

# TOXOPLASMA GONDII DNA



PCR cualitativa en tiempo real para  
detección de toxoplasma gondii

4BShopLab

## ADN DE TOXOPLASMA GONDII

### A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

El equipo de PCR en tiempo real para **ADN de toxoplasma gondii**, con código **TOXODNA.CE**, ha sido desarrollado para la detección cualitativa de ADN de toxoplasma gondii en muestras humanas (plasma y líquido amniótico) con un control simultáneo de la reacción de extracción/amplificación a través de un **Control Interno (IC)**.

El ensayo TOXODNA.CE se ha normalizado según la 1ª Norma Internacional de la OMS para Toxoplasma gondii DNA (NIBSC código 10/242) con el fin de expresar también la concentración de los controles positivo en tachyzoites/ml y en unidades internacionales (IU/ml).

El equipo se ha adaptado para el uso en termocicladores Real-Time y ABI 7500 Sequence Detection System® (software SDS, versión 1.3.1, Applied Biosystems™\*), o MX3000P (software MxPro, versión 4.01, Stratagene™\*\*\*).

\* Applied Biosystems es una marca comercial registrada y ABI PRISM® es una marca comercial de Applied Biosystems Corporation o sus filiales en EE.UU. y/o en otros países determinados.

\*\*\*Stratagene es una marca comercial registrada.

### B. INTRODUCCIÓN.

El parásito toxoplasma gondii se encuentra ampliamente distribuido en la población humana y se estima que afecta hasta a un tercio de la población mundial.

Es un protozoo intracelular obligado que pertenece al phylum Apicomplexa, subclase Coccidia, que infecta a vertebrados de sangre caliente, incluyendo al hombre.

El genoma tiene un tamaño de 80Mb aproximadamente y consta de 11 cromosomas.

La forma más importante de transmisión de la infección a humanos es a través de la ingestión de carne poco cocinada que contiene organismos enquistados.

Los animales de granja en la cadena alimentaria son importantes reservorios de T. gondii, lo cual es importante debido a la posible transmisión al hombre, y la toxoplasmosis también causa importantes pérdidas veterinarias.

La toxoplasmosis tiene un pronóstico variable, dependiendo de la interacción de muchos factores, incluyendo las funciones del sistema inmunológico.

La mayoría de las infecciones son asintomáticas o toman la forma de una enfermedad leve, autolimitada. Sin embargo, el paciente queda con una infección latente de por vida causada por la presencia de quistes en los tejidos.

La enfermedad es peligrosa cuando se contrae en el útero, y también para pacientes con inmunodeficiencia, especialmente cuando se trata de inmunidad adaptativa (p. ej., pacientes de SIDA, de leucemia o de trasplantes).

La toxoplasmosis aguda adquirida durante el embarazo puede resultar en muerte del feto o en graves complicaciones como ceguera, sordera o trastornos del sistema nervioso central. Estas complicaciones pueden manifestarse en neonatos o más tarde en niños infectados de forma congénita.

El contacto con superficies contaminadas puede constituir un peligro potencial para las mujeres embarazadas.

El diagnóstico de la toxoplasmosis normalmente se basa en la detección de anticuerpos mediante serología por ELISA, pruebas de aglutinación u otros métodos inmunométricos, como Western blot o la prueba de Sabin-Feldman.

Por su parte, las técnicas serológicas pueden ser inferiores en individuos inmunocomprometidos, en pacientes de SIDA o en casos prenatales. Con estos pacientes es pertinente el uso de PCR como herramienta de diagnóstico.

### C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El equipo TOXODNA.CE se basa en una química en tiempo real que utiliza cebadores y sondas específicas.

El **ADN de toxoplasma gondii**, recuperado de una muestra biológica en investigación en una fase de extracción, se amplifica utilizando un sistema de amplificación en tiempo real. El producto amplificado se detecta usando una sonda con tinte indicador fluorescente específica para una secuencia genómica con TOXO altamente repetida (200 a 300 veces).

El Control Interno (IC) heterólogo sirve como control de extracción/amplificación para cada muestra procesada individualmente con el fin de identificar inhibidores de la reacción. Un control positivo alto (CTRL-H) y un control positivo bajo (CTRL-L) se suministran como controles de la reacción PCR.

### D. COMPONENTES

El formato estándar del producto, código TOXODNA.CE, contiene reactivos suficientes para realizar 50 pruebas.

Componente	Etiquetado y contenido	TOXODNA.CE 50 reacciones
<b>A</b> CÓDIGO: ALL/MM4  CÓDIGO COLOR: TRANSPARENTE	Mezcla maestra	Viales n.º 1 / 0,825 ml
<b>B</b> CÓDIGO: TOXO/CB CÓDIGO COLOR: AMARILLO	Cebadores/sondas as liofilizados	Viales n.º 2 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
<b>C</b> CÓDIGO: ALL/C CÓDIGO COLOR: ROJO	Agua grado molecular	Viales n.º 2 / 1,5 ml
<b>NTC</b> CÓDIGO: ALL/NTC CÓDIGO COLOR: BLANCO	Control negativo	Viales n.º 1 / 1,5 ml
<b>CTRL-L</b> Control positivo bajo ( $4.0 \times 10^1$ tachyzoites/ml o $3.5 \times 10^1$ IU/ml)  CÓDIGO: TOXO/CTRL-L CÓDIGO COLOR: ROSA	Positivo bajo  cualitativo  liofilizado	Viales n.º 8 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
<b>CTRL-H</b> Control positivo alto ( $4.0 \times 10^4$ tachyzoites/ml o $3.5 \times 10^4$ IU/ml)  CÓDIGO: TOXO/CTRL-H CÓDIGO COLOR: VIOLETA	Positivo alto  cualitativo  liofilizado	Viales n.º 8 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
<b>IC</b> Control Interno CÓDIGO: TOXO/IC CÓDIGO COLOR: VERDE	Control interno  liofilizado	Viales n.º 2 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
Manual de instrucciones	Instrucciones de uso	1

**Nota importante:** A petición, Dia.Pro puede suministrar reactivos para 25, 100, 150 pruebas, como se indica a continuación:

1. Componente A	Vial n.º 1 / 0,4 ml	Vial n.º 2 / 0,825 ml	Vial n.º 3 // 0,825 ml
2. Componente B	Vial n.º 1	Vial n.º 4	Vial n.º 6
3. Componente C	Vial n.º 1 / 1,5 ml	Vial n.º 2 / 1,5 ml	Vial n.º 3 / 1,5 ml
4. NTC	Vial n.º 1 / 1,5 ml	Vial n.º 1 / 1,5 ml	Vial n.º 1 / 1,5 ml
5. IC	n.º 1 vial	Vial n.º 4	Vial n.º 6
6. CTRL-H	n.º 4 vial	Vial n.º 4	Vial n.º 6
7. CTRL-L	n.º 4 vial	Vial n.º 4	Vial n.º 6
8. Manual instrucc.	n.º 1	n.º 1	n.º 1
<b>Número de pruebas</b>	<b>25</b>	<b>100</b>	<b>150</b>
<b>Código</b>	<b>TOXODNA.CE.25</b>	<b>TOXODNA.CE.100</b>	<b>TOXODNA.CE.150</b>

### E. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El equipo TOXODNA.CE debe almacenarse a +2...8 °C. Una vez disueltos, el **Componente B** (código TOXO/CB) y el **Componente IC** (código TOXO/IC) se mantienen estables durante 4 meses a -20 °C. Una vez disueltos, los **Componentes de control positivo ALTO y BAJO** (código TOXO/CTRL-HIGH, TOXO/CTRL-LOW) se mantienen estables durante 2 semanas a -20 °C. Si los componentes se van a utilizar solo de forma intermitente, deberían congelarse en alícuotas. Evitar ciclos de congelación/descongelación repetidos. Solo se permite descongelar una vez.

### F. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (0,5 µl < volumen < 1000 µl)
2. Equipo de extracción de ADN
3. MG EtOH
4. PBS
5. Bloque térmico
6. Microcentrífuga
7. Racks para tubos
8. Puntas filtradas estériles con barrera contra aerosoles
9. Microtubos libres de nucleasa
10. Microtubos de 0,2 ml o microplacas PCR recomendados por los fabricantes de los instrumentos PCR en tiempo real
11. Guantes desechables, sin polvo
12. Termociclador Real-Time PCR (\*)
13. Papel absorbente.
14. Vórtex o similar.

(\*) **Atención:** Se debe realizar de forma rutinaria una calibración válida de los tintes puros (archivo del componente del espectro puro) y del fondo (archivo del componente de fondo).

### G. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. El personal técnico debe tener una amplia formación en el uso de termocicladores Real-Time, en la manipulación de reactivos para biología molecular y en los protocolos de amplificación de PCR en tiempo real.
3. El equipo debe utilizarse en un laboratorio certificado y homologado por la autoridad nacional en este campo (Ministerio de Sanidad o entidad similar) para realizar este tipo de análisis.
4. Todo el personal que participe en la realización de los ensayos deberá llevar la indumentaria protectora adecuada del laboratorio, guantes sin polvo y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
6. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire al

abrir los viales del equipo y los componentes, y durante la realización del ensayo.

7. Los componentes A y B son sensibles a la luz. Protegerlos de la exposición a la luz intensa.
  8. Evitar vibraciones de la superficie de la mesa de trabajo donde se realiza la prueba.
  9. Tras la recepción, conservar el equipo a una temperatura entre 2,8 °C en un refrigerador o en una cámara de refrigeración con control de temperatura.
  10. No intercambiar componentes de diferentes lotes. ni tampoco de diferentes equipos del mismo lote.
  11. Comprobar que los reactivos no contengan precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.
  12. Evitar contaminación cruzada entre muestras usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.
  13. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.
  14. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase externo.
  15. Tratar todas las muestras como potencialmente infectivas. Todas las muestras de suero/plasma humanos deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha recomendado el Centro de control de enfermedades de Atlanta, EE.UU., y de conformidad con lo publicado por los Institutos nacionales de la salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
  16. Almacenar y extraer las muestras separadas de los demás reactivos y usar un espacio separado para su manipulación
  17. Disolver los reactivos liofilizados con la cantidad correcta, indicada en las etiquetas, de componente C (código: ALL/C) suministrado con el equipo.
  18. Llevar a cabo todas las operaciones lo más rápido posible, manteniendo los componentes en hielo o en un bloque de refrigeración.
  19. El flujo de trabajo en el laboratorio debe ser unidireccional, comenzando en la zona de extracción y avanzando hasta la zona de amplificación y de análisis de datos. No devolver las muestras, equipos o reactivos a la zona donde se hayan realizado las fases anteriores.
  20. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de los componentes líquidos y para la transferencia de los componentes a los diferentes equipos automatizados para evitar contaminación cruzada.
  21. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. Especialmente, los desechos líquidos procedentes de los procedimientos de extracción de muestras deben ser tratados como material potencialmente infeccioso y deben ser inactivados antes de su eliminación. No poner en contacto los desechos de la extracción con lejía.
  22. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
  23. Otros materiales de desecho generados (por ejemplo: puntas usadas para las muestras) deben ser manipulados como potencialmente infecciosos y deben eliminarse de acuerdo con las directivas y leyes nacionales sobre los residuos de laboratorio.
- ### H. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES
1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el plasma según las técnicas estándar de los laboratorios de análisis clínicos.
  2. La recogida del líquido amniótico debe realizarse después de 16 semanas desde el inicio de la gestación, bajo control de ultrasonido continuo, siguiendo las pautas clínicas establecidas y aprobadas.
  3. No se ha detectado ninguna influencia en la preparación de la muestra con citrato, EDTA.

Atención: La heparina (>10 IU/ml) afecta a las reacciones de PCR. Las muestras recogidas en tubos que contengan heparina como anticoagulante no deben usarse. Por lo tanto, las muestras de pacientes heparinizados no deben usarse.

4. Evitar cualquier adición de conservantes a las muestras.
5. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados.
6. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados. al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
7. El plasma y el líquido amniótico, si no se usan inmediatamente, deben almacenarse a una temperatura de -20 °C a -80 °C tras la extracción. Las muestras pueden almacenarse a -80 °C durante varios meses. Las muestras congeladas no se deben descongelar más de una vez, ya que podría afectar al resultado de la prueba.
8. Las muestras de plasma para extracción de ADN deben recogerse en EDTA, de acuerdo con los procedimientos comunes del laboratorio, y transportarse y almacenarse a una temperatura de +2 °C a +8 °C durante un período máximo de 4 horas. Las muestras de plasma pueden almacenarse a -20 °C durante un período máximo de 30 días, o a -70 °C para períodos más largos.
9. Para un almacenamiento óptimo de las muestras, recomendamos dividir las en varias alícuotas (volumen mínimo 300 µl) y almacenarlas a -20 °C durante un período máximo de 30 días, o a -70 °C para períodos más largos. Evitar ciclos de congelación/descongelación repetidos.
10. Las muestras de líquido amniótico deben centrifugarse antes de la extracción de ADN y disolverse en PBS, de acuerdo con los procedimientos comunes del laboratorio. Las muestras de líquido amniótico deben transportarse y almacenarse a una temperatura de +2 °C a +8 °C durante un máximo de 4 horas. Las muestras de líquido amniótico pueden almacenarse a -20 °C durante un período máximo de 30 días, o a -70 °C para períodos más largos.
11. Al utilizar muestras congeladas, descongelar las muestras justo antes de la extracción para evitar casos de degradación de los ácidos nucleicos.
12. Las muestras de sangre periférica para extracción de ADN deben recogerse en EDTA, de acuerdo con las indicaciones del laboratorio, y transportarse y almacenarse a una temperatura de +2 °C a +8 °C durante un período máximo de 3 días. No congelar todas las muestras de sangre periférica para evitar lisis celular y pérdida de título viral.

## I. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

### Mezcla maestra:

Componente A. Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar y centrifugar brevemente para recoger el volumen completo.

**ADVERTENCIA:** El componente A es sensible a la luz. Protegerlo de la exposición a la luz intensa.

### Cebadores/Sondas:

#### Componente B.

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm.
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el componente B liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial.
- Mantener en la parte superior de la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C)
- Mezclar brevemente con un vórtex

**ADVERTENCIA:** El componente B es sensible a la luz. Protegerlo de la exposición a la luz intensa.

### Agua grado molecular:

Componente C. Listo para el uso.

### Control negativo:

NTC. Listo para el uso.

### Control positivo:

#### Componente CTRL-L.

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm.
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el CTRL-L liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial.
- Mantener en la parte superior de la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C)
- Mezclar brevemente con un vórtex

#### Componente CTRL-H.

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm.
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el CTRL-H liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial.
- Mantener en la parte superior de la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C)
- Mezclar brevemente con un vórtex

### Control interno:

#### IC

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el IC liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial.
- Mantener en la parte superior de la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C)
- Briefly vortex

## L. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

1. Las **micropipetas** deben calibrarse y deben someterse a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (alcohol de uso doméstico, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 5%.
2. **Dispositivo de extracción:** El equipo TOXODNA.CE ha sido diseñado para usarse sólo con QIAamp DNA Minikit, código 51306, (QIAGEN) y NucleoSpin Blood kit, código: 740951 (Macherey-Nagel). Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso suministradas por los fabricantes.
3. **Termocicladores Real-Time.** El equipo TOXODNA.CE ha sido diseñado para usarse solo con los termocicladores Real Time ABI 7500, software SDS, versión 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, software MxPro, versión 4.01 (Stratagene). Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso de los instrumentos suministradas por los fabricantes.

## M. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa de la caja del equipo. No usar si ha caducado.
2. Comprobar que los reactivos líquidos no estén contaminados con partículas o agregados observables a simple vista. Comprobar que en la parte inferior de los viales de los componentes liofilizados haya un agregado bien formado. Comprobar que no se han producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte.
3. Disolver los componentes liofilizados con la cantidad adecuada de componente C (agua grado molecular) como se describe en la sección correspondiente (I).
4. Encender los termocicladores, comprobar la configuración y asegurarse de que se usa el protocolo de ensayo correcto.
5. Seguir estrictamente los manuales de los instrumentos suministrados por los fabricantes para la configuración correcta de los termocicladores Real-Time.
6. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
7. Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
8. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

## N. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse de acuerdo con lo indicado a continuación.

### N.1 Extracción de ADN

La fase de extracción del ADN genómico de toxoplasma gondii debe realizarse exclusivamente en combinación con los siguientes equipos:

Material	Descripción	Código del equipo	Fabricante
Plasma/líquido amniótico	Nucleospin Blood	740951	MN™
Plasma/líquido amniótico	QIAamp DNA mini kit®	51306	Qiagen™

**Nota:** Antes del aislamiento de ADN, centrifugar las muestras de líquido amniótico (10.000 g, 5 minutos), retirar el sobrenadante y disolver el precipitado en 200 µl de PBS.

El aislamiento de ADN debe realizarse sólo de acuerdo con el manual de instrucciones proporcionado por el fabricante (QIAGEN™, MN™).

**ADVERTENCIA:** Los siguientes volúmenes deben usarse estrictamente en los procedimientos de extracción para ambos equipos:

**Volumen de extracción de muestras: 200 µl**  
**Volumen de elución: 100 µl**

El ADN obtenido de las muestras, no usado en la serie, debe almacenarse congelado (de -20 °C a -80 °C).

**Nota importante:** El IC del equipo TOXODNA.CE puede usarse en el procedimiento de aislamiento como control de extracción.

El valor Ct del control interno para las muestras negativas se usa para evaluar si el procedimiento de extracción de ADN se ha realizado correctamente (véase sección Q).

Para esta aplicación, añadir 5 µl de IC a la mezcla de tampón de lisis y muestra, y proceder siguiendo las instrucciones del manual proporcionado por el fabricante del equipo de extracción.

### N.2 Configuración de la reacción

El equipo TOXODNA.CE ha sido diseñado para usarse solo con ABI 7500, software SDS, versión 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, software MxPro, versión 4.01 (Stratagene).

#### N.2.1 Preparación de PCR

**Importante:** En la sección O se incluye un ejemplo de esquema de dispensación. Consúltelo antes de iniciar las operaciones que se describen a continuación.

- Preparar los componentes como se describe en la sección I;
- Preparar el número requerido de tubos de reacción o una placa de reacción de 96 pocillos para las muestras en evaluación y para el control positivo (preparado como se describe en la sección I).

**Nota importante:** Usar sólo tubos ópticos o microplacas sugeridos por los fabricantes de los termocicladores Real-Time.

- Tener en cuenta que las muestras deberían comprobarse en duplicado, siempre que sea posible;
- Incluir al menos 1 tubo para el NTC (control negativo)
- Preparar la **mezcla de amplificación** para **muestras, NTC y controles positivos (CTRL-H, CTRL-L)** según la siguiente tabla:

#### Preparación de la mezcla de amplificación

##### (IC como control de amplificación)

Número de reacciones		x1	x12
A	Mezcla maestra	12,5 µl	150 µl
B	Cebadores/Sondas	2 µl	24 µl
IC	Control Interno	0,5 µl	6 µl
Vol. total		15 µl	180 µl

**Nota importante:** Si el control interno se añadió durante el procedimiento de aislamiento del ADN, preparar la **mezcla de amplificación** para **muestras, NTC y controles positivos (CTRL-H, CTRL-L)** como se describe en la siguiente tabla:

#### Preparación de la mezcla de amplificación

##### (IC como control de extracción/amplificación)

Número de reacciones		x1	x12
A	Mezcla maestra	12,5 µl	150 µl
B	Cebadores/Sondas	2 µl	24 µl
C	Agua grado molecular	0,5 µl	6 µl
Vol. total		15 µl	180 µl

#### N.2.2 Procedimiento de amplificación

- Dispensar 15 µl de la mezcla de amplificación en cada tubo de reacción o pocillo de la microplaca
- Añadir 10 µl de las **muestras, NTC, CTRL-H y CTRL-L** a los tubos de reacción.
- Cerrar bien los tubos de reacción
- Centrifugar brevemente los tubos de reacción a 2000 rpm.
- No dejar los tubos de reacción a temperatura ambiente (RT) durante más de 30 minutos ni exponer a la luz (cubrir los tubos).

- Cargar los tubos de reacción en el soporte del bloque térmico del termociclador Real-Time.
- Tras las operaciones de configuración descritas en la sección N3 (Programación del instrumento), iniciar la serie del termociclador.

**Nota importante:** Los componentes liofilizados tras la disolución con el componente C (agua grado molecular) no estarán estables más de 3 horas. Mantener en hielo o a una temperatura de 2 °C a 8 °C.

El volumen no utilizado de Componente B, CTRL-H, CTRL-L, y de IC puede congelarse a -20 °C y usarse como se indica en el apartado E.

### N.3 Programación del instrumento

Para la programación del instrumento, consultar el manual de instrucciones del instrumento proporcionado por los fabricantes.

**Nota importante:** Para Mx3000P ajustar "Ajuste de ganancia del filtro": ROX = x1, FAM = x8, JOE = x1. (véase el manual de instrucciones del software MxPro™ QPCR, pág. 41)

#### N.3.1 Perfil térmico

El perfil térmico se indica en la siguiente tabla:

Fase	Ciclo	Temp.	Tiempo
1	1	50°C	2 min
1	1	95°C	10 min
2	50	95°C	15 s
		60°C (*)	1 min

**NOTA IMPORTANTE:** (\*) fase para la adquisición de datos en tiempo real.

ADVERTENCIA: Prestar atención para ajustar el termociclador Real-Time con el perfil térmico correcto siguiendo las instrucciones del manual del instrumento suministrado por el fabricante del instrumento.

#### N.3.2 Selección de los detectores

Siguiendo los manuales de instrucciones de los termocicladores Real-Time sugeridos (Mx3000P Stratagene y ABI 7500), seleccionar los detectores indicados en la siguiente tabla:

Detección	Indicador	Templador
TOXO	FAM	No fluorescente
Control Interno (IC)	JOE	No fluorescente
Referencia pasiva	ROX	No presente

ADVERTENCIA: Prestar atención para ajustar el termociclador Real-Time con la configuración correcta siguiendo las instrucciones del manual de los instrumentos suministrado por el fabricante.

### O. ESQUEMA DEL ENSAYO.

A continuación, se muestra un ejemplo del esquema de dispensado para análisis:

#### Microplaca o tubos

	1	2	3
A	CTRL-H 4.0x10 <sup>4</sup> tachyzoites/ml o 3.5x10 <sup>4</sup> IU/ml	Muestra 6	
B	CTRL-L 4.0x10 <sup>1</sup> tachyzoites/ml o 3.5x10 <sup>1</sup> IU/ml	Muestra 7	
C	NTC	Muestra 8	
D	Muestra 1	Muestra 9	
E	Muestra 2	Muestra 10	
F	Muestra 3	Muestra 11	
G	Muestra 4	Muestra 12	
H	Muestra 5	Muestra 13	

Leyenda: NTC = Control negativo CTRL-H, CTRL-L = Control positivo ADN toxoplasma gondii, Muestra 1,2,3,... = Muestras en evaluación.

### P. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

#### P.1 Configuración pre-análisis

Antes de iniciar el análisis:

- Ajustar la "línea de base" (nivel fluorescente del fondo) como se indica a continuación:

"Línea de base"	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	Línea de base automática
STRATAGENE™ MX3000P®	Línea de base adaptable (no usar algoritmo Mx4000 v1.00 a v3.00)

- Ajustar manualmente el "umbral" fluorescente FAM/JOE/VIC

"Umbral" fluorescente FAM	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.1
STRATAGENE™ MX3000P®	0.1

"Umbral" fluorescente JOE/VIC	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.1
STRATAGENE™ MX3000P®	0.02

#### P.2 Análisis de datos

Se realiza una comprobación en los controles positivos alto y bajo cada vez que se usa el equipo para verificar si sus valores Ct son los esperados e indicados en la siguiente tabla:

Compruebe que	Exigencia
CTRL-H	20 ≤ Ct (ciclo umbral) ≤ 24
CTRL-L	30,5 ≤ Ct (ciclo umbral) ≤ 34,5

### Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Para cada muestra, se asume la fluorescencia FAM (valores Ct positivo/negativo) y la fluorescencia JOE del control interno para validar la detección de ADN de toxoplasma, como se describe en la siguiente tabla:

T. gondii FAM	JOE del control interno	Resultado del ensayo
MUESTRA POSITIVA	+	CORRECTO
	-	CORRECTO*
MUESTRA NEGATIVA	Ct <40	CORRECTO
	Ct > 40 o indeterminada	INVÁLIDO**

\*Una concentración inicial alta de ADN de TOXO en la muestra (señal FAM positiva) puede llevar a una señal fluorescente REDUCIDA o AUSENTE del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos.

\*\* Pueden aparecer problemas durante la fase de amplificación (amplificación ineficiente o ausente) o durante la fase de extracción (presencia de inhibidores o muestra inicial con número insuficiente de células) que podrían dar lugar a resultados incorrectos. El procedimiento de prueba debe repetirse empezando desde la fase de extracción, utilizando una muestra fresca procedente del paciente.

Los resultados obtenidos con este producto deben ser interpretados teniendo en cuenta los síntomas clínicos y los demás parámetros del laboratorio relacionados con las condiciones del paciente.

Los siguientes resultados son posibles:

**Tabla de solución de problemas**

	FAM	JOE	Resultado	COMPROBAR
MUESTRA desconocida	+	+/-	RESULTADO CORRECTO <i>Positivo</i>	<b>¡IMPORTANTE!</b> Una concentración inicial alta de ADN de TOXO (señal FAM positiva) puede llevar a una señal fluorescente REDUCIDA o AUSENTE del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos.
MUESTRA desconocida	-	-	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Inhibición, error en el procedimiento o mal funcionamiento de los instrumentos	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que se hayan corregido los tintes de detección seleccionados FAM para la detección de TOXO y JOE para la detección de IC; 4. que el análisis se haya realizado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el equipo se haya almacenado correctamente; 6. que ningún inhibidor PCR potencial haya contaminado el tubo; 7. que el procedimiento de extracción se haya realizado correctamente.
MUESTRA desconocida	-	+	RESULTADO CORRECTO <i>Negativo</i>	
CTRL-H/CTRL-L	+	+/-	RESULTADO CORRECTO	<b>¡IMPORTANTE!</b> Una concentración inicial alta de ADN de TOXO (señal FAM positiva) puede llevar a una señal fluorescente REDUCIDA o AUSENTE del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos.
CTRL-H/CTRL-L	-	-	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Error en el pipeteado o en el procedimiento	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que los tintes de detección seleccionados sean correctos: FAM para la detección de TOXO y JOE para la detección de IC; 4. que el análisis se haya realizado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el equipo se haya almacenado correctamente; 6. que ningún inhibidor PCR potencial haya contaminado el tubo;

CTRL-H/CTRL-L	-	+	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Error en el pipeteado o en el procedimiento	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que los tintes de detección seleccionados sean correctos: FAM para la detección de TOXO y JOE para la detección de IC; 4. que el análisis se haya realizado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el equipo se haya almacenado correctamente;
NTC	-	+	RESULTADO CORRECTO	
NTC	+	+/-	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Contaminación	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que el lugar de trabajo y los instrumentos se descontaminen a intervalos regulares; 4. que el equipo se haya almacenado correctamente;

Si aparecen uno o más de los problemas descritos en la tabla anterior, tras la comprobación, informar al supervisor de cualquier problema residual para tomar las medidas pertinentes.

#### Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la supervisión del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Al transmitir los resultados de la prueba del laboratorio a un centro informático, debe prestarse mucha atención para evitar la transferencia de datos erróneos.

#### R. RENDIMIENTO

La evaluación de los rendimientos se ha realizado de acuerdo con lo indicado en las Especificaciones técnicas internas (ITS). La evaluación del rendimiento se llevó a cabo en laboratorios DiaPro con materiales suministrados por los laboratorios clínicos de referencia.

#### R.1 SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica se puede expresar como Límite de detección.

Límite de detección (LOD): es la cantidad mínima de sustancia que puede detectarse por el sistema con una probabilidad establecida.

Para las pruebas NAT se expresa como la concentración mínima del analito que, tras probarse en múltiples repeticiones, da un resultado positivo.

El límite de detección (LOD) se determina probando diluciones en serie que contienen concentraciones conocidas del analito.

El LOD es la concentración mínima de analito que puede detectarse de forma consistente (p. ej., en  $\geq 95\%$  de las muestras en condiciones rutinarias del laboratorio).

Para el equipo TOXODNA.CE, el LOD se ha determinado probando diluciones en serie de 1:2 (8 réplicas en tres series distintas) del material calibrado según la 1ª Norma Internacional de la OMS para *Toxoplasma gondii* (NIBSC código 10/242).

Los resultados se analizaron mediante un análisis Probit para determinar el límite de detección en 95%.

Los resultados son los siguientes:

Límite de detección (p=0,05)	
ABI™PRISM® 7500 SDS	12.44 IU/ml o 14.18 tachyzoites/ml

**Nota importante:** La secuencia meta es un fragmento de 529 bp repetido 200-300 veces en el genoma de *toxoplasma gondii*.

## R. 2 ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

La especificidad analítica es la capacidad de un método de detectar sólo la secuencia de ADN meta.

La especificidad analítica del ensayo de ADN de TOXO se ha estudiado del siguiente modo:

1. El juego de cebador/sonda se ha elegido analizando la secuencia meta del genoma con un software adecuado (LionSoft v.1.0 suministrado por Biotools y Primer Express v.3.0 suministrado por Applied Biosystems Inc.).
2. El juego de cebador/sonda y la secuencia meta del genoma han sido controlados por el software "BLAST" para comprobar si alguna de las secuencias nucleótidas depositadas en los bancos genómicos a nivel mundial tiene alguna homología con *T. gondii*, y por el software "ClustalX" para comparar las secuencias meta del genoma de los distintos genotipos de toxoplasma.
3. La especificidad se mejoró mediante la selección de condiciones de reacción estrictas.
4. Se obtuvo ADN genómico aislado de bacterias potencialmente interferentes con *T. gondii* de la American Type Culture Collection (Colección americana de cultivos tipo, ATCC) y de Vircell, y se comprobó.

Los resultados se indican en la tabla siguiente:

Organismo	Resultado
Virus de leucemia de células T en humanos	negativo
<i>Candida albicans</i>	negativo
<i>Candida glabrata</i>	negativo
<i>Chlamydia trachomatis</i>	negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo

## R.3. ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DIAGNÓSTICA

### R.3.1. Especificidad diagnóstica:

La especificidad diagnóstica es la probabilidad de que el dispositivo dé un resultado positivo en ausencia del marcador meta. Así, la muestra negativa verdadera es una muestra conocida como negativa para el marcador meta y clasificada correctamente por el dispositivo

Este parámetro se estudió examinando 20 muestras de plasma negativas con ADN de TOXO:

NEGATIVOS VERDADEROS	20
FALSOS POSITIVOS	0
TOTAL MUESTRAS	20
ESPECIFICIDAD %	100

Tomando como base los resultados obtenidos, la especificidad diagnóstica del sistema se ha calculado >99%.

### R.3.2 Sensibilidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica es la probabilidad de que el dispositivo dé un resultado positivo en presencia del marcador meta. Así, la muestra positiva verdadera es una muestra conocida como positiva para el marcador meta y clasificada correctamente por el dispositivo.

Para el equipo TOXODNA.CE, este parámetro se estudió examinando 10 muestras de plasma y de líquido amniótico positivas de ADN de TOXO. Las muestras se estudiaron en duplicados en la misma serie y, a continuación, se calculó el porcentaje (%) de muestras positivas.

## Muestras positivas de ADN de TOXO

POSITIVOS VERDADEROS	10
FALSOS NEGATIVOS	0
TOTAL MUESTRAS	10
SENSIBILIDAD %	100

Además, se comprobó el programa EQA QCMD 2008 *Toxoplasma gondii* (TGDNA08).

El panel contiene 8 muestras positivas (6 de líquido amniótico y 2 de plasma) y 2 muestras negativas (1 de plasma y 1 de líquido amniótico).

Tomando como base los resultados obtenidos, la sensibilidad diagnóstica del sistema se ha calculado en el 100%.

Sensibilidad diagnóstica	100 %
Especificidad diagnóstica	> 99.5 %

## R.4 PRECISIÓN

La precisión muestra el grado de fiabilidad del sistema. Cada procedimiento de medición tiene una variación aleatoria inherente denominada "error aleatorio". El error aleatorio no tiene un valor numérico, sino que se determina por dispersión de la medición como desviación estándar (DevST) y variación de coeficiente (CV%). Normalmente, la precisión de un ensayo se refiere a la concordancia entre mediciones repetidas del mismo material.

En el equipo TOXODNA.CE, la precisión se expresó como variabilidad intraensayo y variabilidad interensayo. Se probaron 8 réplicas del CTRL-H Y CTRL-L en la misma serie (intraensayo) y en tres series distintas (interensayo).

Tomando como base los resultados obtenidos, se calculó la variabilidad intraensayo e interensayo.

En ausencia de parámetros internacionales establecidos, hemos identificado el siguiente valor de aceptabilidad para el equipo TOXODNA.CE:

**Variación de coeficiente de intraensayo (CV%) ≤ 10%.**

**Variación de coeficiente de interensayo (CV%) ≤ 10%.**

## S. LIMITACIONES

El usuario final de este equipo deberá leer cuidadosamente y entender este manual de instrucciones. El seguimiento estricto del protocolo es fundamental para obtener unos resultados fiables. Especialmente, el pipeteado preciso de muestra y reactivo, la aplicación de un flujo de trabajo correcto junto con una programación cuidadosa de la fase de termociclado, son esenciales para la detección precisa y reproducible de ADN de TOXO.

La determinación de ADN de TOXO en la muestra de un paciente tiene numerosas implicaciones médicas, sociales, psicológicas y económicas.

Se recomienda que la confidencialidad, el asesoramiento y la evaluación médica apropiados, se consideren un aspecto esencial de la secuencia de prueba.

## T. BIBLIOGRAFÍA

1. Real-Time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. MH Lin, TS chen, TT Kuo, CC Tseng, CP Tseng. J. Clin. Microbiol. 2000 ; 38 :4121-4125.
2. A prospective study of diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection after bone marrow transplantation. B. Edvinsson, J.Lundquist, P.Ljungman, O.Ringden, B.Evangard. APMIS 2008 ; 116 :345-351.
3. Diagnostic of pulmonary infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised HIV-positive patients by real-time PCR. E.Petersen, B. Edvinsson, B.Lundgren, T.Benfield, B.Evangard. Eur J.Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2006 ; 25 :401-404.
4. Comparison between Two Amplification Sets for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis by Real-Time PCR. S. Cassaing, M. H. Bessières, A. Berry, A. Berrebi, R. Fabre, and J. F. Magnaval. J. Clin. Microbiol. 2006 ;44 :720-724.
5. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. B. Edvinsson, M. Lappalainen and B. Evenga. J. Clin. Microbiol. 2006 ; 12 :131-136.
6. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. U Reischl, S Bretagne, D Krüger, P Ernault, Jean-Marc Costa. BMC Infectious Disease. 2003 ; 3 :1-9.
7. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. W.L. Homana, M. Vercammenb, J. De Braekeleer c, H. Verschueren. Int. J. Parasitology. 2000 ;30 :69-75.
8. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. David C. Kaspera, Kambis Sadeghia, Andrea-Romana Prusaa, Georg H. Reischer, Klaus Kratochwilla, Elisabeth Förster-Waldla, Nicole Gerstla, Michael Haydea, Arnold Pollaka, Kurt R. Herkner. Diag. Microbiol. And Infect. Dis. 2009 ;63 :10-15.

## 5. Símbolos

LEYENDA			
	Código del producto		Temperatura de almacenamiento
	Dispositivo de diagnóstico in vitro		Ver instrucciones de uso
	N.º de lote		Fabricante
	Fecha de caducidad		Número de pruebas
	Marca de conformidad CE		Fecha de fabricación

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el mercado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

4BShopLab



consip

acquistinretepa

## DISTRIBUIDOR

4BShop Lab Srls



info@4BShopLab.com



www.4BShopLab.com



+39.0371.18.56.643

## FABRICANTE

Dia.Pro - Diagnostic Bioprobes Srl



MADE IN ITALY

EN ISO 13485:2013 Certified



FIND   
Because diagnosis matters