راهنمای کیت

Nocardia RG

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۰

جهت تشخیص DNA باکتری Nocardia

به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene و MIC

مخصوص تحقیقات

24 (Cat# NocardiaRG24)

48 (Cat# NocardiaRG48)

96 (Cat# NocardiaRG96)

NG-WI-ASL-68-100

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..... ۵
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 ۸
۱۳. کنترل داخلی..... ۸
۱۴. استخراج DNA..... ۹
۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش..... ۱۰
۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها..... ۱۰
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۱۱
۱۸. آنالیز نتایج Rotor-Gene..... ۱۳
۱۹. میزان حساسیت..... ۱۵
۲۰. روش امحاء..... ۱۶

۲۱. پشتیبانی فنی..... ۱۶
۲۲. اطلاعات تماس..... ۱۶
۲۳. منابع..... ۱۷
۲۴. توضیحات برچسب..... ۱۷

۱. مقدمه

کیت Nocardia RG جهت تشخیص DNA باکتری Nocardia 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 Nocardia RG امکان بررسی نمونه بیمار را جهت تشخیص یازده گونه نوکاردیا *N. asteroids, N. cyriacigeorgica ,N. nova, N. brasiliensis,. N. pseudobrasiliensis, N. abscessus, N. otitidiscaviarum, N. farcinia, N. wallacei, N. africana* و *N. transvalensis* با روش Real-Time PCR از طریق تشخیص ژن 16S rRNA در ژنوم باکتری فراهم می‌کند.

۳. اطلاعات زمینه ای

نوکاردیا (Nocardia) از باکتری‌های گرم‌مثبت و هوازی است که در خاک‌های غنی از مواد آلی یافت می‌شود. نوکاردیا به عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب، طیف گسترده‌ای از عفونت‌ها را تحت عنوان نوکاردیوزیس ایجاد می‌کند؛ این عفونت‌ها عمدتاً در افراد با سیستم ایمنی تضعیف شده رخ می‌دهند، اگرچه حدود ۴۰٪ از تمام عفونت‌های نوکاردیا در بیماران با سیستم ایمنی سالم مشاهده می‌شود. راه‌های اصلی انتقال نوکاردیا به انسان شامل استنشاق ذرات آلوده موجود در هوا

یا ورود باکتری از طریق زخم‌ها و خراش‌های پوستی است. عفونت ممکن است ریه‌ها، پوست یا سایر اندام‌ها را درگیر کنند. علائم نوکاردیوزیس بسته به محل عفونت متفاوت است، اما می‌تواند شامل سرفه، تب، کاهش وزن، درد قفسه سینه و ضایعات پوستی باشد.

در حال حاضر، ۱۳۱ گونه از نوکاردیا به‌طور رسمی نام‌گذاری شده‌اند که حداقل ۵۴ گونه از آن‌ها به عنوان عامل عفونت در انسان شناخته می‌شوند. این موضوع، نوکاردیا را در رتبه‌ی سوم با بیشترین تعداد گونه‌های بیماری‌زا قرار می‌دهد. یکی از روش های استاندارد تشخیصی برای نوکاردیا کشت باکتری می باشد اما نوکاردیا به‌طور معمول رشد بسیار کندی دارد (۲ تا ۷ روز) و چندین روز طول می‌کشد، بنابر این در بیماران با عفونت‌های شدید روش PCR به تشخیص دقیق و سریع بیماری کمک بسیاری می‌کند.

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 به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

۵. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
Nocardia Mix	میکس PCR*	۳۶۰ میکرولیتر
Pos Ctrl	شاهد مثبت	۱۵۰ میکرولیتر
Internal Ctrl	کنترل داخلی*	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

*۱، ۲، 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 حرفه ای و آموزش دیده 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
- ورتکس (Vortex Mixer)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA و تجهیزات و لوازم مورد نیاز آن
- 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 انتقال میکس به میکروتیوب های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به میکروتیوب PCR) می‌باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را 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 تیوب های کیت، آن ها را روی یخ خرد شده نگهداری کنید تا کاملاً ذوب شود. سپس با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر تیوب اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین اسپین کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارآیی آنها می‌شود.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای تشخیص نوکاردیا با توجه به محل عفونت متفاوت می‌باشد. در بیماران مبتلا به عفونت های تنفسی نمونه خلط یا مایع لاواژ برونش، در عفونت های سیستمیک نمونه خون یا مایع مغزی نخاعی و در عفونت های پوستی سواب زخم مورد استفاده قرار میگیرد. نمونه را می‌توان تا ۴۸ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود و برای زمان های طولانی تر

می‌باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر یا پائین تر نگهداری شود. در چنین شرایطی نمونه تا چندین روز پایدار می‌ماند.

۱۲.عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می شود. 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 Nocardia 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 Nocardia 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 Nocardia 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 PCR منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۷ تا ۳۲ می‌شود. در این حالت کنترل داخلی موفق بودن PCR را نشان می دهد.

۱۴. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه از روش ها و کیت های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می‌کنیم:

- QIAamp DNA Host-Free Microbiome Kit (Cat# 51704, Qiagen, Germany)
- QIAamp DNA Microbiome (Cat# 51904, Qiagen, Germany)
- QIAamp UCP Pathogen Mini Kit (Cat# 50214, Qiagen, Germany)

در صورتی که تمایل دارید استخراج DNA از نمونه را با استفاده از کنترل داخلی بررسی نمایید، به توضیحات مربوط در قسمت ۱۳ (کنترل داخلی) مراجعه کنید.

۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی تیوب های کیت را روی یخ خرد شده قرار دهید تا به طور کامل محتویات آن ها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آن ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید. به تعداد مورد نیاز میکروتیوب PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، یک میکروتیوب برای شاهد مثبت و یک میکروتیوب برای کنترل منفی (آب) نیز در نظر بگیرید.

در صورتی که کنترل داخلی را در حین استخراج وارد کرده اید، به هر لوله ۱۵ میکرولیتر از Nocardia Mix اضافه کنید. سپس ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده، کنترل مثبت یا آب به هر لوله اضافه کنید.

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به Nocardia 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، شاهد یا آب به هر لوله اضافه کنید در پایان درپوش میکروتیوب ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها 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 Nocardia RG جهت کار با دستگاه‌های Rotor-Gene و MIC طراحی شده است.

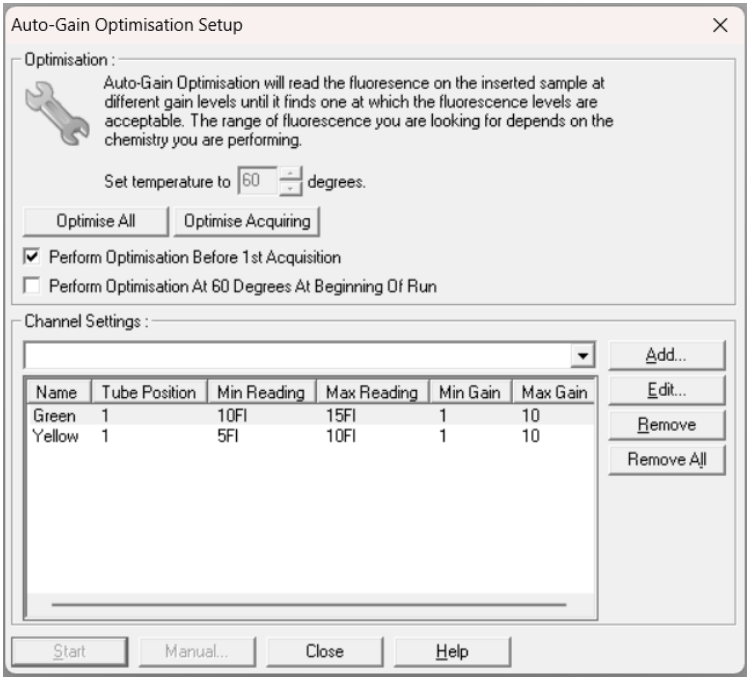
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

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 Nocardia را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل Nocardia 0.2 یا Nocardia 0.1 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 برای هر دو کانال انجام دهید.

Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس Nocardia باشد).

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

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 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 شاهد مثبتPositive Control را انتخاب کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

برنامه حرارتی دستگاه روتورژن را مطابق جدول زیر تنظیم نمایید.

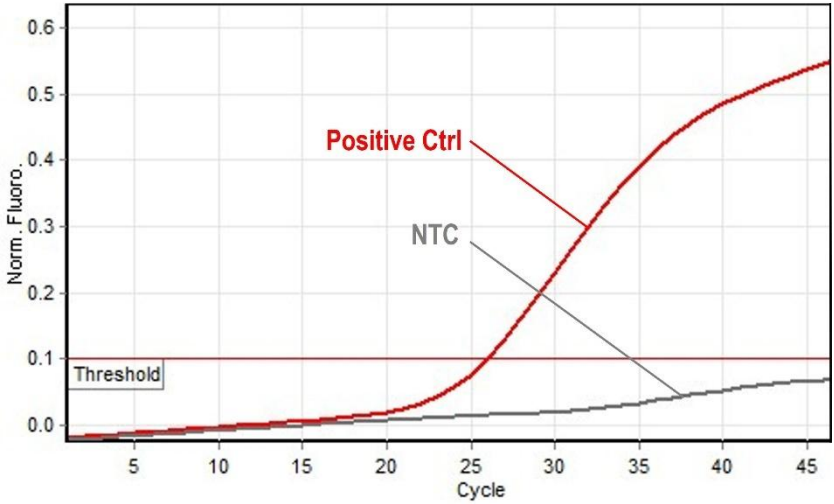
Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	65°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۵ درجه و برای رنگ‌های FAM و VIC تنظیم شود. Nocardia Mix موجود در کیت حاوی ROX می‌باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

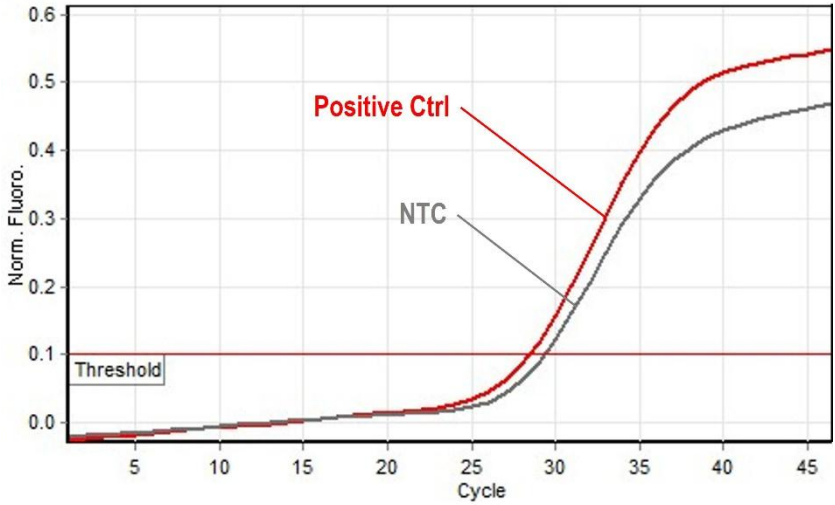
۱۸. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. سپس آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. فرایند فوق را برای کانال Yellow نیز تکرار کنید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدهای مثبت و منفی و کنترل داخلی تصاویر ۱ الی ۲ را ملاحظه فرمایید. توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **Nocardia** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **کنترل داخلی** می‌باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموئیدی 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 می باشد.



شکل ۱. منحنی شاهدها در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل۲. منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه روتورژن

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال Nocardia/Green مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۳۷ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال IC/Yellow می‌توان آن را **مثبت** تلقی نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال Nocardia/Green منفی باشد ولی در کانال IC/Yellow مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۷ تا ۳۲ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال Nocardia/Green و IC/Yellow منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

خلاصه تفسیر نتایج آزمایش در جدول زیر آمده است.

Green	Yellow	Result
+ CT < 37 cycles	+/-	Positive
-	+	Negative
-	-	Inconclusive

۱۹.میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم باکتری نوکاردیا بررسی شده است و معادل ۱۵ کپی در میکرولیتر می‌باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتر این باکتری 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.

۲۰. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی 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.

۲۱. پشتیبانی فنی

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

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱
Info@novingene.com

۲۲. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

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

تلفن تماس:
۲۱۰-۸۸۸۳۷۳۹۳
۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

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

۲۳. منابع

- Conville, P.S., Brown-Elliott, B.A., Smith, T. and Zelazny, A.M., 2018. The complexities of Nocardia taxonomy and identification. Journal of clinical microbiology, 56(1), pp.10-1128.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212.
- Nonthakaew, N., Sharkey, L.K. and Pidot, S.J., 2025. The genus Nocardia as a source of new antimicrobials. npj Antimicrobials and Resistance, 3(1), p.5.
- Traxler, R.M., Bell, M.E., Lasker, B., Headd, B., Shieh, W.J. and McQuiston, J.R., 2022. Updated review on Nocardia species: 2006–2021. Clinical Microbiology Reviews, 35(4), pp.e00027-21.

۲۴. 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.ir مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

Nocardia RG
Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.0

For Real-Time PCR Detection of Nocardia DNA
For use with Rotor-Gene and MIC
For Research Use Only

Σ 24 (Cat# NocardiaRG24)
Σ 48 (Cat# NocardiaRG48)
Σ 96 (Cat# NocardiaRG96)
NG-WI-ASL-68-100

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 8
17. Programming of the Rotor-Gene 9
18. Data Analysis: Rotor-Gene 10
19. Sensitivity 12

20. Disposal Method 12
21. Technical Support 12
22. Contact Information 13
23. References 13
24. Symbols 14

1. Introduction

Nocardia RG kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting Nocardia 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

The Nocardia RG kit is intended for detecting 11 Nocardia species, including *N. asteroides, N. cyriacigeorgica, N. nova, N. brasiliensis, N. pseudobrasiliensis, N. abscessus, N. otitidiscaviarum, N. farcinia, N. wallacei, N. africana, and N. transvalensis,* using the Real-Time PCR method by targeting the 16S rRNA gene in the bacterial genome.

3. Background Information

Nocardia is a genus of Gram-positive, aerobic, and branching bacteria found in organic-rich soils. Nocardia acts as an opportunistic pathogen and can cause a wide range of infections collectively known as nocardiosis. These infections primarily occur in immunocompromised individuals, although approximately 40% of all Nocardia infections are observed in immunocompetent patients. The main routes of Nocardia transmission to humans include inhalation of contaminated airborne particles or entry of bacteria through cuts and skin abrasions. These infections can involve the lungs, skin, or other organs. The symptoms of nocardiosis depend on the site of infection, but may include

cough, fever, weight loss, chest pain, and skin lesions. Currently, 131 Nocardia species have been formally named, of which at least 54 species are known to cause human infections. This ranks Nocardia as the third among genera with the most pathogenic species. The gold standard for Nocardia detection is culture-based identification, however, since, Nocardia is known for its slow growth, requiring 2-7 days to growth in culture, PCR-based detection is preferred in patients with severe infections due to its speed and accuracy in early diagnosis.

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 with templates and the following reagents:

Label	Content	Quantity
Nocardia Mix	PCR mix*	360 µl
Pos Ctrl	Positive Control	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 the accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit and required equipments/items
- 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 on ice kit components completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Keep PCR Mix tube at -20°C at all times. Take it out just before use and return it to freezer immediately after.
- Do not place 0.2ml PCR tubes on crushed ice. Use cold block instead.

11. Specimen, Storage and Transport

The appropriate clinical sample for the detection of Nocardia varies depending on the site of infection. In respiratory infections (pulmonary Nocardiosis) proper samples are sputum, bronchoalveolar lavage (BAL) and tracheal aspirate. In systemic infections blood and cerebrospinal fluid and in cutaneous infections wound swabs can be used. Blood or samples should be shipped at +4°C and can be stored at +4°C for 48 hours or aliquoted and stored at -20°C for up to a few weeks.

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 Nocardia RG kit contains an internal control (IC). This IC can be used during the extraction process or added directly to the Nocardia 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 the IC is added to Nocardia 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, 15ul of the internal control should be added to 150ul of Nocardia Mix before it is added to the tubes.
In a successful DNA extraction and PCR test, the Internal control should generate a CT of 27-32 in the Yellow Channel on Rotor-Gene.

14. DNA Isolation

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

- QIAamp DNA Host-Free Microbiome Kit (Cat# 51704, Qiagen, Germany)
- QIAamp DNA Microbiome (Cat# 51904, Qiagen, Germany)
- QIAamp UCP Pathogen Mini Kit (Cat# 50214, Qiagen, 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 positive sample and one for water.

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

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

Aliquot 15µl of Nocardia Mix directly to each PCR tube. Then add 10ul of extracted DNA, Positive Control or water.

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

16. Devices and software

Nocardia RG kit is designed to work with Rotor-Gene and MIC.

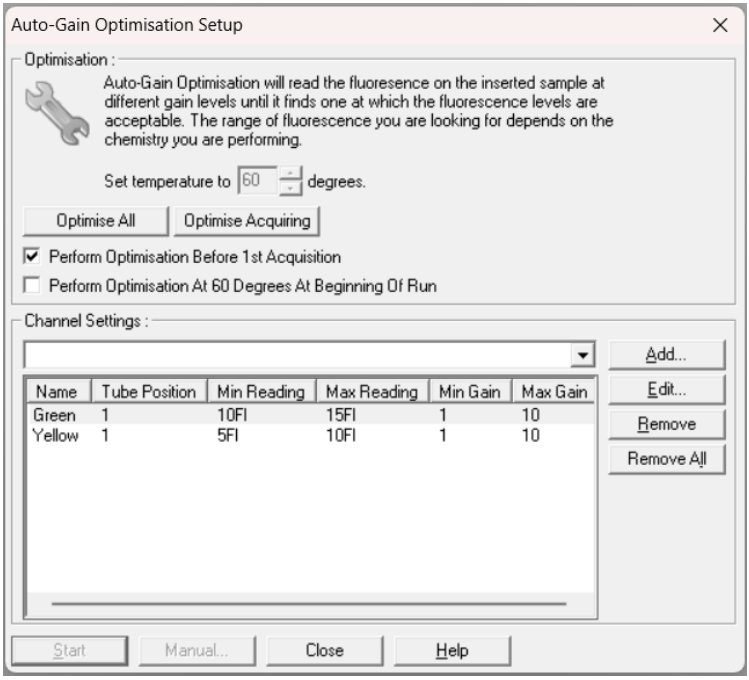
17. Programming of the Rotor-Gene

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

Open the Nocardia template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); Nocardia 0.1 is for strip tubes and Nocardia 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 both channels (note that Tube number 1 should contain Nocardia Mix).



Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the file to start the machine.
In Rotor-Gene machine, program thermal profile according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	65°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 65°C for Green and Yellow, dyes. The Nocardia Mix contains ROX. Final concentration of ROX in reaction is 300nM.

18. Data Analysis: Rotor-Gene

To analyze data briefly, click on analysis menu and then under Quantitation tab double-click on cycling A. Green. Manually put threshold at 0.1. Repeat the above for the Yellow channel. Figures 1 and 2 represent typical graphs for the Rotor-Gene. To interpret the results, please note that:
Signal in the **Green** channel is due to **Nocardia,** and a signal in the **Yellow** channel is due to **IC**.

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.

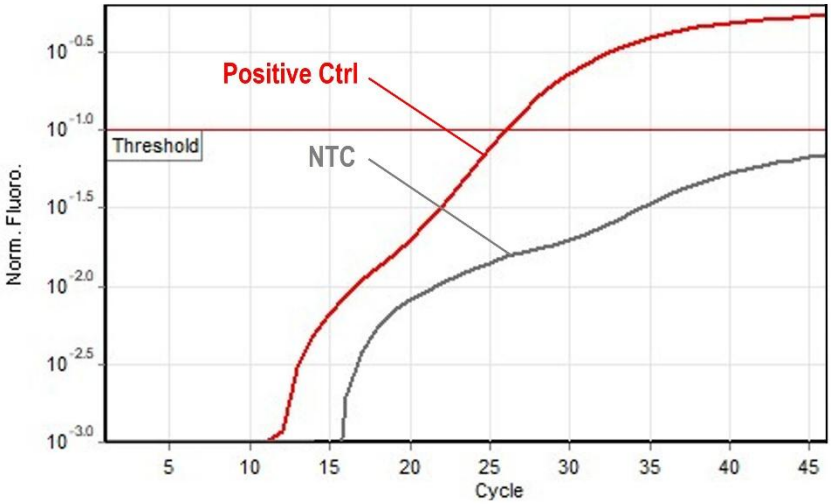


Fig 1. Typical Controls graph in Green channel for Rotor-Gene

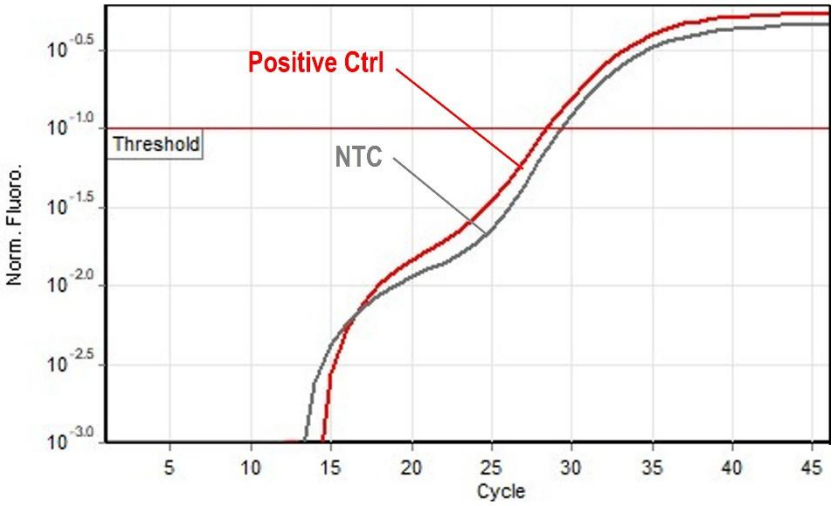


Fig 2. Typical IC graph in Yellow channel for Rotor-Gene

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in the Green/Nocardia channel with a sigmoid graph and a CT of less than 37.
- A sample is **Negative** if it is negative in the Green/ Nocardia channel while it is positive in the Yellow/IC channel with a sigmoid graph and CT of 27-32.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both the Green/Nocardia and Yellow/IC channels.

The interpretation of results is summarized in the bellow Table.

Green	Yellow	Result
+ CT < 37	+/-	Positive
-	+	Negative
-	-	Inconclusive

19. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with cloned target, of Nocardia genome and showed a limit of detection equal to 15 copies/µl.

20. 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.

21. Technical Support

For technical support, contact us via

Phone: +98 993-6223241
Email: info@novingene.com

22. 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

23. References

- Conville, P.S., Brown-Elliott, B.A., Smith, T. and Zelazny, A.M., 2018. The complexities of Nocardia taxonomy and identification. Journal of clinical microbiology, 56(1), pp.10-1128.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212.
- Nonthakaew, N., Sharkey, L.K. and Pidot, S.J., 2025. The genus Nocardia as a source of new antimicrobials. npj Antimicrobials and Resistance, 3(1), p.5.
- Traxler, R.M., Bell, M.E., Lasker, B., Headd, B., Shieh, W.J. and McQuiston, J.R., 2022. Updated review on Nocardia species: 2006–2021. Clinical Microbiology Reviews, 35(4), pp.e00027-21.

24. 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