B19 RQ kit is intended for detecting and quantifying Parvovirus B19 virus DNA. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene, StepOne and MIC machines.

3. Background Information

Parvovirus B19 is a member of Parvoviridae family with a non-enveloped icosahedral capsid and single-stranded DNA genome. This virus causes Erythema infectious or Fifth Disease, which is more common in children and usually has mild symptoms like mild rash on the cheeks. The main transmission route is through respiratory droplets while, it is also transmitted to the fetus during pregnancy. Since fetal infection can lead to serious consequences including fetal loss, early diagnosis during pregnancy is important.

4. Test Principle

The pathogen is detected using PCR, where primers specific to the target genome amplify its unique sequence. Real-Time PCR facilitates the detection of the amplified product through fluorescent-labeled probes. Therefore, monitoring fluorescence provides a means for detecting the target without requiring post-amplification analysis. This eliminates the possibility of PCR product contamination.

5. Kit Contents

The kit contains a manual, a flash card and the following reagents:

Label	Content	Quantity
PV-B19 Mix	PCR mix*	360 µl
PV1	Standard 1: 100,000 copies/µl	150 µl
PV2	Standard 2: 10,000 copies/µl	150 µl
PV3	Standard 3: 1,000 copies/µl	150 µl
PV4	Standard 4: 100 copies/µl	150 µl
PV5	Standard 5: 10 copies/µl	150 µl
Internal Ctrl	Internal control	250 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits, respectively.

6. Packaging models

The kit is available in 24, 48, and 96 reactions of 25 microliters.

7. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiration date mentioned. Avoid repeated freeze-thaw more than three times to prevent reduced sensitivity.

8. Product Use Limitations

- This kit is intended to be used only by specially instructed and trained personnel.
- The user manual should be strictly followed, and any modification will invalidate the results.
- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.
- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.
- This kit is for Research use only and is not validated for IVD (in vitro diagnostics) applications.

9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

10. General Precautions

To prevent false results, always pay attention to the following points:

- Treat all samples as potentially infectious.
- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the master-mix is aliquoted into tubes, and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

11. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood plasma or serum should be collected in sterile condition in proper and sterile containers. Samples can be stored at +4°C for 48 hours or stored at -20°C for up to a few weeks. The minimum sample volume recommended for testing is 200µl of plasma/serum, which requires 0.5ml of whole blood.

12. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes and samples of heparinized patients must not be used.
Elevated levels of bilirubin (≤4.5 mg/dl) and lipids (≤1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

13. Internal Control (IC)

To assess the possibility of DNA extraction failure and PCR inhibition, and to prevent false negative results, the Parvovirus B19 RQ kit contains an internal control (IC). This IC can be used during the extraction process or added directly to the PV-B19 Mix.
To monitor both DNA extraction and PCR reaction, the IC should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample during extraction. The required volume of IC is 10% of the elution buffer. For instance, if the extracted DNA is eluted with 100ul, then 10ul of IC should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample.
Please note that the IC should not be added directly to the patient sample (i.e, before the addition of lysis buffer) as it loses its efficiency.
If IC is added to PV-B19 Mix, only PCR inhibition can be monitored. For this purpose, 1ul of the IC reagent should be added to each reaction. For example, for 10 PCR reactions, 10ul of the Internal control should be added to 150ul of PV-B19 Mix before it is added to the tubes.
In a successful DNA extraction and PCR test, the Internal Control should generate a CT of 28-32 in the Yellow Channel of Rotor-Gene and 28-34 in the VIC Channel of StepOne.

14. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend the following:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat. no. 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampUltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

15. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely, followed by a brief mixing and a quick spin. Place the required number of tubes on a cold block. Consider one tube for each sample plus one for each standard and one for the negative control.

If the IC is introduced during the extraction process, pipette 15µl of PV-B19 Mix to each PCR tube.

If the IC is added to the PV-B19 Mix, add 15ul of the prepared mix (as described in section 13) to each PCR tube.

Then add 10ul of extracted DNA, standard, or water to each tube.

Cap the tubes and visually inspect to ensure all are capped securely. Place the tubes in the machine.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

16. Devices and software

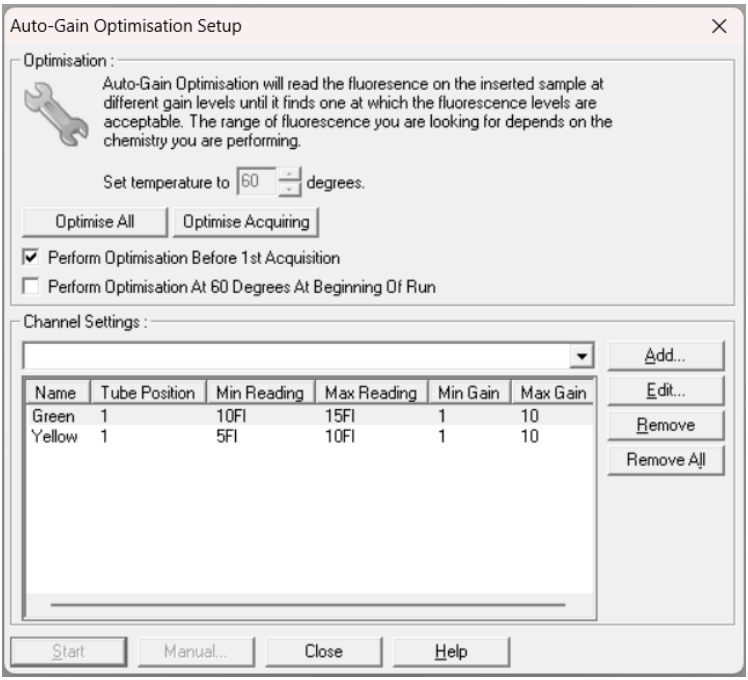
Parvovirus B19 RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

17. Programming Rotor-Gene

Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the Parvovirus template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); PV-B19 0.1 is for strip tubes and PV-B19 0.2 is for 0.2ml tubes. Program starts.

Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the below image. Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain Parvovirus Mix).



Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the program on the desired location.

18. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set-Up menu, click Template (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). Click on Plate Setup. Five standards, one negative control and a few samples are defined. You may change plate setup using right-click options (copy, paste, clear). You may also add/remove samples or change sample names on “Define Targets and

Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment on desired location. The instrument will start shortly.

19. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC dyes. The PV-B19 Mix contains ROX. Final concentration of ROX in reaction is 300nM.

20. Data Analysis: Rotor-Gene

To analyze data briefly, click on the Analysis menu, and then under the Quantitation tab double click on Cycling A. Green. Manually put threshold at 0.1. Repeat the above for the Yellow Channel. Patient samples should be defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively. Figures 1 and 2 represent typical graphs for the Rotor-Gene machine.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in the Green channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40.
- A sample is **Negative** if it is negative in the Green channel while it is positive in the Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 28-32.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both the Green and Yellow channels.

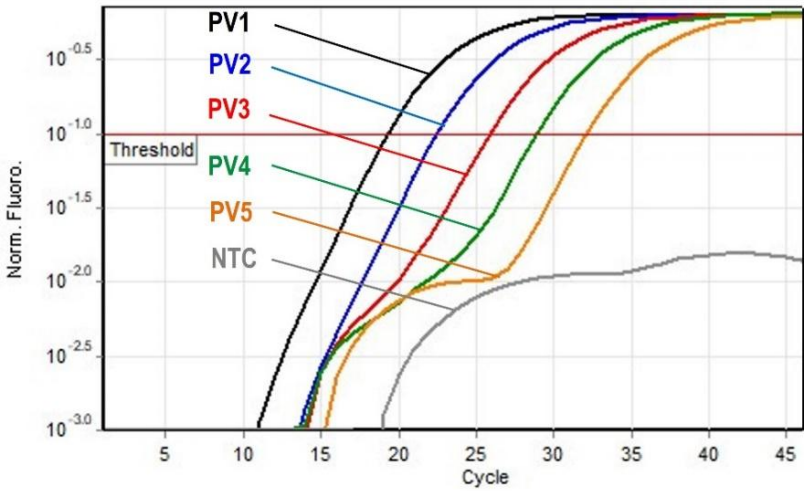


Fig 1. Typical PV-B19 graph in Green channel for Rotor-Gene

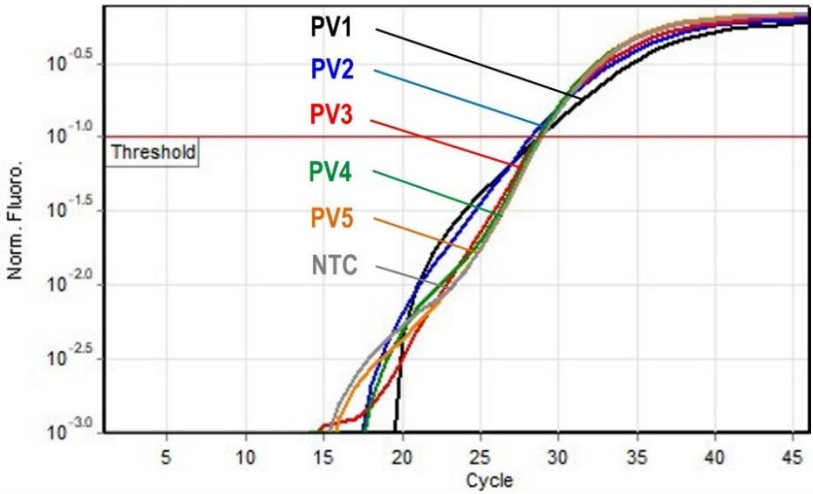


Fig 2. Typical IC graph in Yellow channel for Rotor-Gene

21. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to StepOne manual. Briefly, click on Analyze and set the threshold for PV-B19/FAM at 0.1 and IC/VIC at 0.05. Figures 3 and 4 represent typical graphs for the StepOne machine.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.

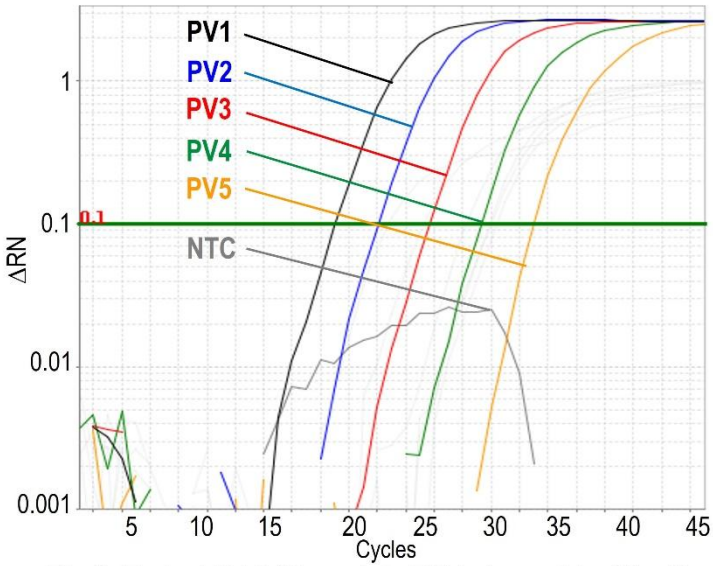


Fig 3. Typical PV-B19 graph in FAM channel for StepOne

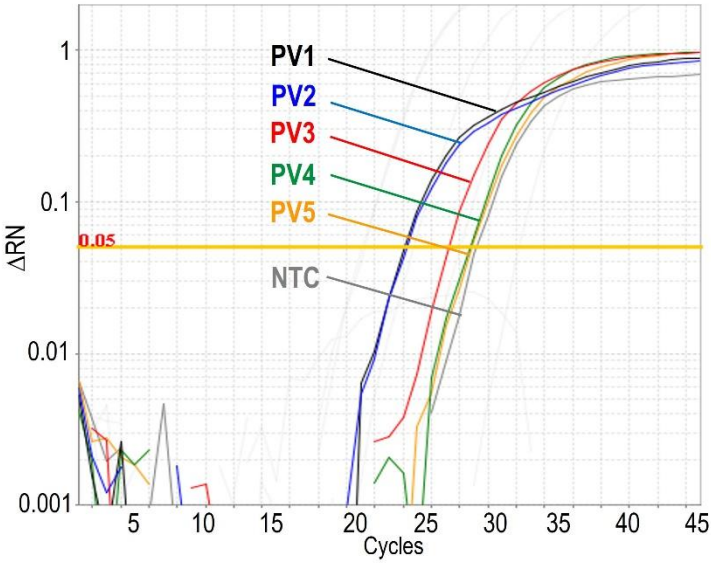


Fig 4. Typical IC graph in VIC channel for StepOne

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in the FAM/Parvovirus B19 channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40.
- A sample is **Negative** if it is negative in the FAM/Parvovirus B19 channel while it is positive in the VIC/IC channel with a sigmoid graph and CT of 28-34.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both the FAM/Parvovirus B19 and VIC/IC channels.

The interpretation of the results is summarized in the following table.

Green	Yellow	Result
+	+/-	Positive
-	+	Negative
-	-	Inconclusive

22. Quantitation

The kit provides five quantitation standards with defined titers to generate a standard curve for the quantification of samples, viral load. Working with Rotor-Gene machine, the standard curve from a previous run can also be imported for quantification of samples to the recent run. To do so, at least one standard must be used in the current run. Apparently, using all five standards in each run will lead to more accurate results.
Quantitation standards are defined as copy/µl. To convert the result to copy/ml following equation should be used:

$$\text{Result (copy/ml)} = \frac{\text{Result (copy/µl)} \times \text{elution volume (µl)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

“Sample volume” is the sample volume used for DNA isolation and “Elution volume” is the volume of buffer or water used to elute or dissolve isolated DNA.

23. Linear Range

The linear range of the kit was assessed with dilution series of the cloned target, and showed to be linear in the range of 10,000,000 copies/µl to 10 copies/µl.

24. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with a dilution series of the cloned target and showed a limit of detection equal to 4 copies/µl.

25. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special treatment before disposal and can be directly discarded. Infectious specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

26. Technical Support

For technical support, contact us via
Phone +98 993-6223241
Email: info@novingene.com

27. Contact Information

NovinGene ParsVira
Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.
Tel: +98 21 88837393
+98-990 1813124
Email: info@novingene.com
Website: www.novingene.com

28. References

- Bale Jr, J.F., 2014. Measles, mumps, rubella, and human parvovirus B19 infections and neurologic disease. Handbook of clinical neurology, 121, pp.1345-1353.

- Kerr, J.R., 2006. Parvoviruses. London: Hodder Arnold ; New York.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Rogo, L.D., Mokhtari-Azad, T., Kabir, M.H. and Rezaei, F., 2014. Human parvovirus B19: a review. Acta Virol, 58(3), pp.199-213.
- Ugai, S., Aizawa, Y., Kanayama, T. and Saitoh, A., 2018. Parvovirus B19: a cause of sepsis like syndrome in an infant. Pediatrics, 141(6).

29. Symbols

RUO	Research use only		Manufacturer		Consult instructions for use
LOT	Lot number	Σ	Content sufficient for <n> tests		Use-by date
REF	Catalogue number	SN	Serial number	-10°C -30°C	Temperature limit

For more information and resources please visit our website; www.novingene.com