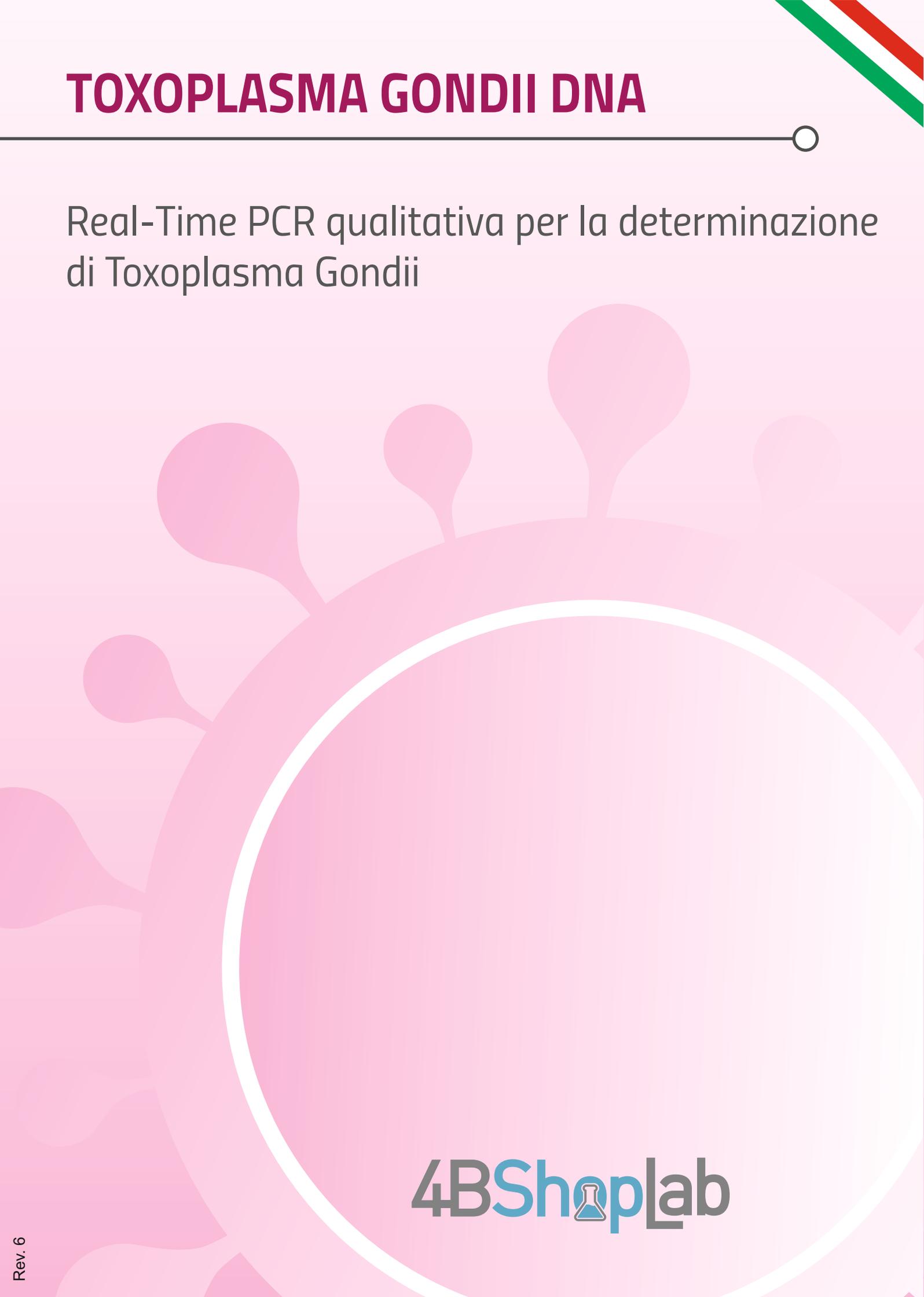


# TOXOPLASMA GONDII DNA



Real-Time PCR qualitativa per la determinazione di Toxoplasma Gondii

4BShopLab

# TOXOPLASMA GONDII DNA

## A. USO PREVISTO

Il kit di real-time PCR **Toxoplasma gondii DNA**, codificato **TOXODNA.CE**, è finalizzato alla rilevazione del DNA di *Toxoplasma Gondii* in campioni biologici umani (plasma e liquido amniotico). La presenza di un controllo interno (IC) di estrazione e/o amplificazione permette di monitorare l'intero processo.

Il saggio TOXODNA.CE è stato standardizzato verso il primo WHO Standard Internazionale per *Toxoplasma gondii* (Codice NIBSC 10/242) al fine di esprimere la concentrazione dei controlli positivi sia in tachizoiti/ml sia in Unità Internazionali (UI/ml).

L'utilizzo del kit è compatibile con strumenti real-time ABI 7500 Sequence Detection System® (Software SDS versione 1.3.1, Applied Biosystems™\*) oppure MX3000P (Software MxPro versione 4.01, Stratagene™\*\*\*).

\* Applied Biosystems è un marchio registrato e ABI PRISM® è un marchio di proprietà di Applied Biosystems o delle sue consociate negli USA e/o altri paesi.  
\*\*\*Stratagene è un marchio registrato.

## B. INTRODUZIONE

Il parassita *Toxoplasma gondii* è ampiamente diffuso nella popolazione umana e si stima che colpisca fino a un terzo della popolazione mondiale.

Si tratta di un protozoo intracellulare obbligato appartenente al Phylum Apicomplexa, sottoclasse Coccidia, che infetta i vertebrati a sangue caldo, compreso l'uomo.

Il genoma è di circa 80 Mb di dimensioni e consta di 11 cromosomi.

La modalità più importante di trasmissione dell'infezione all'uomo è attraverso l'ingestione di carne poco cotta contenente l'organismo incistato.

Gli animali di allevamento della catena alimentare sono riserve significative di *T. gondii*, il che è importante in quanto possibile via di trasmissione all'uomo, e inoltre la toxoplasmosi provoca anche perdite veterinarie significative.

La toxoplasmosi ha un esito variabile, a seconda dell'interazione di più fattori, comprese le funzioni del sistema immunitario.

La maggior parte delle infezioni sono asintomatiche o assumono la forma di una malattia lieve autolimitante. Tuttavia, il paziente avrà un'infezione latente per tutta la vita, causata dalla presenza di cisti nel tessuto.

La malattia è pericolosa se contratta nell'utero e anche per i pazienti affetti da immunodeficienza, soprattutto se è coinvolta un'immunità adattiva (ad es. pazienti affetti da AIS, leucemici, trapiantati).

La toxoplasmosi acuta contratta in gravidanza può esitare nel decesso o in gravi complicanze del feto come cecità, sordità o disturbi del sistema nervoso centrale. Queste complicanze possono manifestarsi nei neonati o successivamente nei bambini infettati in via congenita.

Il contatto con feci contaminate può costituire un pericolo potenziale per le donne in gravidanza.

Normalmente la diagnosi di toxoplasmosi si basa sulla determinazione di anticorpi mediante sierologia con ELISA, test di agglutinazione o altri metodi immunometrici, come il Western blot o il dye-test di Sabin-Feldman.

Le tecniche sierologiche possono tuttavia essere inferiori in individui immunocompromessi, nei pazienti affetti da AIDS o in casi prenatali. In questi pazienti, è importante usare la PCR come strumento diagnostico.

## C. PRINCIPIO DEL TEST

Il kit TOXODNA.CE si basa su una chimica real-time che utilizza primer e probe specifici.

Il **DNA di *Toxoplasma gondii***, purificato dal campione biologico in esame attraverso una fase di estrazione, viene amplificato utilizzando il sistema di amplificazione real-time. Il prodotto amplificato viene determinato mediante probe marcato con sostanze fluorescenti (reporter dye), specifico per una sequenza genomica di *T.gondii* ad alta ripetizione (da 200 a 300 volte).

Il controllo interno (IC) eterologo funge da controllo di estrazione e/o di amplificazione per ogni singolo campione, con l'obiettivo di identificare eventuali inibitori della reazione.

Come controlli della reazione di PCR sono forniti un controllo positivo alto (CTRL-H) e un controllo positivo basso (CTRL-L).

## D. COMPONENTI

Il formato standard del prodotto codificato come TOXODNA.CE contiene reagenti per 50 test.

Componente	Contenuto	TOXODNA.CE 50 reazioni
<b>A</b> CODIFICATO: ALL/MM4 CODICE COLORE: TRASPARENTE	Master mix	N°1 provette/0,825 ml
<b>B</b> CODIFICATO: TOXO/CB CODICE COLORE: GIALLO	Primer/probe liofilizzati	N° 2 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
<b>C</b> CODIFICATO: ALL/C CODICE COLORE: ROSSO	H <sub>2</sub> O MG	n°2 provette /1,5 ml
<b>NTC</b> CODIFICATO: ALL/NTC CODICE COLORE: BIANCO	Controllo negativo	n°1 provette /1,5 ml
<b>CTRL-L</b> Controllo positivo basso (4.0x10 <sup>1</sup> tachizoiti/ml o 3.5x10 <sup>1</sup> IU/ml) CODIFICATO:TOXO/CTRL-L CODICE COLORE: ROSA	Controllo positivo basso liofilizzato	N° 8 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
<b>CTRL-H</b> Controllo positivo alto (4.0x10 <sup>4</sup> tachizoiti/ml o 3.5x10 <sup>4</sup> IU/ml) CODED:TOXO/CTRL-H CODICE COLORE: VIOLA	Controllo positivo alto liofilizzato	N° 8 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
<b>IC</b> Controllo interno CODIFICATO: TOXO/IC CODICE COLORE: VERDE	Controllo interno liofilizzato	N° 2 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
Foglietto illustrativo	Istruzioni per l'uso	1

**Nota importante:** su richiesta Dia.Pro può fornire reagenti per 25, 100, 150 test, come riportato nella tabella sottostante:

1. Componente A	n°1 provette/0,4 ml	n°2 provette /0,825 ml	n°3 provette/0,825 ml
2. Componente B	n°1 provette	n°4 provette	n°6 provette
3. Componente C	n°1 provette /1,5 ml	n°2 provette /1,5 ml	n°3 provette /1,5 ml
4. NTC	n°1 provette /1,5 ml	n°1 provette /1,5 ml	n°1 provette /1,5 ml
5. IC	n°1 provette	n°4 provette i	n°6 provette
6. CTRL-H	n°4 provette	n°4 provette	n°6 provette
7. CTRL-L	n°4 provette	n°4 provette	n°6 provette
8. Inserto	n°1	n°1	n°1
<b>Numero di test</b>	<b>25</b>	<b>100</b>	<b>150</b>
<b>Codice</b>	<b>TOXODNA.CE.25</b>	<b>TOXODNA.CE.100</b>	<b>TOXODNA.CE.150</b>

#### E. CONSERVAZIONE E STABILITA'

Il kit codificato TOXODNA.CE deve essere conservato a +2...8 °C.

Una volta risospeso il **Componente B** (codice TOXO/CB) e il **Componente IC** (codice TOXO/IC) sono stabili 4 mesi a -20°C. Una volta risospesi i **Componenti controllo positivo alto e basso** (codici TOXO/CTRL-H e TOXO/CTRL-L) sono stabili 2 settimane a -20°C. Se i componenti risospesi devono essere usati più volte si raccomanda di preparare aliquote, ripetuti congelamenti e scongelamenti devono essere evitati. Solo uno scongelamento è ammesso.

#### F. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

1. Micropipette calibrate (0,5 µl < volume <1000 µl)
2. Kit di estrazione del DNA
3. MG EtOH
4. PBS
5. Blocco termico
6. Microcentrifuga
7. Portaprovette
8. Puntali sterili con filtro con barriera aerosol
9. Microprovette prive di nucleasi
10. Microprovette da 0,2 ml o micropiastre per PCR raccomandate dai produttori di strumenti per PCR real-time
11. Guanti monouso non talcati
12. Termociclatore per PCR real-time (\*)
13. Fazzoletti di carta assorbente
14. Vortex o miscelatori similari

(\*) **Attenzione:** deve essere effettuata regolarmente una calibrazione valida di pure dyes (Pure Spectra Component File) e background (Background Component File).

#### G. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Il kit deve essere usato solo da personale tecnico esperto ed adeguatamente addestrato, dietro supervisione di un medico responsabile del laboratorio.
2. Il personale tecnico deve essere specificamente addestrato all'uso dei termociclatori real-time, nonché alla manipolazione dei reagenti per biologica molecolare e deve avere familiarità con i protocolli di amplificazione per PCR real-time.
3. Per effettuare questo tipo di analisi, il kit deve essere usato in un laboratorio certificato e qualificato dall'autorità nazionale di settore (Ministero della Salute o ente similare).
4. Tutto il personale coinvolto nell'esecuzione del test deve indossare indumenti protettivi da laboratorio, guanti non talcati ed occhiali. Evitare di utilizzare oggetti appuntiti (aghi) e taglienti (lame). Tutto il personale interessato deve essere addestrato alle procedure di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, USA, e riportato nella pubblicazione del National Institute of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. Tutto il personale impiegato nel trattamento dei campioni deve essere vaccinato contro HBV e HAV, per i quali sono disponibili vaccini sicuri ed efficaci.
6. L'ambiente di laboratorio deve essere controllato per evitare contaminanti come polvere o agenti microbici a trasmissione per via aerea, al momento dell'apertura dei flaconcini dei kit e dei componenti e dell'esecuzione del test.

7. I componenti A e B sono fotosensibili. Occorre quindi proteggerli dall'esposizione a luce intensa.

8. Evitare vibrazioni sulla superficie del banco dove viene eseguita l'analisi.

9. Al ricevimento, riporre il kit in un frigorifero a temperatura controllata o in una camera fredda a una temperatura di +2/+8°C.

10. Non mischiare i componenti dei kit di diversi lotti. Si raccomanda anche di non scambiare componenti tra kit dello stesso lotto.

11. Assicurarsi che i reagenti siano limpidi e non contengano particelle pesanti visibili o aggregati. In caso contrario, informare il supervisore del laboratorio per avviare le procedure necessarie alla sostituzione del kit.

12. Evitare la contaminazione crociata tra campioni, utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni campione.

13. Evitare la contaminazione crociata tra reagenti del kit, utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni uso.

14. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza riportata sull'etichetta del confezionamento esterno.

15. Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Tutti i campioni di siero/plasma umano devono essere trattati al livello 2 delle norme di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, USA e nel rispetto delle norme riportate nella pubblicazione degli Institutes of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

16. Conservare ed estrarre i campioni separatamente da altri reagenti e usare una stanza separata per la loro manipolazione.

17. Dissolvere i reagenti liofilizzati con la quantità corretta, riportata sulle etichette, del componente C (Codice: ALL/C) in dotazione nel kit.

18. Effettuare tutte le necessarie operazioni nel minor tempo possibile, conservando i componenti in ghiaccio o in un blocco refrigerante.

19. Il flusso di lavoro del laboratorio deve procedere in maniera unidirezionale, partendo dall'area di estrazione e spostandosi verso le aree di amplificazione e di analisi dati. Non riportare campioni, attrezzatura e reagenti nell'area dove sono stati compiuti i passaggi operativi precedenti.

20. Si raccomanda l'uso di materiale monouso in plastica per la preparazione dei componenti liquidi o per il trasferimento dei componenti nelle stazioni di lavoro automatiche, per evitare la contaminazione crociata.

21. I materiali di rifiuto prodotti utilizzando il kit devono essere smaltiti e trattati secondo le direttive nazionali e le leggi che regolamentano il trattamento dei rifiuti di laboratorio provenienti da sostanze chimiche e biologiche. In particolare, i rifiuti liquidi generati dalle procedure di estrazione dei campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo e inattivati prima dello smaltimento. Evitare il contatto dei rifiuti di estrazione con candeggina.

22. Spargimenti accidentali da campioni o da operazioni in corso devono essere eliminati con carta assorbente imbevuta di candeggina per uso domestico e poi con acqua. La carta assorbente utilizzata deve essere gettata negli appositi contenitori per rifiuti di laboratorio od ospedalieri.

23. Gli altri materiali di rifiuto generati (ad esempio: puntali usati per campioni) devono essere trattati come potenzialmente infettivi e smaltiti in conformità alle direttive nazionali e alle leggi concernenti lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.

#### H. CAMPIONI: PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI

1. Il sangue deve essere prelevato da una vena in asepsi, mentre il plasma deve essere preparato utilizzando le procedure standard per le analisi cliniche di laboratorio.

2. La raccolta di liquido amniotico deve essere effettuata dopo 16 settimane dall'inizio della gestazione dietro controllo ecografico continuo, seguendo le linee guida cliniche definite e approvate.

3. Non è stata osservata alcuna influenza nella preparazione del campione in presenza di citrato, EDTA.

Attenzione: l'eparina ( $\geq 10$  UI/ml) condiziona le reazioni di PCR.

Non usare campioni raccolti in provette contenenti eparina come anticoagulante. Inoltre, non usare campioni di pazienti eparinizzati.

4. Evitare qualsiasi aggiunta di conservanti ai campioni.

5. I campioni devono essere chiaramente identificati con codici o nomi per evitare interpretazioni errate dei risultati.

6. I campioni emolizzati (rossi) e visibilmente iperlipemici (lattescenti) devono essere scartati in quanto potrebbero generare risultati errati. I campioni contenenti residui di fibrina, particelle pesanti o filamenti e corpuscoli microbici devono essere scartati in quanto potrebbero generare risultati errati.

7. Se non utilizzati immediatamente, plasma e liquido amniotico devono essere conservati a -20/-80°C dopo la raccolta. I campioni possono essere conservati congelati a -80°C per diversi mesi. Qualsiasi campione congelato non deve essere congelato/scongelato più di una volta, perché questo potrebbe inficiare il risultato del test.

8. I campioni di plasma per estrazione del DNA devono essere raccolti in EDTA secondo le comuni procedure di laboratorio, trasportati e conservati a +2/+8 °C per un periodo massimo di 4 ore. I campioni di plasma possono essere conservati congelati a -20°C per un periodo massimo di 30 giorni oppure a -70°C per periodi più lunghi.

9. Per una conservazione ottimale dei campioni, si raccomanda di suddividerli in più aliquote (volume minimo 300 µl) e di conservarli congelati a -20°C per un periodo massimo di 30 giorni oppure a -70°C per periodi più lunghi. Evitare cicli di congelamento/scongelamento ripetuti.

10. I campioni di liquido amniotico devono essere centrifugati prima dell'estrazione del DNA e dissolti in PBS secondo le comuni procedure di laboratorio. I campioni di liquido amniotico devono essere trasportati e conservati a +2/-8°C per un periodo massimo di 4 ore. I campioni di liquido amniotico possono essere conservati congelati a -20°C per un periodo massimo di 30 giorni oppure a -70°C per periodi più lunghi.

11. Se si utilizzano campioni congelati, scongelarli appena prima dell'estrazione per evitare una possibile degradazione dell'acido nucleico.

12. I campioni di sangue periferico intero per estrazione del DNA devono essere raccolti in EDTA in conformità ai regolamenti del laboratorio, trasportati e conservati a +2°C/+8°C per un periodo massimo di 3 giorni. Non congelare i campioni di sangue periferico intero per evitare lisi cellulare e perdita del titolo virale.

## I. PREPARAZIONE DEI COMPONENTI E AVVERTENZE

### Master mix:

Componente A. Pronto all'uso. Miscelare bene nel Vortex prima dell'uso e centrifugare brevemente per recuperare l'intero volume.

**ATTENZIONE:** il componente A è fotosensibile. Proteggerlo dall'esposizione a luce intensa.

### Primer/probe:

#### Componente B.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo dalla provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente il componente B liofilizzato con il volume di componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Tenerlo sul piano di lavoro per almeno 10 min a temperatura ambiente (15°C <temp. amb.<25°C).
- Vortexare brevemente

**ATTENZIONE:** il componente B è fotosensibile. Proteggerlo dall'esposizione a luce intensa.

### ACQUA MG:

Componente C. Pronto all'uso.

### Controllo negativo:

NTC. Pronto all'uso.

### Controllo positivo:

#### Componente CTRL-L.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente il CTRL-L liofilizzato con il volume di componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Tenerlo sul piano di lavoro per almeno 10 min a temperatura ambiente (15°C <temp. amb.<25°C).
- Vortexare brevemente

#### Componente CTRL-H.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente il CTRL-H liofilizzato con il volume di componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Tenerlo sul piano di lavoro per almeno 10 min a temperatura ambiente (15°C <temp. amb.<25°C)
- Vortexare brevemente

### Controllo interno:

#### IC

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente l'IC liofilizzato con il volume di componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Tenerlo sul piano di lavoro per almeno 10 min a temperatura ambiente (15°C <temp. amb.<25°C).
- Vortexare brevemente

## L. STRUMENTI E ACCESSORI USATI IN COMBINAZIONE CON IL KIT

1. Le **micropipette** devono essere calibrate e sottoposte a regolare decontaminazione (alcol ad uso domestico, soluzione di candeggina al 10%, disinfettanti ad uso ospedaliero) nelle parti che possono accidentalmente venire in contatto con il campione. Devono inoltre essere regolarmente controllate per garantire una precisione dell'1% e un'esattezza di +/-5%.
2. **Dispositivo di estrazione:** il kit TOXODNA.CE è destinato all'uso solo insieme a QIAamp DNA Minikit Codice.51306 (QIAGEN) e NucleoSpin Blood Kit Codice: 740951 (Macherey-Nagel). Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso fornite dai produttori.
3. **Termociclatori real-time.** Il kit TOXODNA.CE è destinato all'uso esclusivamente in combinazione con gli strumenti real-time ABI 7500 software SDS, versione 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P software MxPro, versione 4.01 (Stratagene). Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso fornite dai produttori.

## M. CONTROLLI E OPERAZIONI PRE-ANALISI

1. Verificare la data di scadenza stampata sull'etichetta esterna della scatola contenente il kit. Non utilizzare il kit se è scaduto.

- Verificare che i componenti liquidi non siano contaminati da particelle visibili ad occhio nudo o aggregati. Controllare che sul fondo delle provette contenenti i componenti liofilizzati sia presente un aggregato ben formato. Accertarsi che il prodotto non si sia danneggiato durante il trasporto e che non sia presente alcuna fuoriuscita di liquidi all'interno della scatola.
- Dissolvere i componenti liofilizzati con la giusta quantità di Componente C (H<sub>2</sub>O "Molecular Grade") come descritto nel relativo paragrafo (H).
- Avviare i termociclatori, verificare le impostazioni ed assicurarsi di utilizzare il profilo termico corretto.
- Seguire rigorosamente le istruzioni contenute nel manuale dello strumento fornito dai produttori per la corretta impostazione dei termociclatori real-time.
- Verificare che le micropipette siano impostate sul volume corretto.
- Controllare che tutto il resto dell'attrezzatura sia disponibile e pronto all'uso.
- In caso di problemi, sospendere il test ed informare il supervisore.

## N. PROCEDURA D'ANALISI

Il test deve essere eseguito secondo le istruzioni qui di seguito riportate.

### N.1 Estrazione del DNA

La fase estrattiva del DNA genomico di *Toxoplasma gondii* deve essere eseguita esclusivamente in combinazione con i seguenti kit:

Materiale	Descrizione	Codice del kit	Produttore
Plasma/liquido amniotico	Nucleospin Blood	740951	MN™
Plasma/liquido amniotico	QIAamp DNA mini kit®	51306	Qiagen™

**N.B.:** prima dell'isolamento del DNA, centrifugare i campioni di liquido amniotico (10.000 g, 5 min.), eliminare il surnatante e dissolvere il pellet in 200 µl di PBS.

L'isolamento del DNA deve essere eseguito esclusivamente in conformità al manuale d'istruzioni fornito dal produttore (QIAGEN™, MN™).

**ATTENZIONE:** utilizzare esclusivamente i seguenti volumi nelle procedure di estrazione per entrambi i kit:

**Volume di estrazione dei campioni: 200 µl**

**Volume di eluizione: 100 µl**

Il DNA estratto dai campioni, non utilizzato nella sessione di analisi, deve essere adeguatamente conservato a temperatura controllata (da -20°C a -80°C).

**Nota importante:** l'IC del kit TOXODNA.CE può essere inserito nella procedura d'isolamento del DNA come controllo di estrazione.

Il valore Ct del controllo interno per i campioni negativi viene usato per stabilire se la procedura di estrazione del DNA è stata eseguita correttamente (vedere il paragrafo Q).

**Per questa applicazione, aggiungere 5 µl di I.C. alla miscela di tampone di lisi e campione e procedere seguendo il manuale d'istruzioni fornito dal produttore del kit di estrazione.**

## N.2 Impostazione della reazione

Il kit TOXODNA.CE è destinato all'uso esclusivamente in combinazione con ABI 7500 software SDS, versione 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P software MxPro, versione 4.01 (Stratagene).

### N.2.1 Preparazione della PCR

**Importante:** nel paragrafo O è riportato un esempio di schema di dispensazione, che occorre consultare prima di iniziare le operazioni descritte di seguito.

- Preparare i componenti come descritto nel paragrafo I;
- Preparare il numero richiesto di provette di reazione oppure una piastra di reazione a 96 pozzetti per i campioni in esame e per il controllo positivo (preparati come descritto nel paragrafo I).

**Nota importante:** usare solo provette ottiche o micropiastre consigliate dai produttori di termociclatori real-time.

- Prendere in considerazione il fatto che i campioni dovrebbero essere possibilmente analizzati in duplicato.
- Includere almeno 1 provetta per il controllo negativo (NTC).
- Preparare la **miscela di amplificazione** per **campioni, NTC e controlli positivi (CTRL-H, CTRL-L)** come da tabella seguente:

#### Preparazione della miscela di amplificazione (I.C. come controllo di amplificazione)

Numero di reazioni		x1	x12
<b>A</b>	Master mix	12,5 µl	150 µl
<b>B</b>	Primer/probe	2 µl	24 µl
<b>IC</b>	Controllo interno	0,5 µl	6 µl
<b>Volume totale</b>		<b>15 µl</b>	<b>180 µl</b>

**Nota importante:** se il controllo interno è stato aggiunto durante la procedura d'isolamento del DNA, preparare la **miscela di amplificazione** per **campioni, NTC e controlli positivi (CTRL-H, CTRL-L)** come descritto nella tabella seguente:

#### Preparazione della miscela di amplificazione (I.C. come controllo di estrazione/amplificazione)

Numero di reazioni		x1	x12
<b>A</b>	Master mix	12,5 µl	150 µl
<b>B</b>	Primer/probe	2 µl	24 µl
<b>C</b>	Acqua MG	0,5 µl	6 µl
<b>Volume totale</b>		<b>15 µl</b>	<b>180 µl</b>

### N.2.2 Procedura di amplificazione

- Dispensare 15 µl di miscela di amplificazione in ogni provetta di reazione o pozzetto della micropiastre.
- Aggiungere 10 µl di **campione, NTC, CTRL-H e CTRL-L** alle provette di reazione.
- Chiudere bene le provette di reazione.
- Centrifugare brevemente le provette di reazione a 2000 rpm/min.

- Non lasciare le provette di reazione a temperatura ambiente per più di 30 minuti ed esposte alla luce (coprire le provette).
- Caricare le provette di reazione nel termoblocco dello strumento real-time.
- Dopo aver impostato lo strumento real-time come descritto nel paragrafo N3 (Programmazione dello strumento), procedere con la sessione di analisi.

**Nota importante:** Dopo risospensione nel componente C (H<sub>2</sub>O MG), i componenti liofilizzati sono stabili per non più di 3 ore, se conservati in ghiaccio oppure a una temperatura di 2°-8°C. Il volume inutilizzato di componente B, CTRL-H, CTRL-L e I.C. può essere congelato a -20°C ed utilizzato come descritto nella Sezione E.

### N.3 Programmazione dello strumento

Per la programmazione dello strumento, fare riferimento al manuale d'istruzioni della strumentazione fornito dai produttori.

**Nota importante:** per Mx3000 impostare "Filter set gain settings": ROX = x1, FAM = x8, JOE = x1. (vedere il manuale d'istruzioni del software MxPro™ QPCR, pag. 41)

#### N.3.1 Profilo termico

Il profilo termico è riportato nella seguente tabella:

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

**NOTA IMPORTANTE:** (\*) fase per la raccolta dei dati in tempo reale.

ATTENZIONE: programmare il profilo termico corretto sullo strumento real-time seguendo le istruzioni del manuale fornito dal produttore.

#### N.3.2 Scelta dei fluorofori

Seguendo le istruzioni contenute nei manuali dei termociclatori real-time (Mx3000P Stratagene e ABI 7500), scegliere i fluorofori indicati nella tabella riportata qui sotto:

Determinazione	Reporter	Quencher
TOXO	FAM	Non fluorescente
Controllo interno (IC)	JOE	Non fluorescente
Passive Reference	ROX	Non presente

ATTENZIONE: prestare attenzione durante la programmazione e l'impostazione dello strumento real-time seguendo le istruzioni del manuale fornito dal produttore.

### O. SCHEMA DEL TEST

Qui sotto è riportato un esempio di schema di dispensazione per l'analisi:

#### Micropiastra o provette

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

Legenda: NTC = controllo negativo CTRL-H, CTRL-L = controlli positivi per il DNA di *Toxoplasma gondii*, Campione 1,2,3 = campioni in esame.

### P. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

#### P.1 Impostazioni pre-analisi

Prima di iniziare l'analisi:

- impostare il "baseline" (livello di fluorescenza di base) come indicato sotto:

"Baseline"	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	Auto Baseline
STRATAGENE™ MX3000P®	Adaptive Baseline (not use Mx4000 v1.00 to v3.00 algorithm)

- Impostare manualmente la "Threshold" di fluorescenza FAM/JOE.

FAM "Threshold"	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.1
STRATAGENE™ MX3000P®	0.1

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

#### P.2 Analisi dei dati

Si effettua un controllo sui CTRL-H/CTRL-L ogni volta che il kit viene usato per verificare se i rispettivi valori di Ct sono quelli previsti e riportati nella tabella seguente.

Controllo	Requisiti
CTRL-H	20 ≤ Ct (ciclo soglia) ≤ 24
CTRL-L	30,5 ≤ Ct (ciclo soglia) ≤ 34,5

### Q. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Per ogni campione, si parte dal presupposto che la fluorescenza FAM (valore Ct positivo/negativo) e la fluorescenza JOE del controllo interno convalidino la determinazione del DNA del *Toxoplasma* come descritto nella tabella seguente:

FAM T.gondii	JOE controllo interno	Risultato del test
CAMPIONE POSITIVO	+	CORRETTO
	-	CORRETTO*
CAMPIONE NEGATIVO	Ct < 40	CORRETTO
	Ct > 40 o indeterminato	NON VALIDO**

\*Una concentrazione iniziale elevata del DNA della TOXO (segnale FAM positivo) può portare ad una fluorescenza RIDOTTA o ASSENTE del controllo interno I.C. per competizione tra reagenti.

\*\* Potrebbero essersi verificati problemi durante la fase di amplificazione (amplificazione inefficiente o assente) o durante la fase di estrazione (presenza di inibitori o campione iniziale contenente un numero di cellule insufficiente) con un risultato conseguentemente errato. La procedura di analisi deve essere ripetuta partendo dalla fase di estrazione con un nuovo campione proveniente dallo stesso paziente.

I risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati tenendo in considerazione i sintomi clinici e gli altri parametri di laboratorio correlati alle condizioni del paziente.

Sono possibili i seguenti risultati

**Tabella di risoluzione dei problemi**

	FAM	JOE	Risultato	CONTROLLO
CAMPIONE scono-sciuto	+	+/-	RISULTAT O CORRETT O <u>Positivo</u>	<b>IMPORTANTE</b> una concentrazione iniziale elevata del DNA della TOXO (segnale FAM positivo) può portare ad un segnale fluorescente RIDOTTO o ASSENTE del controllo interno I.C. per competizione tra reagenti.
CAMPIONE scono-sciuto	-	-	ATTENZIONE !  POSSIBILITÀ DI:  inibizione, errore nella procedura o mancato funziona- mento degli strumenti	Verificare che: 1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. i fluorofori scelti siano corretti; FAM per la determinazione della TOXO e JOE per la determinazione dell'I.C.; 4. l'analisi sia stata condotta con l'impostazione degli strumenti corretta; 5. il kit sia stato conservato correttamente; 6. nessun inibitore potenziale della PCR abbia contaminato la provetta; 7. la procedura di estrazione sia stata eseguita correttamente.
CAMPIONE scono-sciuto	-	+	RISULTAT O CORRETT O <u>Negativo</u>	
CTRL- H/CTRL- L	+	+/-	RISULTAT O CORRETT O	<b>IMPORTANTE</b> una concentrazione iniziale elevata del DNA della TOXO (segnale FAM positivo) può portare ad un segnale fluorescente RIDOTTO o ASSENTE del controllo interno I.C. per competizione tra reagenti.
CTRL- H/CTRL- L	-	-	ATTENZIONE !  POSSIBILITÀ DI:  errore nel pipettaggio oppure nella procedura	Verificare che: 1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. i fluorofori scelti siano corretti; FAM per la determinazione della TOXO e JOE per la determinazione dell'I.C.; 4. l'analisi sia stata condotta con l'impostazione degli strumenti corretta; 5. il kit sia stato conservato correttamente; 6. nessun inibitore potenziale della PCR abbia contaminato la provetta.
CTRL- H/CTRL- L	-	+	ATTENZIONE !  POSSIBILITÀ DI:  errore nel pipettaggio oppure nella procedura	Verificare che: 1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. i fluorofori scelti siano corretti; FAM per la determinazione della TOXO e JOE per la determinazione dell'I.C.; 4. l'analisi sia stata condotta con l'impostazione degli strumenti corretta; 5. il kit sia stato conservato correttamente.
NTC	-	+	RISULTAT O CORRETT O	
NTC	+	+/-	ATTENZIONE !  POSSIBILITÀ DI:  contaminazio ne	Verificare che: 1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. lo spazio di lavoro e gli strumenti siano decontaminati a intervalli regolari;

				4. il kit sia stato conservato correttamente.
--	--	--	--	---

Se si presentano uno o più problemi tra quelli precedentemente descritti, dopo il controllo informate il supervisore di qualsiasi problema residuo per l'eventuale adozione di ulteriori misure.

**Note importanti:**

1. *l'interpretazione dei risultati dovrebbe essere effettuata dietro supervisione del responsabile del laboratorio per ridurre il rischio di errori di giudizio e interpretazioni errate.*
2. *Al momento della trasmissione dei risultati del test dal laboratorio ad un centro informatico, prestare attenzione a evitare trasferimenti di dati erronei.*

**R. PERFORMANCE**

La valutazione delle performance è stata eseguita in conformità a quanto indicato nelle specifiche tecniche interne o ITS.

La valutazione delle performance è stata condotta presso i laboratori di DiaPro su materiali forniti dai laboratori medici di riferimento.

**R.1 SENSIBILITÀ ANALITICA**

La sensibilità analitica può essere espressa come **Limite di determinazione**.

**Limite di determinazione (Limit of detection-LOD):** è la quantità minima del target che può essere determinata da un sistema con una probabilità dichiarata.

Per i test NAT, viene espresso come concentrazione minima dell'**analita** che, dopo ripetizioni multiple del test, fornisce un risultato positivo.

Il **limite di determinazione (LOD)** si stabilisce analizzando diluizioni seriali contenenti concentrazioni note dell'analita.

Il **LOD** è la concentrazione minima di analita che può essere determinate con probabilità  $\geq 95\%$  nei campioni in esame.

Per il kit TOXODNA.CE, il **LOD** è stato determinato testando diluizioni seriali 1:2 (8 replicati per tre sessioni di analisi diverse) del primo WHO Standard Internazionale per *Toxoplasma gondii* (Codice NIBSC 10/242).

I risultati sono stati analizzati mediante un'analisi **Probit** per stabilire il limite di determinazione al 95%.

**I risultati sono i seguenti:**

Limite di determinazione (p=0,05)	
<b>ABI™PRISM® 7500 SDS</b>	<b>12.44 IU/ml o 14.18 tachizoiti/ml</b>

**Nota importante:** la sequenza target è un frammento da 529 ripetuto 200-300 volte nel genoma di *Toxoplasma gondii*.

**R.2 SPECIFICITÀ ANALITICA**

La specificità analitica è la capacità del metodo di determinare solo la sequenza del DNA target.

La specificità analitica dell'analisi del DNA della TOXO è stata studiata come segue:

1. il set di primer/probe è stato scelto analizzando la sequenza target del genoma con un software appropriato (LionSoft v.1.0 fornito da Biotools e Primer Express v.3.0" fornito da Applied Biosystem Inc.).
2. il set primer/probe e la sequenza target del genoma sono stati controllati con il software "BLAST", per verificare se una qualsiasi delle sequenze di nucleotidi depositati nelle banche dei genomi in tutto il mondo presentino qualunque omologia con *T.gondii*, nonché con il software "ClustalX" per confrontare le sequenze target del genoma dei diversi genotipi del *Toxoplasma*.

- La specificità è stata ottimizzata mediante la scelta di rigorose condizioni di reazione.
- Il DNA genomico isolato da batteri potenzialmente in grado di interferire con *T.gondii* è stato fornito dall'American Type Culture Collection (ATCC) e Vircell ed è stato analizzato.

I risultati sono riportati nella seguente tabella:

Organismo	Risultato
HTLV (Human T cell Leukemia virus)	negativo
<i>Candida albicans</i>	negativo
<i>Candida glabrata</i>	negativo
<i>Chlamydia trachomatis</i>	negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo

### R.3. SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA E SENSIBILITÀ

#### R.3.1 Specificità diagnostica:

la specificità diagnostica è la probabilità che il dispositivo fornisca un risultato negativo in assenza di un marker bersaglio. In questo modo, il risultato **vero negativo** è un campione sicuramente negativo per il marker bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo diagnostico.

Questo parametro è stato studiato esaminando 20 campioni di plasma negativi per il DNA della TOXO.

VERI NEGATIVI	20
FALSI POSITIVI	0
CAMPIONI TOTALI	20
<b>SPECIFICITÀ %</b>	<b>100</b>

Sulla base dei risultati ottenuti è stata calcolata una specificità diagnostica  $\geq 99\%$ .

#### R.3.2 Sensibilità diagnostica

La **sensibilità diagnostica** è la probabilità che il dispositivo fornisca un risultato positivo in presenza del marker bersaglio. In questo modo, il risultato **vero positivo** è un campione sicuramente positivo per il marker bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo diagnostico.

Per il kit TOXODNA.CE, il parametro è stato studiato esaminando 10 campioni di plasma e liquido amniotico positivi per il DNA di *Toxoplasma gondii*. I campioni sono stati studiati in duplicato nella stessa sessione di analisi e successivamente è stata calcolata la percentuale (%) di campioni positivi.

Campioni positivi per il DNA della TOXO	
VERI POSITIVI	10
FALSI NEGATIVI	0
CAMPIONI TOTALI	10
<b>SENSIBILITÀ %</b>	<b>100</b>

Inoltre, è stato testato il pannello QCMD 2008 *Toxoplasma gondii* (TGDNA08) EQA.

Il pannello contiene 8 campioni positivi (6 di liquido amniotico e 2 di plasma) e 2 campioni negativi (1 di plasma e 1 di liquido amniotico).

Sulla base dei risultati ottenuti, la sensibilità diagnostica del sistema è stata calcolata come 100%.

<b>Sensibilità diagnostica</b>	100%
<b>Specificità diagnostica</b>	> 99.5%

### S.4 PRECISIONE

La precisione mostra il grado di attendibilità del sistema. Ogni procedura di misurazione ha una variazione casuale intrinseca chiamata "errore casuale". L'errore casuale non ha un valore numerico, ma è determinato dalla dispersione della misurazione espressa come deviazione standard (DevST) e coefficiente di variazione (CV%). Normalmente, la precisione di un test si riferisce alla concordanza tra le misurazioni ripetute dello stesso materiale.

Per il kit TOXODNA.CE, la **precisione** è stata espressa come variabilità intra-assay e variabilità inter-assay. 8 replicati del CTRL-H e del CTRL-L sono stati analizzati nella stessa sessione (intra-assay) e in tre sessioni diverse (inter-assay).

Le variabilità intra-assay e inter-assay sono state calcolate sulla base dei risultati ottenuti.

In assenza di parametri internazionali stabiliti, abbiamo identificato il valore di accettabilità seguente per il kit TOXODNA.CE:

**coefficiente di variazione intra-assay (CV%)  $\leq 10\%$ ;**  
**coefficiente di variazione inter-assay (CV%)  $\leq 10\%$ .**

### T. LIMITAZIONI

Si consiglia all'utilizzatore di questo kit di leggere attentamente e comprendere l'insero allegato alla confezione. È necessaria la massima osservanza del protocollo per ottenere risultati attendibili. In particolare, il pipettaggio di campioni e reagenti, l'applicazione di un flusso di lavoro corretto, insieme all'attenta programmazione del termociclatore sono fondamentali per una determinazione accurata e riproducibile del DNA di *T. gondii*.

La determinazione del DNA di *T. gondii* nel campione di un paziente ha vaste implicazioni mediche, sociali, psicologiche ed economiche.

Si raccomanda quindi che riservatezza, supporto appropriato e valutazione medica siano considerati come aspetti essenziali della sequenza analitica.

### U. BIBLIOGRAFIA

- 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.
- 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.
- 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.
- Comparison between Two Amplification Sets for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis by Real-Time PCR. S. Cassaing, M. H. Bessie`res, A. Berry, A. Berrebi, R. Fabre, and J. F. Magnaval. J. Clin. Microbiol. 2006 ;44 :720-724.
- 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.
- 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. Simboli

LEGENDA			
	Codice del prodotto		Temperatura di conservazione
	Dispositivo diagnostico in vitro		Vedere le istruzioni per l'uso
	Numero di lotto		Produttore
	Data di scadenza		Numero di test
	Marchio di conformità CE		Data di produzione

Tutti i Prodotti IVD sono fabbricati dall'Azienda nell'ambito e sotto il controllo di un Sistema di Qualità certificato e approvato da un Organismo Notificato Europeo. Ogni lotto è sottoposto ad una procedura di Controllo di Qualità e rilasciato alle vendite solo se conforme alle specifiche tecniche comuni Europee e ai criteri di accettabilità definiti.

  
0318



## CONTATTI DISTRIBUTORE

### 4BShop Lab Srls

-  [info@4BShopLab.com](mailto:info@4BShopLab.com)
-  [www.4BShopLab.com](http://www.4BShopLab.com)
-  +39.0371.18.56.643

## FABBRICANTE

**Dia.Pro - Diagnostic Bioprobes Srl**

 **MADE IN ITALY**

**EN ISO 13485:2013 Certified**

