راهنمای کیت

Ureaplasma RG

تابستان ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۰

جهت تشخیص DNA باکتری های اوره آ پلاسما پاروم و اوره‌آ پلاسما اوره‌آ لیتیکوم

به روش Multiplex Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا MIC

مخصوص تحقیقات

24 (Cat# UreaplasmaRQ24)

48 (Cat# UreaplasmaRQ48)

96 (Cat# UreaplasmaRQ96)

NG-WI-ASL-67-100

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 اقدامات لازم ۶
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن ۷
۱۲. کنترل داخلی ۸
۱۳. استخراج DNA ۸
۱۴. دستورکار PCR و مراحل آزمایش ۹
۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها ۱۰
۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ۱۰
۱۷. تنظیم سایر دستگاه ها ۱۱
۱۸. تحلیل نتایج Rotor-Gene ۱۲
۱۹. میزان حساسیت ۱۵

۲۰. روش امحاء..... ۱۵
۲۱. پشتیبانی فنی..... ۱۶
۲۲. اطلاعات تماس..... ۱۶
۲۳. منابع..... ۱۶
۲۴. توضیحات برچسب..... ۱۷

۱. مقدمه

کیت Ureaplasma RG امکان تشخیص همزمان دو عامل عفونت زا در بیماری‌های مقاربتی شامل اوره آ پلاسما پاروم (Ureaplasma parvum) و اوره‌آ پلاسما اوره‌آ لیتیکوم (Ureaplasma urealyticum) را به روش Multiplex Real-time PCR فراهم می‌کند. در این روش، DNA هر یک از میکروارگانیسم ها به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس این کیت حاوی سری ثانویه ای 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 حاضر امکان بررسی نمونه، جهت تشخیص دو عامل عفونتی، اوره آ پلاسما پاروم (Ureaplasma parvum) و اوره‌آ پلاسما اوره‌آ لیتیکوم (Ureaplasma urealyticum) را به روش Multiplex Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

Ureaplasma parvum و Ureaplasma urealyticum باکتری هایی از خانواده Mycoplasmataceae هستند. این باکتری‌ها بدون دیواره سلولی هستند و در دستگاه ادراری-تناسلی بسیاری از افراد یافت می‌شوند. اگرچه اغلب بدون علامت هستند، در مواردی با عوارضی مانند ناباروری، التهاب‌های تناسلی و همچنین

عوارض بارداری شامل زایمان زودرس و کوریوآمنیونیت مرتبط هستند.
از آنجایی که کشت این باکتری‌ها دشوار و زمان‌بر است، روش‌های مولکولی مانند PCR و Real-Time PCR بهترین راه برای تشخیص سریع، حساس و تمایز دقیق گونه‌ها محسوب می‌شوند.

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 یک فلش کارت و مواد زیر می‌باشد:

برچسب	محتوا	حجم
Ureaplasma Mix	میکس PCR* برای تشخیص Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum	۳۶۰ میکرولیتر
STI Pos Ctrl	شاهد مثبت برای STI	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 و چهار، چهل و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می‌باشد.

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 (IVDR) مورد تایید نمی‌باشد.

۹. سایر موارد مورد نیاز

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

- دستگاه Real-TimePCR 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 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) می باشند. هر یک

از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود داشته باشند به ویژه سمپلر. 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. 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 یخ‌های 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 آزمایش، سواب واژینال یا دهانه رحم، نمونه ادرار و سواب از مجاری ادراری مردان می‌باشد. استفاده از سایر نمونه ها به تشخیص پزشک می‌باشد. همچنین با درخواست پزشک سایر نمونه ها از جمله مایع آمنیوتیک نیز قابل بررسی می باشد.

نمونه در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد برای ۴۸ ساعت قابل نگهداری است و برای زمان های طولانی تر می باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر یا پائین تر نگهداری شود. در چنین شرایطی نمونه تا چندین روز پایدار می‌ماند.

۱۲. 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 Ureaplasma 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 Ureaplasma 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 Ureaplasma 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 واکنش، کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۷ تا ۳۲ می‌شود.

۱۳. استخراج DNA

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

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat# 51104, Qiagen, Germany)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)

۱۴. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی تیوب های کیت را روی یخ خرد شده قرار دهید تا به طور کامل محتویات آنها 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 نمونه‌های 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 مستقیماً ۱۵ میکرولیتر از Ureaplasma Mix اضافه کنید.

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به Ureaplasma Mix اضافه نمایید، با توجه به توضیحات قسمت ۱۲ ، آن را به میکس افزوده و ۱۵ میکرولیتر از مخلوط حاصل را به هر لوله منتقل کنید.

سپس ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده، شاهد مثبت و آب به هر لوله اضافه کنید.

درپوش میکروتیوب ها را بگذارید. 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.

۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت Ureaplasma RG جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene و MIC طراحی شده است.

۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

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

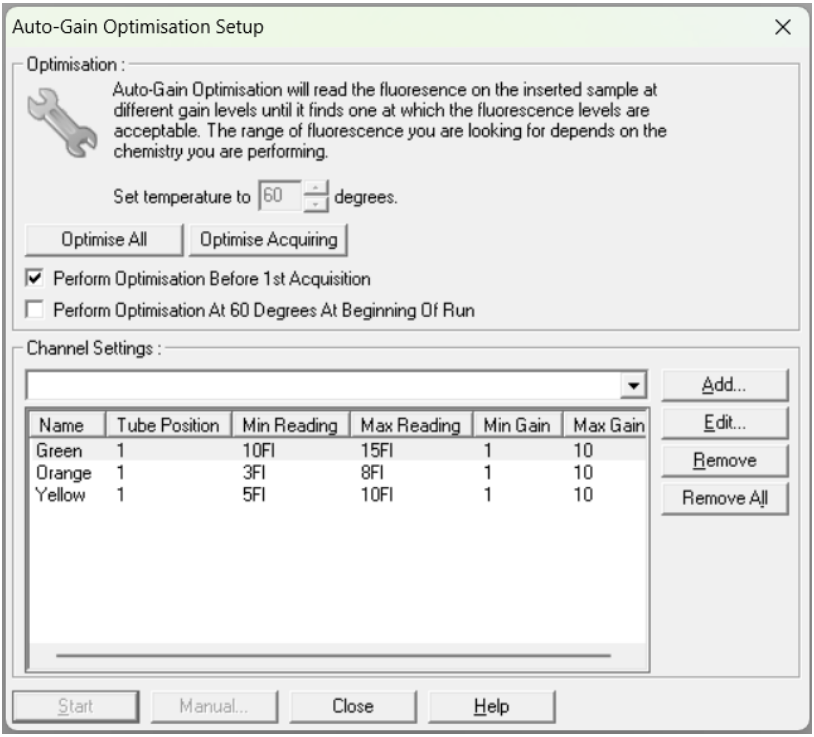
دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر متصل کرده و سپس آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

فایل تمپلیت Ureaplasma را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه نمایید فایل Ureaplasma 0.1 یا Ureaplasma 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 زیر برای هر سه کانال انجام دهید.

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

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



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. همچنین می‌توانید دستگاه را مطابق جدول بخش ۱۷ تنظیم نمایید.

۱۷. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های 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	

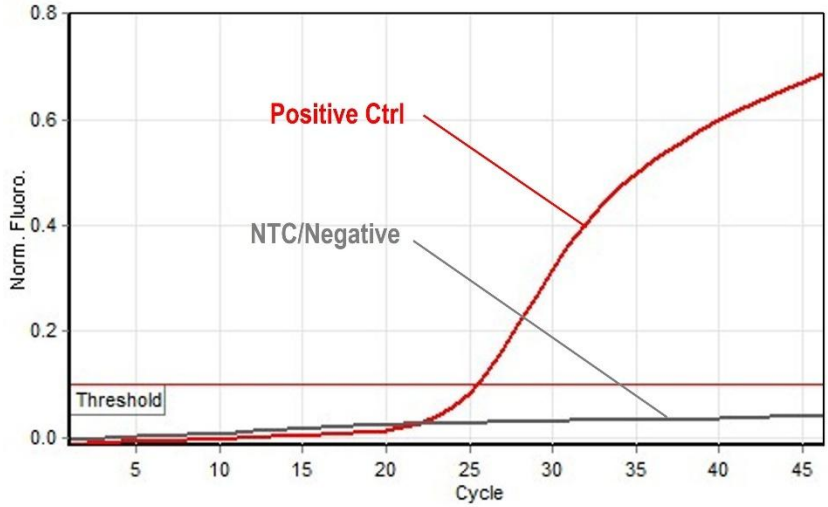
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ‌های FAM، VIC، ROX تنظیم شود.

توجه داشته باشید که در این آزمایش *ROX* نباید به عنوان رنگ مرجع *(reference dye)* انتخاب شود.

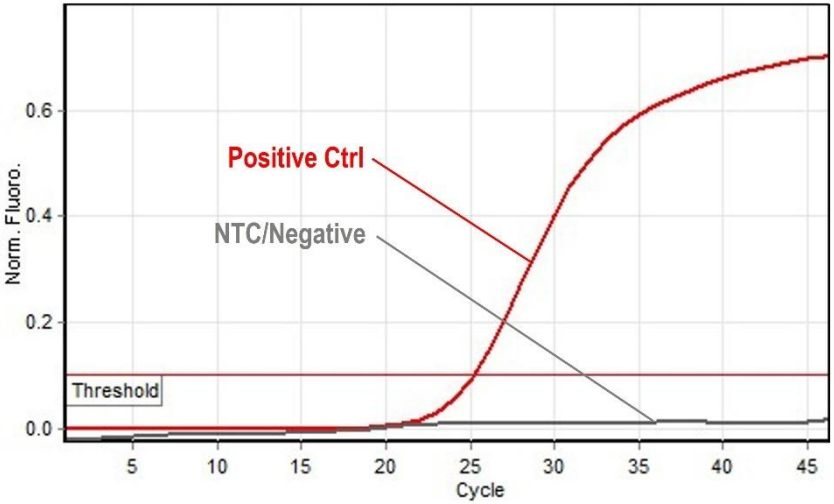
۱۸. تحلیل نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج 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 های Yellow و Orange نیز تکرار کنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدهای مثبت و منفی تصاویر ۱، ۲ و ۳ را ملاحظه فرمایید. توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **Ureaplasma urealyticum** و افزایش **تابش نارنجی (Orange)** حاصل از **Ureaplasma parvum** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** مربوط به **کنترل داخلی** می‌باشد.

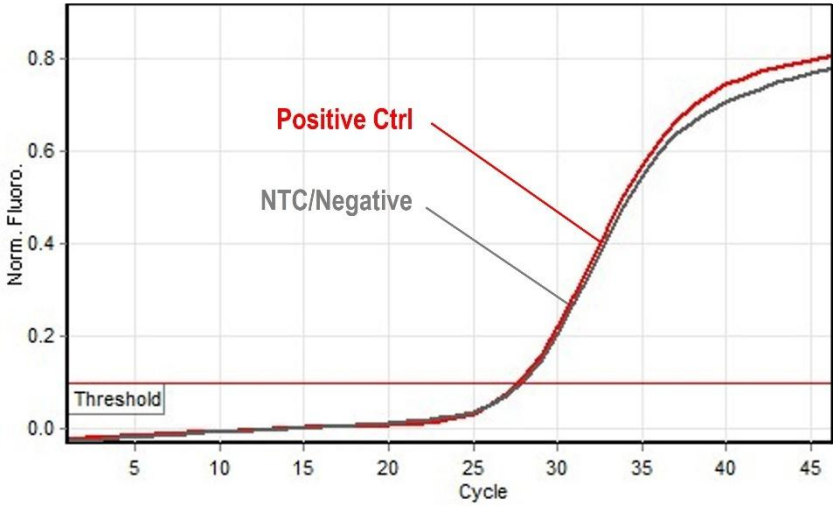
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می‌باشد.



شکل ۱. منحنی شاهدها در کانال سبز دستگاه روتورژن (اوره‌آ پلاسما اوره‌آ لیتیکوم)



شکل ۲. منحنی شاهدها در کانال نارنجی دستگاه روتورژن (اوره آ پلاسما پاروم)



شکل ۳. منحنی شاهدها در کانال زرد دستگاه روتورژن (کنترل داخلی)

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** مثبت با CT کمتر از ۴۰ و در کانال زرد مثبت با CT بین ۲۰ تا ۳۲ باشد، از نظر **Ureaplasma urealyticum** **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **نارنجی** مثبت با CT کمتر از ۴۰ و در کانال زرد مثبت با CT بین ۲۰ تا ۳۲ باشد، از نظر **Ureaplasma parvum** **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** و **نارنجی** منفی و در کانال **زرد** مثبت با CT بین ۲۷ تا ۳۲ باشد، نمونه از نظر وجود **Ureaplasma urealyticum** و **Ureaplasma parvum** و **منفی** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** منفی باشد بدون توجه به نتیجه سه کانال **سبز** ، **زرد** و **نارنجی**، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

خلاصه تفسیر نتایج آزمایش در جدول زیر آمده است.

Green	Orange	Yellow	Result
+	-	+	Pos for Ureaplasma urealyticum
-	+	+	Pos for Ureaplasma parvum
-	-	+	Negative
-	-	-	Inconclusive

۱۹. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم بررسی شده است. برای اوره آ پلاسما پاروم معادل ۷/۷ کپی در میکرولیتر می‌باشد و برای اورهآ پلاسما اورهآ لیتیکوم معادل ۷/۵ کپی در میکرولیتر می‌باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتر عامل عفونت زا 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 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.

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: ۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

وبسایت: www.novingene.ir

۲۳. منابع

- Buder, S., Schöfer, H., Meyer, T., Bremer, V., Kohl, P.K., Skaletz-Rorowski, A. and Brockmeyer, N., 2019. Bacterial sexually transmitted infections. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 17(3), pp.287–315.
- Hunjak, B., Sabol, I., Vojnović, G., Fistonić, I., Erceg, A.B., Peršić, Z. and Grce, M., 2014. Ureaplasma urealyticum and Ureaplasma parvum in women of reproductive age. Archives of gynecology and obstetrics, 289(2), pp.407-412.
- Mackay IM., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect.; 10 (3): 190 – 212.
- Mahon, C.R. and Lehman, D.C., 2023. Textbook of Diagnostic Microbiology - E-Book. Elsevier Health Sciences.

- Marovt, M., Keše, D., Kotar, T., Kmet, N., Miljković, J., Šoba, B. and Matičič, M., 2015. Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum detected with the same frequency among women with and without symptoms of urogenital tract infection. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 34(6), pp.1237-1245.

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.

Ureaplasma RG
Kit Manual

Summer 2025, Version 1.0

For Multiplex Real-Time PCR Detection of Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum DNA
For Use with Rotor-Gene or MIC
For Research Use Only

Σ 24 (Cat# UreaplasmaRQ24)
Σ 48 (Cat# UreaplasmaRQ48)
Σ 96 (Cat# UreaplasmaRQ96)
NG-WI-ASL-67-100

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 4
8. Product Use Limitations 5
9. Additionally Required Materials 5
10. General Precautions 5
11. Specimen, Storage and Transport 6
12. Internal Control (IC) 6
13. DNA Isolation 7
14. PCR Protocol 7
15. Devices and software 8
16. Programming of the Rotor-Gene 8
17. Programming Other Machines 9
18. Data Analysis: Rotor-Gene 10
19. Sensitivity 13

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

1. Introduction

Ureaplasma RG kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting DNA of Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum.
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

Ureaplasma RG kit is intended for detecting DNA of Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum. Detection is achieved using Real-Time PCR system with Rotor-Gene and MIC machine.

3. Background Information

Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum are classified under Mycoplasmataceae.These cell wall–deficient bacteria are commonly found in the urogenital tract of many individuals. Although they are often asymptomatic, in some cases they are associated with complications such as infertility, genital tract inflammation, and pregnancy-related conditions including preterm birth and chorioamnionitis.
Since, culturing Ureaplasma species is both difficult and time-consuming, molecular diagnostic methods particularly PCR and Real-Time PCR are recognized as the most reliable approaches for their detection. These techniques provide rapid, sensitive, and accurate identification, ensuring precise differentiation.

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, flash card, with Rotor-Gene templates and the following reagents:

Label	Content	Quantity
Ureaplasma Mix	PCR mix* for Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum	360 µl
STI Pos Ctrl	Positive Control for	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 in vitro diagnostics.

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
- 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

In order 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 PCR 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

Proper samples to test are urogenital swabs (endocervical/urethral) and urine. In special clinical contexts amniotic fluid (in pregnant women) and some other samples if requested by the physician are appropriate samples. Samples can be stored at 2-8°C for 48 hours or at -20°C or lower for a few months.

12. Internal Control (IC)

To assess the possibility of DNA extraction failure and PCR inhibition, and to prevent false negative results, the Ureaplasma RG kit contains an internal control (IC). This IC can be used during the extraction process or added directly to the Ureaplasma 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 Ureaplasma Mix, only PCR inhibition can be monitored. For this purpose, 1ul of the IC should be added to each reaction. For example, for 10 PCR reactions, 10ul of the IC should be added to 150ul of the Ureaplasma Mix before it is added to the tubes. In a successful DNA extraction and PCR test, the IC should generate a CT of 27-32 in the Yellow/VIC Channel.

13. DNA Isolation

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

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat# 51104, Qiagen, Germany)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)

14. 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 Ureaplasma Mix to the PCR tube.

If the IC is added to the Ureaplasma Mix, add 15ul of the prepared mix (as described in section 12) to the PCR tube.

Then add 10ul of extracted DNA, Positive Control or water.

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

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

15. Devices and software

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

16. Programming of the Rotor-Gene

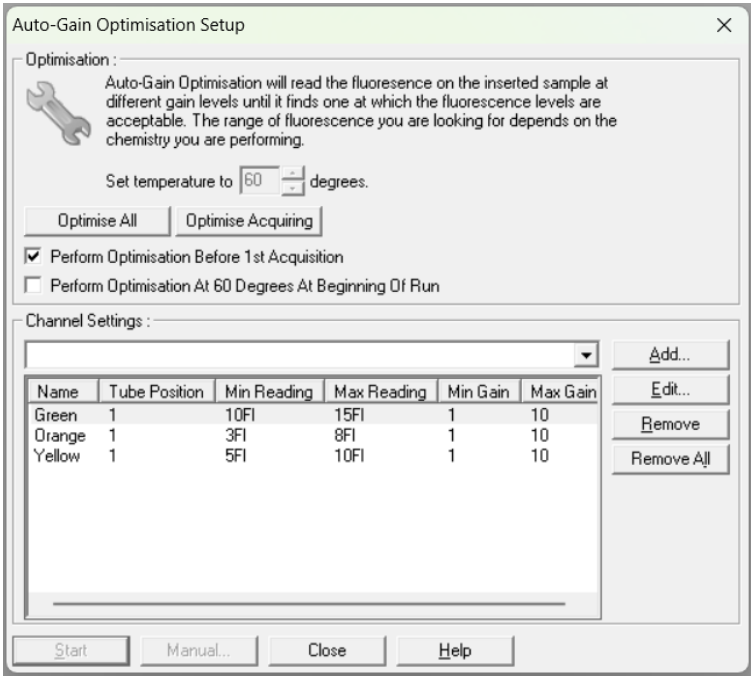
Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the memory card provided in the kit and double-click on Ureaplasma template " Ureaplasma 0.1" or " Ureaplasma 0.2" depending on the tubes used.

Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the image.

Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain Ureaplasma Mix).

Then close the Auto Gain Optimisation window.



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.

17. 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, VIC, ROX and dyes.

Note! ROX should not be selected as reference dye in this test.

18. Data Analysis: Rotor-Gene

To analyze data Ureaplasma briefly, click on the analysis menu and then under Quantitation tab double click on cycling A. Green. Manually put threshold, at 0.1. Repeat the above for Yellow and Orange Channels.

Figures 1, 2 and 3 represent typical graphs for Rotor-Gene. To interpret the results, please note that; a signal in the **Green** channel indicates **Ureaplasma Urealyticum,** a signal in **Orange** channel indicates **Ureaplasma parvum** and a signal in the **Yellow** channel indicates **Internal Control.**

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.

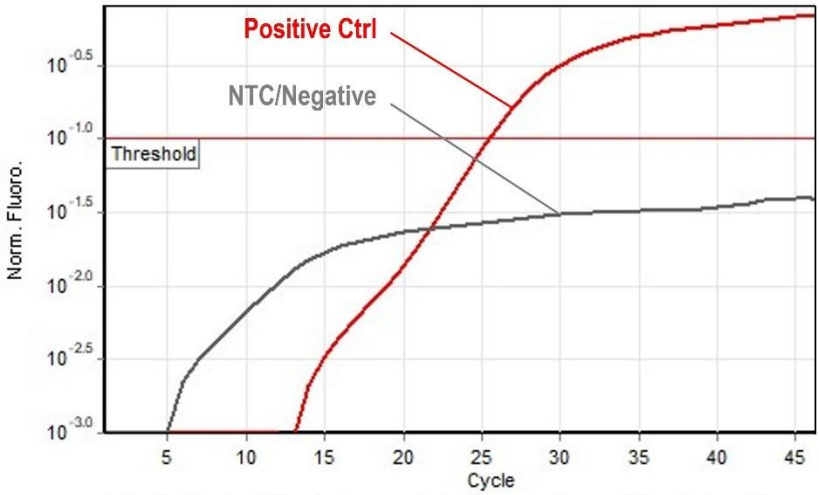


Fig 1. Typical Controls graph in Green channel for Rotor-Gene (Ureaplasma urealyticum)

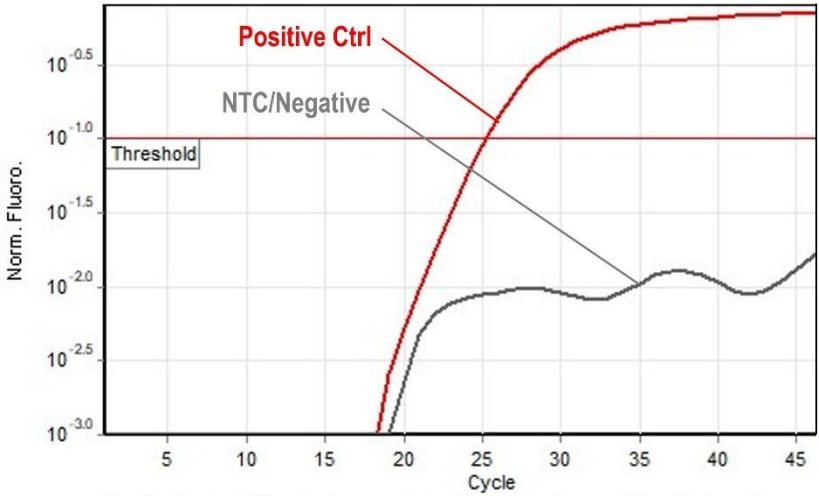


Fig 2. Typical Controls graph in Orange channel for Rotor-Gene (Ureaplasma parvum)

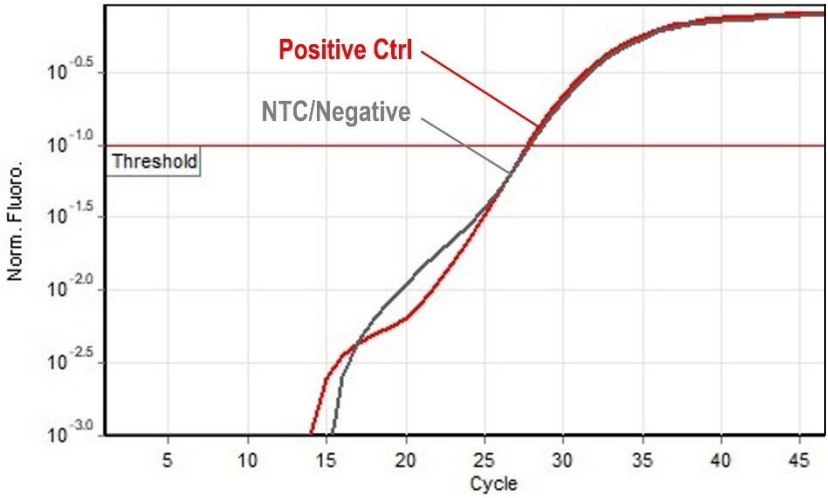


Fig 3. Typical Controls graph in Yellow channel for Rotor-Gene (Internal Control)

Consider the following points for analyzing results:

- A sample is **Positive** for Ureaplasma urealyticum if it is positive in the **Green** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40 and in the **Yellow** channel with a CT of 20-32.
- A sample is **Positive** for Ureaplasma parvum if it is positive in the **Orange** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40 and in the **Yellow** channel with a CT of 20-32.
- A sample is **Negative** for Ureaplasma parvum, and Urea plasma urealyticum if it is negative in the **Green** and the **Orange** channels while it is positive in the **Yellow** channel with a sigmoid graph and CT of 20-32.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample IC is negative in **Yellow** channel.

The interpretation of results is summarized in the following table.

Green	Orange	Yellow	Result
+	-	+	Pos for Ureaplasma urealyticum
-	+	+	Pos for Ureaplasma parvum
-	-	+	Negative
-	-	-	Inconclusive

19. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with a cloned targets genomes and showed a limit of detection equal to 7.5 copies/µl for Ureaplasma urealyticum and 7.7 copies/µl for for Ureaplasma parvum.

20. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special method of disposal and can be directly discarded. Infectious laboratory 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

- Buder, S., Schöfer, H., Meyer, T., Bremer, V., Kohl, P.K., Skaletz-Rorowski, A. and Brockmeyer, N., 2019. Bacterial sexually transmitted infections. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 17(3), pp.287–315.
- Hunjak, B., Sabol, I., Vojnović, G., Fistonić, I., Erceg, A.B., Peršić, Z. and Grce, M., 2014. Ureaplasma urealyticum and Ureaplasma parvum in women of reproductive age. Archives of gynecology and obstetrics, 289(2), pp.407-412.
- Mackay IM., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect.; 10 (3): 190 – 212.

- Mahon, C.R. and Lehman, D.C., 2023. Textbook of Diagnostic Microbiology - E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Marovt, M., Keše, D., Kotar, T., Kmet, N., Miljković, J., Šoba, B. and Matičič, M., 2015. Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum detected with the same frequency among women with and without symptoms of urogenital tract infection. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 34(6), pp.1237-1245.

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