



Ureaplasma ur PCR

Instrução de uso
Instrucciones de uso
Usage instructions

REF K178

Revisão: Maio/2015

ÍNDICE

Finalidade	3
Princípio de Ação	3
Apresentação	3
Reagentes	4
Equipamentos e Insumos Operacionais.....	4
Condições de Armazenamento e Transporte	4
Cuidados Especiais	5
Amostras	6
Procedimento	6
A. Extração do DNA	6
B . Preparo dos Reagentes	7
C . Diluição do Padrão Quantitativo	7
D . Preparo da PCR	8
E . Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real	8
F . Validação do Resultado	9
G. Interpretação do Resultado	10
Limitações do Processo	11
Desempenho do Produto / Controle de Qualidade	11
Comparação de Métodos e Especificidade Metodológica	11
Repetibilidade	12
Reprodutibilidade	12
Sensibilidade Clínica	12
Sensibilidade Analítica	13
Significado Diagnóstico	13
Referências Bibliográficas	13
Atendimento ao Consumidor	13
Simbologia Universal	14

FINALIDADE

Teste para detecção quantitativa do DNA de *Ureaplasma urealyticum* através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

O kit **Bio Gene Ureaplasma ur PCR** é um ensaio *in vitro* baseado na detecção quantitativa de *U. urealyticum* através da PCR em tempo real. O DNA da bactéria é extraído e o método de PCR em Tempo Real é usado para amplificar o DNA patógeno.

Um termociclador de PCR em Tempo Real é usado para amplificar e detectar a sonda fluorescente. O software do aparelho calcula a concentração de *U. urealyticum*, expressa em cópias/ μL , utilizando a curva padrão gerada a partir do padrão quantitativo contido no kit.

Reagente	Apresentação
	50 Testes
R1	1 x 55 μL *
R2	1 x 525 μL *
R3	1 x 525 μL
R4	1 x 55 μL *
R5	1 x 600 μL *
R6	1 x 50 μL
R7	1 x 500 μL *
R8	2 x 1,5 mL
R9	1 x 1 mL

*Reagentes liofilizados. Os volumes descritos acima correspondem ao volume final após a ressuspensão dos reagentes, conforme descrito no item PROCEDIMENTO, subitem B (Preparo dos Reagentes).

REAGENTES

- R1. Solução PCR:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.
R2. Mix Taq: DNA Polimerase, dNTPs, $MgCl_2$.
R3. Tampão Mix: TRIS-HCl.
R4. Solução PCR CI: Primer, Sonda, TRIS-HCl.
R5. Controle Interno: Plasmídeo, TRIS-HCl.
R6. Controle Negativo: TRIS-HCl.
R7. Padrão A (2×10^5 cópias/ μL): Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.
R8. Diluente: TRIS-HCl, EDTA.
R9. Água: Água livre de DNase/RNase.

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS**Materiais contidos no kit:**

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instrução de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1- Sistema ótico programável de detecção de fluorescência (Termociclador de PCR em Tempo-Real).
- 2- Capela de fluxo laminar.
- 3- Tubos para reação de PCR ou placa de PCR.
- 4- Luvas de látex descartáveis livres de pó ou material similar.
- 5- Microcentrífuga (3.000 - 12.000 rpm).
- 6- Vórtex.
- 7- Micropipetas e ponteiros estéreis com filtro (0,5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL).
- 8- Kit para extração de ácidos nucleicos.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento é de -20°C (-10 a -30°C).

Após a ressuspensão dos reagentes liofilizados, o produto é estável por 6 meses a partir da data de ressuspensão. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento.

O transporte pode ser feito em temperaturas entre 2 e 30°C. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUDADOS ESPECIAIS

1- Somente para uso diagnóstico *in vitro* profissional.

2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.

3- Manusear e descartar todas as amostras biológicas, reagentes e materiais utilizados para realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite contato direto com as amostras biológicas e os reagentes. Evitar derrames ou aerossol. Os resíduos devem ser manuseados e descartados de acordo com as medidas de segurança adequadas.

4- Procedimentos de biologia molecular, tais como a extração de ácidos nucléicos, transcrição reversa, amplificação e detecção requerem pessoal qualificado para evitar o risco de resultados errados, especialmente devido à degradação de ácidos nucléicos contidos nas amostras ou contaminação da amostra por produtos de amplificação.

5- É necessário dispor de áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a ampliação/detecção de produtos amplificados. Nunca introduzir um produto de amplificação na área destinada para a extração ou preparação de produtos de amplificação.

6- Todas as amostras e reagentes devem ser manipulados sob uma capela de fluxo laminar. As pipetas devem ser usadas com ponteiros com filtro. As ponteiros empregadas devem ser estéreis, livres de DNases e RNases.

7- Evitar o congelamento e descongelamento repetido dos reagentes.

8- Armazenar as amostras de DNA a -20°C, caso não forem utilizadas imediatamente.

9- Não usar o kit após a data de validade.

10- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.

11- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.

12- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.

13- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Este kit pode ser utilizado com amostras de DNA extraídas de swab genital ou uretral. Outros tipos de amostras podem ser utilizados de acordo com recomendações médicas ou do próprio laboratório.

As amostras devem ser coletadas de acordo com as recomendações do laboratório para testes moleculares e ressuspensas em meio de transporte ou salina. Devem ser transportadas e armazenadas entre 2 e 8°C por até 3 dias¹.

Utilizar amostras de DNA adequadas à amplificação por PCR com pureza e concentração adequadas. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido.

Obs: Concentração de amostra de DNA sugerida **5ng/μL**.

PROCEDIMENTO

A. Extração do DNA

Os ácidos nucléicos (DNA) das amostras devem ser extraídos seguindo as instruções de uso do kit escolhido. Para o controle do processo de extração, o **Controle Interno (R5)** deve ser preparado e adicionado às amostras durante a extração, conforme descrito abaixo:

1- Adicionar 4μL do **Controle Interno (R5)** a cada tubo contendo as amostras já ressuspensas em tampão de extração / lise.

2- Completar o processo de extração de acordo com as instruções de uso do kit de extração.

Obs: Nunca adicionar o **Controle Interno** diretamente à amostra biológica pura, pois pode resultar em degradação do mesmo.

B. Preparo dos Reagentes

1- Centrifugar (pulso *spin*) os reagentes: **Solução de PCR (R1)**, **Solução de PCR CI (R4)**, **Controle Interno (R5)** e **Padrão A (R7)** antes da abertura dos microtubos.

2- Ressuspenda o reagente **Mix taq (R2)** com 525µL do reagente **Tampão Mix (R3)**.

3- Ressuspenda os reagentes, **Solução de PCR (R1)**, **Solução de PCR CI (R4)** e **Controle Interno (R5)** com o reagente **Água (R9)** de acordo com a tabela abaixo:

Reagente	Volume de Água (R9)
Solução PCR (R1)	55 µL
Solução PCR CI (R4)	55 µL
*Controle Interno (R5)	600 µL

*Os reagentes R5 e R7 contém molde de DNA, e eles devem ser manipulados (ressuspendidos) em área apropriada para evitar a contaminação dos demais reagentes.

C. Diluição do Padrão Quantitativo

1- Ressuspender o **Padrão A (R7)** com 500 µL do **Diluyente (R8)**.

2- Separar 3 microtubos (não fornecido no kit) adequados para a diluição seriada do **Padrão A (R7)**.

3- Pipetar 90µL do **Diluyente (R8)** em cada microtubo e nomeá-los como B, C e D respectivamente.

4- Em seguida, pipetar 10µL do **Padrão A (R7)** no microtubo B e homogeneizar.

5- Trocar a ponteira e pipetar 10µL do microtubo B no microtubo C e homogeneizar.

6- Trocar a ponteira e pipetar 10µL do microtubo C no microtubo D e homogeneizar.

7- No final da diluição temos padrões A, B, C e D com as seguintes concentrações:

Padrão A – 2×10^5 cópias/ μL

Padrão B – 2×10^4 cópias/ μL

Padrão C – 2×10^3 cópias/ μL

Padrão D – 2×10^2 cópias/ μL

D. Preparo da PCR

1- Separar previamente os microtubos a serem utilizados, de acordo com o número de amostras e padrões quantitativos a serem analisados.

2- Para cada amostra/padrão/controle preparar a solução de PCR final.

3- Cada reação deve conter:

- 10 μL de **Mix Taq (R2)** fornecido no kit).
- 1 μL de **Solução PCR (R1)** fornecido no kit).
- 1 μL de **Solução PCR CI (R4)** fornecido no kit).
- 3 μL de **Água (R9)** fornecido no kit).

Os volumes indicados acima são utilizados para 1 reação. Para o preparo de muitas reações deve se multiplicar o volume de cada reagente pelo número de reações necessárias.

4- Adicionar 5 μL do DNA extraído das amostras (concentração sugerida 5ng/ μL) ou 5 μL dos Padrões Quantitativos ou 5 μL do **Controle Negativo (R6)** nos tubos previamente determinados.

5- Homogeneizar bem.

6- Observe que o volume total da reação é de 20 μL e cada corrida de PCR deve incluir os controles relevantes (Controle Negativo, Controle Interno e Padrões Quantitativos).

7- Transporte os tubos para o termociclador e vá para a seção E (Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real).

E. Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real

Verificar o manual de operação do equipamento de PCR em tempo real para a programação do experimento.

1- Defina o tipo de experimento:

Teste Quantitativo com Curva Padrão.

2- Defina os detectores (sondas) fluorescentes como:

Detector Ureaplasma ur	Detector Controle Interno
“reporter 1” = FAM	“reporter 2” = VIC

Obs: O Controle Negativo e os Padrões Quantitativos não apresentam o Controle Interno (reporter 2), pois o mesmo é utilizado para o controle da extração e da amplificação das amostras.

3- Defina os Padrões Quantitativos (standards) como:

Padrão A – 2×10^5 cópias/ μ L

Padrão B – 2×10^4 cópias/ μ L

Padrão C – 2×10^3 cópias/ μ L

Padrão D – 2×10^2 cópias/ μ L

4- Defina as condições dos ciclos:

	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95°C	15 minutos	1
2	95°C	10 segundos	50
	60°C	60 segundos	

Defina “Data Collection” como “stage 2, step 2 (60@0:60)”.

F. Validação do Resultado**1- Curva Padrão**

Curva Padrão	Faixa Permitida	Amplificação / Detecção
Coeficiente de correlação (R^2)	$0,99 \leq R^2 \leq 1,00$	Válida

Se o valor de R^2 não ficar entre os limites da faixa permitida, o resultado é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

2- Controle Negativo

CT Controle Negativo		Resultado	Detecção
FAM	VIC		
Indeterminado	Indeterminado	Negativo	Válida

3- Amostras

Ureaplasma ur		Resultado	Detecção
FAM	VIC		
Concentração determinada	$25 \leq CT \leq 31$	Positivo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Positivo	Inválido*
Concentração indeterminada	$25 \leq CT \leq 31$	Negativo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Negativo	Inválido*

*Os valores de CT do Controle Interno variam de acordo com as condições do processo, como a eficiência da extração do DNA/RNA, a concentração das amostras e as configurações do termociclador. Logo, estas condições devem ser avaliadas quando os valores de CT não forem adequados e, se pertinente, os resultados podem ser validados.

Exemplo: Amostras com alto número de cópias de DNA/RNA podem, em alguns casos, inibir a amplificação do Controle Interno resultando em valor de CT fora da faixa ideal, este resultado não invalida o teste.

Se os requisitos acima não forem cumpridos, o ensaio é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

G. Interpretação do Resultado

O kit é capaz de detectar de 10 a 1.000.000 de cópias por reação.

O software do termociclador calcula automaticamente a concentração das amostras.

Exemplo: Se o programa mostrar uma concentração como 2.00E+005, então a concentração da amostra será 2.0×10^5 cópias/ μ L.

Resultado da Amostra em Cópias/ μ L (FAM)	Cópias por Reação
$\geq 1 \times 10^6$	> 1.000.000
$2 \leq \text{Quantidade} \leq 9 \times 10^5$	Quantidade obtida
< 2	< 10

A não detecção do DNA do patógeno não exclui a presença de infecção quando o título do patógeno estiver abaixo do limite de detecção deste kit. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente. Os resultados obtidos devem ser avaliados considerando os dados clínicos e os exames laboratoriais do paciente.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Contaminações cruzadas que ocorrem durante a coleta da amostra, processamento, transporte e armazenamento poderão ocasionar resultados falsos.

DESEMPENHO DO PRODUTO CONTROLE DE QUALIDADE

Exatidão

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA

O kit **Bio Gene Ureaplasma ur PCR** foi comparado com outro kit para a quantificação do DNA de *U. urealyticum*. Foram realizadas 25 análises e os resultados foram avaliados. A diferença entre os valores das amostras, obtidos nos dois produtos foi $\leq 0,5$ log. Com estes resultados pode-se concluir que o kit apresenta boa especificidade metodológica.

Precisão**REPETIBILIDADE**

Foram realizadas 10 dosagens sucessivas de 2 amostras positivas com concentrações distintas, os resultados estão mostrados na tabela abaixo:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração Média (Log)	4,337	2,402
Desvio Padrão (Log)	0,093	0,082
Coefficiente de Variação (%)	2,157	3,415

REPRODUTIBILIDADE

Foram realizadas 10 dosagens durante 3 dias consecutivos com 1 amostra, obtendo-se os seguintes resultados:

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Concentração Média (Log)	2,402	2,401	2,395
Desvio Padrão (Log)	0,082	0,084	0,090
Coefficiente de Variação (%)	3,415	3,514	3,781

Sensibilidade Clínica

O kit **Bio Gene Ureaplasma ur PCR** apresentou sensibilidade clínica de 99,9% e especificidade clínica de 99,9%.

Método		Dados Clínicos		Total
Bio Gene Ureaplasma ur PCR	Resultado	Positivo	Negativo	
	Positivo	25	0	25
	Negativo	0	25	25
RESULTADO TOTAL		25	25	50

Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica encontrada nos estudos de performance foi 0,15 log, ou seja, a técnica foi capaz de detectar aproximadamente 7 moléculas alvos em 5µL do produto de extração do DNA adicionado a reação de amplificação.

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

Ureaplasma urealyticum, pertencente à família Mycoplasmataceae, é o agente responsável por 20 a 30% dos casos de uretrite não-gonocócica. Nos homens causa principalmente uretrite e nas mulheres pode causar infecção no trato geniturinário, infertilidade e complicações da gravidez, como parto prematuro. Em neonatos pode resultar em meningite e pneumonia.

A transmissão ocorre por contato sexual e via perinatal.

O diagnóstico precoce da *U. urealyticum* permite o direcionamento adequado do tratamento, evitando assim a progressão da doença com sequelas para o hospedeiro. Logo, a detecção quantitativa de *U. urealyticum* por PCR em tempo real tem grande importância por ser um método sensível, preciso e ágil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
2. Mallard, K; Schopfer, K; Bodmer, T. Development of real-time PCR for the differential detection and quantification of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. J Microbiol Methods. 2005 Jan;60(1):13-9.
3. Xiao, L; Glass, J.I; Paralanov, V. et al. Detection and characterization of human *Ureaplasma* species and serovars by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2010 Aug;48(8):2715-23.
4. Yi, J; Yoon, B.H; Kim, E.C. Detection and biovar discrimination of *Ureaplasma urealyticum* by real-time PCR. Mol Cell Probes. 2005 Aug;19(4):255-60.

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

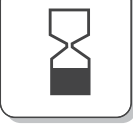
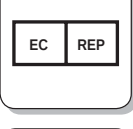
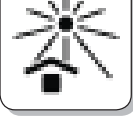
Serviço de Assessoria ao Cliente

Tel.: 0800 031 5454

E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de registro do kit Bio Gene *Ureaplasma ur PCR* na ANVISA: 10269360252

SIMBOLOGIA UNIVERSAL

	NÚMERO DE CATÁLOGO		FABRICADO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (último dia do mês)		CONTROLE NEGATIVO
	LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTES		INFLÁMVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	REPRESENTANTE EUROPEU AUTORIZADO		MARCA CE
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA

Bioclin ·· QUIBASA

BIO GENE

Ureaplasma ur PCR

Español . Instrucciones de uso

REF K178

Revisión: Mayo/2015

ÍNDICE

Finalidad	3
Principio de Acción	3
Presentación	3
Reactivos	4
Equipamientos e Insumos Operacionales	4
Condiciones de Almacenamiento y Transporte	4
Cuidados Especiales	5
Muestras	6
Procedimiento	6
A . Extracción de DNA	6
B . Preparo de los Reactivos	6
C . Dilución de lo Patrón Cuantitativo	7
D . Preparo de la PCR	8
E . Definciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real	8
F . Validación de lo Resultado	9
G. Interpretación de lo Resultado	10
Limitaciones del Proceso	11
Desempeño del Producto / Control de Cualidad	11
Comparación de Métodos y Especificidad Metodológica	11
Repetibilidad	11
Reproductibilidad	12
Sensibilidad Clínica	12
Sensibilidad Analítica	12
Significado Diagnóstico	12
Referencias Bibliográficas	13
Asistencia al Consumidor	13
Simbología Universal	14

FINALIDAD

Test para detección cuantitativa del DNA de *Ureaplasma urealyticum* a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Solamente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

El kit **Bio Gene Ureaplasma ur PCR** es un ensayo *in vitro* basado en la detección cuantitativa del DNA de *U. urealyticum* a través de la PCR en tiempo real.

El método de PCR en Tiempo Real es usado para amplificar el DNA del patógeno.

Un termociclador de PCR en Tiempo Real es usado para amplificar y detectar la sonda fluorescente. El software del aparato calcula la concentración del *U. urealyticum*, expresa en copias/ μ L, utilizando la curva patrón generada a partir de lo patrón cuantitativo contenido en el kit.

Reactivo	Presentación
	50 pruebas
R1	1 x 55 μ L*
R2	1 x 525 μ L*
R3	1 x 525 μ L
R4	1 x 55 μ L*
R5	1 x 600 μ L*
R6	1 x 50 μ L
R7	1 x 500 μ L*
R8	2 x 1,5 mL
R9	1 x 1 mL

*Reactivos liofilizados. Los volúmenes arriba descritos corresponden el volumen final después de la resuspensión de los reactivos como se describe en el ítem PROCEDIMIENTO, subítem B (Preparación de los Reactivos).

REACTIVOS

- R1. Solución PCR:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.
R2. Mix Taq: DNA Polimerasa, dNTPs, $MgCl_2$.
R3. Tapón Mix: TRIS-HCl.
R4. Solución PCR CI: Primer, Sonda, TRIS-HCl.
R5. Control Interno: Plásmido, TRIS-HCl.
R6. Control Negativo: TRIS-HCl.
R7. Patrón A (2×10^5 copias/ μL): Plásmido, TRIS-HCl, EDTA.
R8. Diluyente: TRIS-HCl, EDTA.
R9. Agua: Agua libre de DNase/RNase.

EQUIPAMIENTOS E INSUMOS OPERACIONALES**Materiales contenidos en el kit:**

- Reactivos descritos en el cuadro anterior.
- Instrucción de uso (manual).

Materiales necesarios, pero no contenidos en el kit:

- 1- Sistema óptico programable de detección de fluorescencia (Termociclador de PCR en Tiempo Real).
- 2- Cámara del flujo laminar.
- 3- Tubos para reacción de PCR o placa de PCR.
- 4- Guantes de látex desechables libres de polvo o material similar.
- 5- Microcentrífuga (3.000 - 12.000 rpm).
- 6- Vórtice.
- 7- Micropipetas y punteras esterilizadas con filtro (0,5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL).
- 8- Kit para extracción de ácidos nucleicos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento es de -20 (-10 a -30°C).

Después de resuspensión de los reactivos liofilizados, el producto es estable por 6 meses a partir de la fecha de resuspensión. Se debe evitar el congelamiento y descongelamiento.

El transporte puede realizarse a temperaturas entre 2 y 30°C. Mantener al abrigo de la luz y evitar humedad.

CUIDADOS ESPECIALES

1- Solamente para el uso diagnóstico *in vitro* profesional.

2- Seguir con rigor la metodología propuesta para la obtención de resultados exactos.

3- Manipular y desechar todas las muestras biológicas, reactivos y materiales utilizados para la realización del ensayo como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Evite contacto directo con las muestras biológicas y los reactivos. Evitar derrames o aerosol. Los residuos deben ser manipulados y desechados de acuerdo con las medidas de seguridad adecuadas.

4- Procedimientos de biología molecular, tales como la extracción de ácidos nucleicos, transcripción inversa, amplificación y detección requieren personal calificado para evitar el riesgo de resultados errados, especialmente debido a la degradación de ácidos nucleicos contenidos en las muestras o contaminación de la muestra por productos de amplificación.

5- Es necesario disponer de áreas separadas para la extracción/preparación de reacciones de amplificación y para la ampliación/detección de productos amplificados. Nunca introducir un producto de amplificación en el área destinada para la extracción o preparación de productos de amplificación.

6- Todas las muestras y reactivos deben ser manipulados debajo de una cámara de flujo laminar. Las pipetas deben ser usadas con punteras con filtro. Las punteras empleados deben ser estériles, libres de DNases y RNases.

7- Evitar el congelamiento y descongelamiento repetido de los reactivos.

8- Almacenar las muestras de DNA a -20°C, caso no fueran utilizadas inmediatamente.

9- No usar el kit después de la fecha de vencimiento.

10- Se recomienda la aplicación de la ley local, estatal y federal de protección ambiental para la eliminación de reactivos y material biológico se hace de acuerdo con la legislación vigente.

11- Para obtener información relacionada con la seguridad biológica o en caso de accidentes con el producto, consultar la FISPQ (Ficha de Informaciones de la Seguridad de Productos Químicos) disponibles en el site www.bioclin.com.br o solicitando a través del SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.

12- No utilice el producto en caso de daños en su embalaje.

13- Es esencial que los instrumentos y equipos utilizados estén adecuadamente calibrados y sometidos a mantenimientos periódicos.

MUESTRAS

Este kit puede ser utilizado con muestras de DNA extraídas de hisopos genitales o uretrales. Otros tipos de muestras pueden ser utilizados de acuerdo con las recomendaciones de médico o de laboratorio.

Las muestras deben ser colectadas de acuerdo con las recomendaciones del laboratorio para pruebas moleculares y resuspendidas en medio de transporte o salino. Deben ser transportadas y almacenadas a 2-8°C hasta 3 días¹.

Utilizar muestras de DNA adecuadas a la amplificación por PCR con pureza y concentración adecuadas. Se debe evitar el congelamiento y descongelamiento repetido.

Obs: Concentración de muestra de DNA sugerida **5ng/μL**.

PROCEDIMIENTO

A. Extracción de DNA

Los ácidos nucleicos (DNA) de las muestras deben ser extraídos siguiendo las instrucciones de uso del kit escogido. Para controlar el proceso de extracción, el **Control Interno (R5)** debe ser preparado y añadido a las muestras durante la extracción, como se describe a abajo:

- 1- Adicionar 4μL de **Control Interno (R5)** a cada tubo conteniendo las muestras ya resuspendidas en tapón de extracción / lisis.
- 2- Completar el proceso de extracción de acuerdo con las instrucciones de uso del kit de extracción.

Obs: Nunca adicionar el Control Interno directamente a la muestra biológica pura, pues puede resultar en degradación del mismo.

B. Preparación de los Reactivos

- 1- Centrifugar (pulso *spin*) los reactivos: **Solución de PCR (R1)**, **Solución de PCR CI (R4)**, **Control Interno (R5)** y **Patrón A (R7)** antes de la abertura de los microtubos.

2- Resuspender el reactivo **Mix taq (R2)** con 525µL del reactivo **Tapón Mix (R3)**.

3- Resuspender los reactivos, **Solución de PCR (R1)**, **Solución de PCR CI (R4)** y **Control Interno (R5)** con el reactivo **Agua (R9)** de acuerdo con la tabla abajo:

Reactivo	Volumen de Agua (R9)
Solución PCR (R1)	55µL
Solución PCR CI (R4)	55µL
*Control Interno (R5)	600µL

*Los reactivos R5 y R7 contienen molde de DNA. Ellos deben ser manipulados (resuspender) en área apropiada para evitar la contaminación de los demás reactivos.

C. Dilución de lo Patrón Cuantitativo

1- Resuspender el **Patrón A (R7)** con 500 µL del **Diluyente (R8)**.

2- Separar 3 microtubos (no fornecido en el kit) adecuados para la dilución seriada del **Patrón A (R7)**.

3- Pipetar 90µL del **Diluyente (R8)** en cada microtubo y nombrarlos como B, C y D respectivamente.

4- En seguida, pipetar 10µL del **Patrón A (R7)** en el microtubo B y homogenizar.

5- Cambiar la puntera y pipetar 10µL del microtubo B en el microtubo C y homogenizar.

6- Cambiar la puntera y pipetar 10µL del microtubo C en el microtubo D y homogenizar.

7- Al final de la dilución tenemos patrones A, B, C y D con las siguientes concentraciones:

Patrón A – 2×10^5 copias /µL

Patrón B – 2×10^4 copias /µL

Patrón C – 2×10^3 copias /µL

Patrón D – 2×10^2 copias /µL

D. Preparación de la PCR

1- Separar previamente los microtubos a ser utilizados, de acuerdo con el número de muestras y patrones cuantitativos a ser analizados.

2- Para cada muestra/patrón/control preparar la solución de PCR final.

3- Cada reacción debe contener:

- 10µL de **Mix Taq (R2)** provisto en el kit).
- 1µL de **Solución PCR (R1)** provisto en el kit).
- 1µL de **Solución PCR CI (R4)** provisto en el kit).
- 3µL de **Agua (R9)** provisto en el kit).

Los volúmenes anteriores se utilizan para la 1 reacción. Para la preparación de muchas reacciones se debe multiplicar el volumen de cada reactivo por el número de reacciones requeridas.

4- Adicionar 5µL del DNA extraído de la muestra (concentración sugerida 5ng/µL) o 5µL de los Patrones Cuantitativos o 5µL de lo **Control Negativo (R6)** en los tubos predeterminados.

5- Homogenizar bien.

6- Observe que el volumen total de la reacción es de 20µL y cada corrida de PCR debe incluir los controles relevantes (Control Negativo, Control Interno y Patrones Cuantitativos).

7- Transporte los tubos para el termociclador y vaya para la sección E (Definiciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real).

E. Definiciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real

Verificar el manual de operaciones del equipamiento de PCR en tiempo real para la programación de lo experimento.

1- Defina el tipo de experimento:

Pruebas Cuantitativas con Curva Patrón.

2- Defina los detectores (sondas) fluorescentes como:

Detector Ureaplasma ur	Detector Control Interno
“reporter 1” = FAM	“reporter 2” = VIC

Obs: El Control Negativo y los Patrones Cuantitativos no presentan el Control Interno (reporter 2), pues el mismo es utilizado para control de extracción y amplificación de las muestras.

3- Defina los Patrones Cuantitativos (standards) como:

Patrón A – 2×10^5 copias / μ L

Patrón B – 2×10^4 copias / μ L

Patrón C – 2×10^3 copias / μ L

Patrón D – 2×10^2 copias / μ L

4- Defina las condiciones de los ciclos:

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95°C	15 minutos	1
2	95°C	10 segundos	50
	60°C	60 segundos	

Defina “Colección de datos” como “etapa 2, paso 2 (60@0:60)”.

F. Validación de lo Resultado

1- Curva Patrón

Curva Patrón	Rango Permitido	Amplificación / Detección
Coeficiente de correlación (R^2)	$0,99 \leq R^2 \leq 1,00$	Válida

Si el valor de R^2 no queda entre los límites del rango permitido, el resultado es considerado inválido y la prueba debe ser repetida.

2- Control Negativo

CT Control Negativo		Resultado	Detección
FAM	VIC		
Indeterminado	Indeterminado	Negativo	Válida

3- Muestras

Ureaplasma ur		Resultado	Detección
FAM	VIC		
Concentración determinada	$25 \leq CT \leq 31$	Positivo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Positivo	Inválido*
Concentración indeterminada	$25 \leq CT \leq 31$	Negativo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Negativo	Inválido*

*El valor de CT de Control Interno varía con las condiciones del proceso, tales como la eficiencia de la extracción de DNA/RNA, la concentración de las muestras y los ajustes del termociclador. Por lo tanto, estas condiciones deben ser evaluadas cuando los valores de CT no son apropiados y los resultados relevantes se pueden validar.

Ejemplo: Las muestras con un alto número de copias de DNA/RNA pueden, en algunos casos, inhibir la amplificación del Control Interno resultante en el valor de CT fuera del rango óptimo, este resultado no invalida el test.

Si los requisitos mencionados no fueran cumplidos, el ensayo es considerado inválido y el test debe ser repetido.

G. Interpretación de lo Resultado

El kit es capaz de detectar 10 a 1.000.000 copias por reacción.

El software del aparato calcula automáticamente la concentración de las muestras.

Ejemplo: Si el programa muestra una concentración como 2.00E+005, entonces la concentración de la muestra será 2.0×10^5 copias / μ L.

Resultado de la Muestra en Copias/ μ L (FAM)	Copias por Reacción
$\geq 1 \times 10^6$	$> 1.000.000$
$2 \leq \text{Cantidad} \leq 9 \times 10^5$	Cantidad obtenida
< 2	< 10

Si el DNA del patógeno no es detectado, esto no excluye la presencia de infección cuando el título del patógeno está por debajo de lo límite de detección de este kit.

Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable, no siendo el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

Los resultados deben ser evaluados teniendo en cuenta los datos clínicos y las pruebas de laboratorio del paciente.

LIMITACIONES DEL PROCESO

Contaminaciones cruzadas que ocurren durante la colecta de la muestra, procesamiento, transporte y almacenamiento podrán ocasionar resultados falsos.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO CONTROL DE CALIDAD

Exactitud

COMPARACIÓN DE MÉTODOS Y ESPECIFICIDAD METODOLÓGICA

El kit **Bio Gene Ureaplasma ur PCR** fue comparado con otro kit para la cuantificación del DNA del *U. urealyticum*. Fueron realizadas 25 análisis y los resultados fueron evaluados. La diferencia entre los valores de las muestras, obtenidos en los dos productos fue $\leq 0,5$ log. Con estos resultados se puede concluir que lo kit presenta buena especificidad metodológica.

Precisión

REPETIBILIDAD

Fueron realizadas 10 dosificaciones sucesivas de 2 muestras positivas con concentraciones distintas, los resultados están mostrados en la tabla abajo:

	Muestra 1	Muestra 2
Concentración Promedio (Log)	4,337	2,402
Desvio Patrón (Log)	0,093	0,082
Coeficiente de Variación (%)	2,157	3,415

REPRODUCIBILIDAD

Fueron realizadas 10 dosificaciones durante 3 días consecutivos con 1 muestra, obteniéndose los siguientes resultados:

	Día 1	Día 2	Día 3
Concentración Promedio (Log)	2,402	2,401	2,395
Desvio Patrón (Log)	0,082	0,084	0,090
Coeficiente de Variación (%)	3,415	3,514	3,781

Sensibilidad Clínica

El kit **Bio Gene Ureaplasma ur PCR** presentó sensibilidad clínica de 99,9% y especificidad clínica de 99,9%.

Método		Datos Clínicos		Total
Bio Gene Ureaplasma ur PCR	Resultado	Positivo	Negativo	
	Positivo	25	0	25
	Negativo	0	25	25
RESULTADO TOTAL		25	25	50

Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica encontrada en los estudios de desempeño fue 0,15 log, o sea, la técnica fue capaz de detectar aproximadamente 7 moléculas alvos en 5µL del producto de extracción del DNA adicionado a reacción de amplificación.

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

Ureaplasma urealyticum, perteneciente a la familia *Mycoplasmataceae*, es el agente responsable de 20 a 30% de los casos de uretritis no-gonocócica. En los hombres causa principalmente uretritis y en las mujeres puede causar infección en el tracto genitourinario, infertilidad y complicaciones del embarazo, como parto prematuro. En neonatos puede resultar en meningitis y neumonía. La transmisión ocurre por

contacto sexual y vía perinatal. El diagnóstico precoz de la *U. urealyticum* permite el direccionamiento adecuado del tratamiento, evitando así la progresión de la enfermedad con secuelas para el huésped. Luego, la detección cuantitativa de *U. urealyticum* por PCR en tiempo real tiene grande importancia por ser un método sensible, preciso y ágil.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
2. Mallard, K; Schopfer, K; Bodmer, T. Development of real-time PCR for the differential detection and quantification of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. J Microbiol Methods. 2005 Jan;60(1):13-9.
3. Xiao, L; Glass, J.I; Paralanov, V. et al. Detection and characterization of human *Ureaplasma* species and serovars by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2010 Aug;48(8):2715-23.
4. Yi, J; Yoon, B.H; Kim, E.C. Detection and biovar discrimination of *Ureaplasma urealyticum* by real-time PCR. Mol Cell Probes. 2005 Aug;19(4):255-60.

ASISTENCIA AL CONSUMIDOR

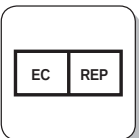
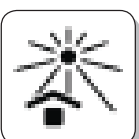
Servicio de Asesoría al Cliente

Tel.: 0800 031 5454

E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de registro del kit Bio Gene *Ureaplasma ur PCR* en la ANVISA:
10269360252

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

	NÚMERO DEL CATÁLOGO		ELABORADO POR
	NÚMERO DE LOTE		CONTROL
	FECHA DE FABRICACIÓN		CONTROL POSITIVO
	ESTABLE HASTA (último día del mês)		CONTROL NEGATIVO
	TEMPERATURA LIMITE (conservar a)		RIESGO BIOLÓGICO
	CONTENIDO SUFICIENTE PARA <N> TESTES		INFLAMABLE
	CONSULTAR INSTRUCCIONES DE USO		CORROSIVO
	DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	EUROPEA REPRESENTANTE AUTORIZADO		MARCADO CE
	PROTEGER DEL LUZ Y CALOR		NO UTILICE SI EL EMBALAJE ESTA DAÑADA



Ureaplasma ur PCR

English . Usage instructions

REF K178

Review: May/2015

INDEX

Function	3
Principle of Action	3
Presentation	3
Reagents	4
Equipments and Operational Inputs	4
Transportation and Storage Conditions	4
Special Care	5
Samples	5
Process Description	6
A . DNAExtraction	6
B . Preparation of the reagents	6
C . Dilution of Quantitative Standard	7
D . PCR Preparation	7
E . Thermocycler settings for Real-Time PCR	8
F . Result Validation	9
G . Result Interpretation	10
Process Limitations	11
Product Performance / Quality Control	11
Comparison of Methods and Methodology Specificity	11
Repeatability	11
Reproducibility	12
Clinical Sensitivity	12
Analytical Sensitivity	12
Diagnostic Significance	12
Bibliographic References	13
Customer Service	13
Universal Symbology	14

FUNCTION

Quantitative detection of *Ureaplasma urealyticum* DNA using real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) technology. Designed for *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF ACTION

The **Bio Gene UREAPLASMA UR PCR** test is a *in vitro* assay based on the quantitative detection of *U. urealyticum* DNA by real-time PCR.

The Real Time PCR method is used to amplify the pathogen DNA.

A thermocycler for Real Time PCR is use to amplify and detect the fluorescent probe. Software calculates the *U. urealyticum* DNA concentration, expressed in copies/μL, using the standard curve generated from the quantitative standard, contained in the kit.

Reagent	Presentation
	50 Tests
R1	1 x 55μL*
R2	1 x 525μL*
R3	1 x 525μL
R4	1 x 55μL*
R5	1 x 600μL*
R6	1 x 50μL
R7	1 x 500μL*
R8	2 x 1,5 mL
R9	1 x 1 mL

*Lyophilized reagents. The volumes described above refer to the final volume after the reagents resuspension, as described in the item PROCESS DESCRIPTION, subitem B (Preparation of the Reagents).

REAGENTS

R1. PCR Solution: Primer, probe, TRIS-HCl.

R2. Mix Taq: DNA Polymerase, dNTPs, MgCl₂.

R3. Mix Buffer: TRIS-HCl.

R4. IC PCR Solution: Primer, probe, TRIS-HCl.

R5. Internal Control: Plasmid, TRIS-HCl.

R6. Negative Control: TRIS-HCl.

R7. Standard A (2×10^5 copies/ μ L): Plasmid, TRIS-HCl, EDTA.

R8. Diluent: TRIS-HCl, EDTA.

R9. Water: DNase/RNase free water.

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS**Materials in the kit:**

- Reagents described in the previous item
- Usage instructions (manual)

Materials needed but not contained in the kit:

- 1- Real-time PCR thermocycler.
- 2- Laminar flow hood.
- 3- PCR reaction tubes or PCR reaction plate.
- 4- Powder free latex gloves or similar material.
- 5- Microcentrifuge (3,000 - 12,000 rpm).
- 6- Vortex.
- 7- Micropipettes and sterile filter pipette tips (0.5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L).
- 8- Nucleic acid extraction kit.

TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS

The required storage temperature is -20°C (-10 to -30°C).

After resuspension of lyophilized reagents, the product is stable for 6 months from the date of resuspension. Avoid freezing and thawing. The kit may be transported between 2-30°C. Protect from light and avoid moisture.

SPECIAL CARE

1- For professional *in vitro* diagnostic use only.

2- Strictly follow the methodology proposed to obtain accurate results.

3- Handle and dispose of all biological samples, reagents and materials as it contain infectious agents. Avoid direct contact with biological samples and reagents. Avoid spills and aerosol. Handle and dispose of wastes in accordance with appropriate security procedures.

4- It is require skilled personnel for the molecular biology procedures in order to minimize the risk of erroneous results, degradation of nucleic acids contained in the samples or even sample contamination by amplicons.

5- It is necessary to have separate areas for the extraction / preparation of amplification reactions and for the amplification / detection of amplified products. Never introduce an amplification product in the area intended for the extraction or preparation of amplification products.

6- All samples and reagents should be handled inside a laminar flow hood. It is necessary to use sterile and DNase/RNase free filter pipettes tips.

7- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents.

8- Store the DNA samples at -20°C in case they will not be used immediately.

9- Do not use reagents after expiration date.

10- We recommend applying the local, state and federal rules for environmental protection, so that disposal of reagents and biological material can be made in accordance with current legislation.

11- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the MSDS (Material Safety Data Sheet) available on the website www.bioclin.com.br or upon request by the SAC (Customer Advisory Service) of Quibasa.

12- Do not use the product in case of damaged packaging.

13- It is essential that the instruments and equipments used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

SAMPLES

This kit should be used with DNA samples extracted from genital or urethral swab. Other types of samples can be used according to medical recommendations or to laboratory.

Samples must be collected according to the laboratory's recommendations for molecular tests and resuspended in transport medium or saline. They must be transported and stored between 2 and 8°C for up to 3 days¹.

Use DNA samples suitable for PCR amplification with adequate purity and concentration. Avoid repeated freezing and thawing of the samples.

Note: Suggested DNA sample concentration **5ng/μL**.

PROCESS DESCRIPTION

A. DNA Extraction

The nucleic acids (DNA) must be extracted in accord to the procedure of the chosen extraction kit.

For control of the extraction process, the **Internal Control (R5)** must be prepared and added to the samples during the extraction as described below:

- 1- Add 4μL of the **Internal Control (R5)** to each tube containing the resuspended samples in extraction/lysis buffer.
- 2- Complete the extraction procedure according to the usage instructions of the extraction kit.

Note: Never add the Internal Control directly to pure biological sample. This may result in degradation of the sample.

B. Preparation of the Reagents

- 1- Before open, spin (*spin* pulse) each of the following reagents: **PCR Solution (R1)**, **IC PCR Solution (R4)**, **Internal Control (R5)** and **Standard A (R7)**.
- 2- Resuspend the **Mix Taq (R2)** reagent in 525μL of Reagent **Mix Buffer (R3)**.
- 3- Resuspend the following reagents: **PCR Solution (R1)**, **IC PCR Solution (R4)** and **Internal Control (R5)** with **Water (R9)** reagent, in according to the following table:

Reagent	Volume of Water (R9)
PCR Solution (R1)	55 μL
IC PCR Solution (R4)	55 μL
*Internal Control (R5)	600 μL

*R5 and R7 reagents contain DNA template. They need to be handle (resuspended) in a separated area from the area designed to prepare other reagents in order to prevent contamination of other reagents.

C. Dilution of Quantitative Standard

- 1-** Resuspend **Standard A (R7)** with 500 µL of **Diluent (R8)**.
- 2-** Select 3 microtubes (not supplied in the kit) suitable for serial dilution of **Standard A (R7)**.
- 3-** Pipette 90µL of the **Diluent (R8)** in each microtube and name them as B, C and D respectively.
- 4-** Pipette 10µL of **Standard A (R7)** in microtube B and mix.
- 5-** Replace the tip and pipette 10µL of microtube B in microtube C and mix.
- 6-** Replace the tip and pipette 10µL of microtube C in microtube D and mix.
- 7-** At the end of dilution procedure, it will be available 4 standards with the following concentrations:

Standard A - 2×10^5 copies/µL

Standard B - 2×10^4 copies/µL

Standard C - 2×10^3 copies/µL

Standard D - 2×10^2 copies/µL

D. PCR Preparation

- 1-** Prior beginning the assay, select sufficient number of microtubes to be used on the reaction, in accord to the number of samples and quantitative standards to be used.
- 2-** Prepare the final PCR solution for each sample / standard / control to be tested.
- 3-** Each reaction should contain:
 - 10µL **Mix Taq (R2)** provided in the kit).
 - 1µL **PCR Solution (R1)** provided in the kit).
 - 1µL **IC PCR Solution (R4)** provided in the kit).
 - 3µL **Water (R9)** provided in the kit).

The volumes indicated above are used for 1 reaction. To prepare more reactions, the volume of each reagent must be multiplied by the number of required reactions.

4- Add 5µL of extracted DNA sample (the suggested concentration is 5 ng/µL) or 5µL of Quantitative Standards or 5µL of **Negative Control (R6)** in previously determined tubes.

5- Mix well.

6- The total volume of the reaction is 20µL. Each PCR run should include the relevant controls: Negative Control, Internal Control and Quantitative Standards.

7- Transport the tubes to the thermocycler and go to the section E (Thermocycler Settings for Real-Time PCR).

E. Thermocycler Settings for Real-Time PCR

Check the operation manual of the Real-time PCR thermocycler to program the experiment.

1- Set the type of experiment:

Quantitative Test with Standard Curve.

2- Set the fluorescent probes:

Detector Ureaplasma ur	Detector Internal Control
“reporter 1” = FAM	“reporter 2” = VIC

Note: The Negative Control and Quantitative Standards do not present the Internal Control (reporter 2), because it is used for extraction and amplification control of the samples.

3- Set the quantitative standards:

Standard A - 2×10^5 copies/µL

Standard B - 2×10^4 copies/µL

Standard C - 2×10^3 copies/µL

Standard D - 2×10^2 copies/µL

4- Set the cycling conditions:

	Temperature	Time	Cycles
1	95°C	15 minutes	1
2	95°C	10 seconds	50
	60°C	60 seconds	

Set “Data Collection” as “stage 2, step 2 (60@0:60)”.

F. Result Validation**1- Standard Curve**

Standard Curve	Permitted Range	Amplification / Detection
Correlation Coeficiente (R^2)	$0,99 \leq R^2 \leq 1,00$	Valid

If the R^2 value does not fall within the limits of range, the result must be considered invalid and the test must be repeated.

2- Negative Control

CT Negative Control		Result	Detection
FAM	VIC		
Undetermined	Undetermined	Negative	Valid

3- Samples

Ureaplasma ur		Result	Detection
FAM	VIC		
Determined concentration	$25 \leq CT \leq 31$	Positive	Valid
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Positive	Invalid*
Undetermined concentration	$25 \leq CT \leq 31$	Negative	Valid
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Negative	Invalid*

*The CT values of Internal Control vary with the process conditions, as the extraction efficiency of the DNA/RNA, the concentration of the samples and the thermocycler settings. Therefore, these conditions must be evaluated when the CT values are not appropriated and, in case it is relevant, the results can be validated.

Example: In some cases, the samples with high numbers of copies of DNA / RNA can inhibit the amplification of the Internal Control, resulting in CT value outside the optimal range, this does not invalidate the test results.

If the above requirements are not achieved, the assay must be considered invalid and must be repeated.

G. Result Interpretation

This kit is able to detect from 10 to 1.000.000 copies of DNA per reaction. The thermocycler software calculates automatically the samples concentration.

Example: If the program shows a concentration of 2.00E+005. This means that the sample concentration is 2.0×10^5 copies/ μ L.

Sample Result in Copies/ μ L (FAM)	Copies per Reaction
$\geq 1 \times 10^6$	$> 1.000.000$
$2 \leq \text{Quantity} \leq 9 \times 10^5$	Quantity obtained
< 2	< 10

The non-detection of the pathogen DNA does not exclude the presence of infection when the pathogen title is below the detection limit of this kit. The results provided by this kit must be interpreted by the medical professional responsible, not being the only parameter for the determination of diagnosis and/or treatment of the patient.

The results obtained must be evaluated considering the clinical data and laboratory tests of the patient.

PROCESS LIMITATIONS

Cross contamination that eventually occurs during the sample collection, processing, transportation and storage may give false results.

PRODUCT PERFORMANCE

QUALITY CONTROL

Accuracy

COMPARISON OF METHODS AND METHODOLOGY SPECIFICITY

The **Bio Gene Ureaplasma ur PCR** test was compared with another test for the quantification of the *U. urealyticum* DNA. 25 analyzes were performed and the results were evaluated. Comparing the two tests, the difference between the results obtained was ≤ 0.5 log. This shows that the test has good methodological specificity.

Precision

REPEATABILITY

The repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 2 positive samples with different concentrations, obtaining the following results:

	Sample 1	Sample 2
Average Concentration (Log)	4,337	2,402
Standard Deviation (Log)	0,093	0,082
Coefficient of Variation (%)	2,157	3,415

REPRODUCIBILITY

The reproducibility was calculated from 10 successive determinations for 3 consecutive days, using 1 sample with different concentrations, obtaining the following results:

	Day 1	Day 2	Day 3
Average Concentration (Log)	2,402	2,401	2,395
Standard Deviation (Log)	0,082	0,084	0,090
Coefficient of variation (%)	3,415	3,514	3,781

Clinical Sensitivity

The **Bio Gene Ureaplasma ur PCR** showed clinical sensitivity of 99.9% and a clinical specificity of 99.9%.

Method		Clinical Data		Total
Bio Gene Ureaplasma ur PCR	Result	Positive	Negative	
	Positive	25	0	25
	Negative	0	25	25
TOTAL		25	25	50

Analytical Sensitivity

It was found in the performance study that the analytical sensitivity of the kit is 0,15 log. This means the assay is capable to detect approximately 7 target molecules in 5µL DNA extraction product, used on the amplification reaction.

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Ureaplasma urealyticum belongs to Mycoplasmataceae family and is the agent responsible for 20-30% of cases of non-gonococcal urethritis. In men it mainly causes urethritis and in women it can cause genitourinary tract infection, infertility and pregnancy complications such as premature birth. In neonates it can result in meningitis and pneumonia. The transmission occurs

through sexual contact or perinatally. Early diagnosis of *U. urealyticum* allow proper direction of the treatment, avoiding progression of the disease with consequences for the host. Because of that, the quantitative detection of *U. urealyticum* by real time PCR is very important since it is a sensitive, precise and responsive method.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
2. Mallard, K; Schopfer, K; Bodmer, T. Development of real-time PCR for the differential detection and quantification of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. J Microbiol Methods. 2005 Jan;60(1):13-9.
3. Xiao, L; Glass, J.I; Paralanov, V. et al. Detection and characterization of human *Ureaplasma* species and serovars by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2010 Aug;48(8):2715-23.
4. Yi, J; Yoon, B.H; Kim, E.C. Detection and biovar discrimination of *Ureaplasma urealyticum* by real-time PCR. Mol Cell Probes. 2005 Aug;19(4):255-60.

CUSTOMER SERVICE

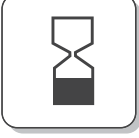
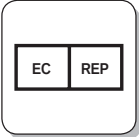
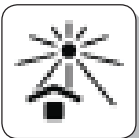
Customer Advisory Service

Phone: 0800 031 5454

E-mail: sac@bioclin.com.br

ANVISA registration for Bio Gene *Ureaplasma ur* PCR: 10269360252

UNIVERSAL SYMBOLOGY

	CATALOG NUMBER		MANUFACTURED BY
	BATCH CODE		CONTROL
	DATE OF MANUFACTURE		POSITIVE CONTROL
	USED BY (last day of month)		NEGATIVE CONTROL
	TEMPERATURE LIMITATION (store at)		BIOLOGICAL RISK
	CONTAINS SUFFICIENT FOR <N> TESTS		INFLAMMABLE
	CONSULT INSTRUCTIONS FOR USE		CORROSIVE
	IN VITRO DIAGNOSTIC DEVICE		POISON
	EUROPEAN AUTHORIZED REPRESENTATIVE		CE MARK
	KEEP AWAY FROM SUNLIGHT		DO NOT USE IF PACKAGE IS DAMAGED

BIO **GEÑE**

Bioclin · **QUIBASA**



Rua Teles de Menezes, 92 . Belo Horizonte . MG . Brasil . CEP: 31565-130
Tel +55 31 3439 5454 . Fax +55 31 3439 5455 . www.bioclin.com.br
FARM. RESP. Sílvia Wandalsen Arndt - CRF MG 7422
C.N.P.J.: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira