



Toxoplasma PCR

Instrução de uso
Instrucciones de uso
Usage instructions

REF K177

Revisão: Maio/2021

ÍNDICE

Finalidade	3
Princípio de Ação	3
Apresentação	3
Reagentes	4
Equipamentos e Insumos Operacionais.....	4
Condições de Armazenamento e Transporte	4
Cuidados Especiais	4
Amostras	5
Procedimento	6
A. Extração do DNA	6
B . Preparo dos Reagentes	6
C . Diluição do Padrão Quantitativo	7
D . Preparo da PCR	7
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	11
Reprodutibilidade	11
Sensibilidade Clínica	12
Sensibilidade Analítica	12
Linearidade	12
Significado Diagnóstico	12
Referências Bibliográficas	13
Atendimento ao Consumidor	13
Simbologia Universal	14

FINALIDADE

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

PRINCÍPIO DE AÇÃO

O kit **Bio Gene Toxoplasma PCR** é um ensaio *in vitro* baseado na detecção quantitativa do DNA do Toxoplasma através da PCR em tempo real.

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 do Toxoplasma, expressa em cópias/ μ L, utilizando a curva padrão gerada a partir do padrão quantitativo contido no kit.

Reagente	Apresentação	
	50 Testes	150 Testes
R1	1 x 55 μ L *	1 x 165 μ L *
R2	1 x 525 μ L *	3 x 525 μ L *
R3	1 x 525 μ L	3 x 525 μ L
R4	1 x 55 μ L *	1 x 165 μ L *
R5	1 x 600 μ L *	1 x 600 μ L *
R6	1 x 50 μ L	1 x 150 μ L
R7	1 x 500 μ L *	1 x 500 μ L *
R8	2 x 1,5 mL	2 x 1,5 mL
R9	1 x 1 mL	1 x 2 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: 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 de centrifuga de 1,5 mL.
- 4- Tubos ou placas para reação de PCR.
- 5- Luvas de látex descartáveis livres de pó ou material similar.
- 6- Microcentrifuga (3.000 - 12.000 rpm).
- 7- Vórtex.
- 8- Micropipetas e ponteiras estéreis com filtro (0,5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL).
- 9- 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 por 7 dias. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS 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. Evitar 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 nucleicos, transcrição reversa, amplificação e detecção requerem pessoal qualificado para evitar o risco de resultados errados, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos 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 deve ser utilizado com amostras de DNA extraídas de sangue total, líquido amniótico e líquido cefalorraquidiano. 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. Devem ser transportadas e armazenadas conforme descrito abaixo¹:

Líquido amniótico e líquido cefalorraquidiano: entre 2 e 8°C por 1 dia. Para longo tempo de armazenamento, recomenda-se congelar as amostras a -70°C.

Sangue total: entre 2 e 8°C por até 3 dias.

DNA (extraído): Utilizar amostras de DNA adequadas à amplificação por PCR com pureza e concentração adequadas. Para longo tempo de armazenamento, recomenda-se congelar as amostras a -70°C. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido.

PROCEDIMENTO

A. Extração do DNA

Os ácidos nucleicos (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 (vide item B,3) 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 PCR (R1)**, **Solução PCR CI (R4)**, **Controle Interno (R5)** e **Padrão A (R7)** antes da abertura dos microtubos.
- 2- Ressuspender cada frasco do reagente **Mix Taq (R2)*** com 525µL do reagente **Tampão Mix (R3)**.

*Para a apresentação de 150 testes ressuspender os frascos de **Mix Taq (R2)** conforme necessidade de uso.

*O **Mix Taq (R2)** não contém fluoróforo de referência passiva (ROX).

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

Reagentes	Apresentação	
	50 Testes	150 Testes
Solução PCR (R1)	55 µL	165 µL
Solução PCR CI (R4)	55 µL	165 µL
*Controle Interno (R5)	600 µL	600 µL

*Os reagentes R5 e R7 contêm molde de RNA/DNA. Eles devem ser manipulados (ressuspensos) em área apropriada para evitar a contaminação dos demais reagentes.

C. Diluição do Padrão Quantitativo

- 1- Ressuspender o **Padrão A (R7)** com 500µL 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 padrão 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/poços a serem utilizados, de acordo com o número de amostras, controles e padrões quantitativos a serem analisados.
- 2- Preparar o volume da solução de PCR final de acordo com o número de reações a ser realizadas.

Reagentes	1 Reação	25 Reações	50 Reações	100 Reações
Mix Taq (R2)	10 µL	250 µL	500 µL	1 mL
Solução PCR (R1)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Solução PCR CI (R4)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Água (R9)	3 µL	75 µL	150 µL	300 µL

Para o preparo de número de reação diferente deve se multiplicar o volume dos reagentes para 1 reação pelo número de reações necessárias.

- 3- Pipetar 15µL da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.
- 4- Adicionar 5µL do DNA extraído das amostras ou 5µL dos Padrões Quantitativos ou 5µL do **Controle Negativo (R6)** nos tubos previamente determinados.

5- Homogeneizar bem.

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

7- Transportar os tubos/placa para o termociclador e seguir o descrito na 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:

Alvo	Detector	Quencher
Toxoplasma	FAM	NFQ-MGB
Controle Interno	VIC	

Obs: O Controle Negativo e os Padrões Quantitativos não apresentam o Controle Interno, 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/µL

Padrão B – 2×10^4 cópias/µL

Padrão C – 2×10^3 cópias/µL

Padrão D – 2×10^2 cópias/µL

4- Defina as condições dos ciclos:

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95°C	2 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
Coefficiente 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	Amplificação/ Detecção
FAM	VIC		
Indeterminado	Indeterminado	Negativo	Válida

3- Amostras

Toxoplasma		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.

1- Cálculo de conversão para cópias/mL

$$\text{Resultado em Cópias/mL} = \frac{\text{Cópias}/\mu\text{L} * \text{Volume de eluição } (\mu\text{L})^{**}}{\text{Volume de amostra extraída (mL)}^{**}}$$

*Resultado da quantificação da amostra fornecido pelo equipamento em cópias/ μ L.

**De acordo com protocolo do kit de extração utilizado.

Exemplo: Volume de Eluição: 30 μ L

Volume de Amostra: 200 μ L (0,2 mL)

Quantificação da amostra: 5000 cópias/ μ L

$$\text{Resultado em cópias/mL} = \frac{(5000 \text{ cópias}/\mu\text{L} \times 30\mu\text{L})}{0,2\text{mL}}$$

$$\text{Resultado em cópias/mL} = 750.000 \text{ cópias/mL}$$

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

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

Não é recomendado o uso de heparina na coleta de amostras para testes moleculares, devido à inibição da PCR, podendo gerar resultados falso negativos. Amostras com presença de inibidores de PCR devem ser diluídas para reduzir o seu efeito na reação.

DESEMPENHO DO PRODUTO CONTROLE DE QUALIDADE

Exatidão

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA

O kit **Bio Gene Toxoplasma PCR** foi comparado com outro kit para a quantificação do DNA do Toxoplasma. Foram realizadas 50 análises e os resultados foram avaliados. Os resultados obtidos, entre os kits avaliados, apresentaram variações inferiores a 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)	2,412	3,411
Desvio Padrão (Log)	0,043	0,070
Coeficiente de Variação (%)	1,804	2,056

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)	3,417	3,377	3,317
Desvio Padrão (Log)	0,064	0,069	0,068
Coeficiente de Variação (%)	1,888	2,057	2,069

Sensibilidade Clínica

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

Método		Dados Clínicos		Total
Bio Gene Toxoplasma PCR	Resultado	Positivo	Negativo	
	Positivo	31	0	31
	Negativo	0	25	25
RESULTADO TOTAL		31	25	56

Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica encontrada nos estudos de performance foi 0,41 cópias/μL (- 0,387 log), ou seja, a técnica foi capaz de detectar aproximadamente 2 moléculas alvo em 5μL do produto de extração do DNA adicionado a reação de amplificação.

Linearidade

A linearidade encontrada nos estudos de performance foi de 5,230 log (2,03 x 10⁵ cópias/μL).

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

Toxoplasma gondii é o agente etiológico da toxoplasmose e pode ser transmitido por transplante de órgãos, transfusão de sangue, contato com fezes de gatos infectados e ingestão de alimentos contaminados. Em adultos a infecção é geralmente assintomática, mas há casos em imunossuprimidos com danos ao sistema nervoso central. Em gestantes há o risco de infecção fetal durante toda a gestação, no primeiro trimestre a probabilidade de infecção é menor, no entanto, quando ocorre os desfechos são graves, como aborto espontâneo e hidrocefalia. Infecções adquiridas mais tarde na gravidez, ocorrem com mais frequência e tendem a ser menos graves, mas podem gerar manifestações congênitas, como calcificações cerebrais e aprendizagem deficiente. O diagnóstico precoce em gestantes é fundamental para evitar ou minimizar sequelas para o neonato. Logo, a detecção quantitativa da toxoplasmose por PCR em tempo real time 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. Shen, L.J; Li, W; He, Y.H. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. Chinese Journal of Schistosomiasis Control. 2011 Aug;23(4):465-7, 469. Review. Chinese.
3. Sterkers, Y; Varlet-Marie, E; Marty, P; Bastien, P; ANOFEL Toxoplasma-PCR Quality Control Group. Diversity and evolution of methods and practices for the molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis in France: a 4-year survey. Clin Microbiol Infect. 2010 Oct;16(10):1594-602.
4. Wallon, M; Franck, J; Thulliez, P. et al. Accuracy of real-time polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. Obstet Gynecol. 2010 Apr;115(4):727-33.

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 Toxoplasma PCR
na ANVISA: 10269360314

SÍMBOLOGIA UNIVERSAL

	NÚMERO DE EXPLORAR		FABRICAÇÃO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTINER
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTINER PRETEND
	DATA DE VALIDADE (prazo de 48 hrs)		CONTINER MANTENHA
	LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)		PERIGOSIDADE
	o resultado é suficiente para os testes		INFLAMMÁVEL
	CONDIÇÕES RECOMENDADAS DE USO		CORROSIVO
	CONDIÇÃO CONSERVADA EM USO		TOXICO
	IMPRESSE E IMPRIME IMPRIME PRELIMINAR		MARKET CE
	INSTRUMENTO DE USO E EXPLORAR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA



Toxoplasma PCR

Español . *Instrucciones de uso*

REF K177

Revisión: Mayo/2021

ÍNDICE

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

FINALIDAD

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

PRINCIPIO DE ACCIÓN

El kit **Bio Gene Toxoplasma PCR** es un ensayo *in vitro* basado en la detección cuantitativa del DNA de Toxoplasma 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 DNA de Toxoplasma, expresa en copias/ μL , utilizando la curva patrón generada a partir de lo patrón cuantitativo contenido en el kit.

Reactivo	Presentación	
	50 Pruebas	150 Pruebas
R1	1 x 55 μL *	1 x 165 μL *
R2	1 x 525 μL *	3 x 525 μL *
R3	1 x 525 μL	3 x 525 μL
R4	1 x 55 μL *	1 x 165 μL *
R5	1 x 600 μL *	1 x 600 μL *
R6	1 x 50 μL	1 x 150 μL
R7	1 x 500 μL *	1 x 500 μL *
R8	2 x 1,5 mL	2 x 1,5 mL
R9	1 x 1 mL	1 x 2 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: Polimerasa, dNTPs, $MgCl_2$.
R3. Tapón Mix: TRIS-HCl.
R4. Solución PCR Cl: 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 de microcentrifuga 1,5mL.
- 4- Tubos o placa para reacción de PCR.
- 5- Guantes de látex desechables libres de polvo o material similar.
- 6- Microcentrifuga (3.000 - 12.000 rpm).
- 7- Vórtice.
- 8- Micropipetas y punteras esterilizadas con filtro (0,5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL).
- 9- Kit para extracción de ácidos nucleicos

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento es de -20°C (-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 por hasta 7 días. 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. Evitar 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 sangre total, líquido amniótico e líquido cefalorraquídeo. Otros tipos de muestras pueden ser utilizados de acuerdo a las recomendaciones de médico del laboratorio.

Las muestras deben ser colectadas de acuerdo con las recomendaciones del laboratorio para las pruebas moleculares. Deben ser transportados y almacenados como se describe a continuación¹:

Líquido amniótico e líquido cefalorraquídeo: entre 2 y 8°C hasta por 1 día. Para un largo tiempo de almacenamiento, se recomienda congelar las muestras a -70°C .
Sangre total: entre 2 y 8°C hasta por 3 días.

DNA (extraído): Utilizar muestras de DNA adecuadas a la amplificación por PCR con pureza y concentración adecuadas. Para un largo tiempo de almacenamiento, se recomienda congelar las muestras a -70°C . Se debe evitar el congelamiento y descongelamiento repetido.

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 (ver punto B,3) y añadido a las muestras durante la extracción, como se describe a abajo:

1- Adicionar 4µL del **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 PCR (R1)**, **Solución PCR CI (R4)**, **Control Interno (R5)** y **Patrón A (R7)** antes de la apertura de los microtubos.

2- Resuspender cada botella de lo reactivo **Mix Taq (R2)*** con 525µL del reactivo **Tapón Mix (R3)**.

*Para La presentación con 150 pruebas resuspender las botellas de lo reactivo **Mix Taq (R2)** cuando sea necesario utilizar.

*El reactivo **Mix Taq (R2)** no contiene fluoróforo de referencia pasiva (ROX).

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

Reactivos	Presentación	
	50 Pruebas	150 Pruebas
Solución PCR (R1)	55 µL	165 µL
Solución PCR CI (R4)	55 µL	165 µL
*Control Interno (R5)	600 µL	600 µL

*Los reactivos R5 y R7 contienen molde de RNA/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 500µL del **Diluyente (R8)**.
- 2- Separar 3 microtubos (no fornecido en el kit) adecuados para la dilución seriada del **Patrón A (R7)**.
- 3- Pipetear 90µL del **Diluyente (R8)** en cada microtubo y nombrarlos como B, C y D respectivamente.
- 4- En seguida, pipetear 10µL del **Patrón A (R7)** en el microtubo B y homogenizar.
- 5- Cambiar la puntera y pipetear 10µL del microtubo B en el microtubo C y homogenizar.
- 6- Cambiar la puntera y pipetear 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/pozos a ser utilizados, de acuerdo con el número de muestras, controles y patrones cuantitativos a ser analizados.
- 2- Preparar el volumen de la solución de PCR final de acuerdo con el número de reacciones que se debe realizar.

Reactivos	1 Reacción	25 Reacciones	50 Reacciones	100 Reacciones
Mix Taq (R2)	10 µL	250 µL	500 µL	1 mL
Solución PCR (R1)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Solución PCR Cl (R4)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Agua (R9)	3 µL	75 µL	150 µL	300 µL

Para la preparación de un número diferente de reacción se debe multiplicar el volumen de cada reactivo para una reacción por el número de reacciones requeridas.

- 3- Pipetear 15µL de la solución de PCR final en los microtubos/pozos a ser utilizados.
- 4- Adicionar 5µL del DNA extraído de la muestra o 5µL de los Patrones Cuantitativos o 5µL de lo **Control Negativo (R6)** en los tubos predeterminados.

5- Homogenizar bien.

6- Observar 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- Transportar los tubos/placa para el termociclador y seguir lo descrito en 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 del experimento:

Pruebas Cuantitativas con Curva Patrón.

2- Defina los detectores (sondas) fluorescentes como:

Alvo	Detector	Quencher
Toxoplasma	FAM	NFQ-MGB
Control Interno	VIC	

Obs: El Control Negativo y los Patrones Cuantitativos no presentan el Control Interno, 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/µL

Patrón B – 2×10^4 copias/µL

Patrón C – 2×10^3 copias/µL

Patrón D – 2×10^2 copias/µL

4- Defina las condiciones de los ciclos:

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

Defina "Data Collection" como "stage 2, step 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	Amplificación/ Detección
FAM	VIC		
Indeterminado	Indeterminado	Negativo	Válida

3- Muestras

Toxoplasma		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.

1- Cálculo de conversión para copias/mL

$$\text{Resultado en Copias/mL} = \frac{\text{Copias}/\mu\text{L} * \text{x Volumen de elución } (\mu\text{L})^{**}}{\text{Volumen de la muestra extraída (mL)}^{**}}$$

* Resultado de la cuantificación de la muestra proporcionados por lo equipamiento de copias/ μ L.

** De acuerdo con protocolo del kit de extracción utilizado.

Ejemplo: Volumen de elución: 30µL
 Volumen de la muestra: 200µL (0,2 mL)
 Cuantificación de la muestra: 5000 copias/µL

$$\text{Resultado en copias/mL} = \frac{(5000 \text{ copias/}\mu\text{L} \times 30\mu\text{L})}{0,2 \text{ mL}}$$

Resultado en copias/mL = 750.000 copias/mL

LIMITACIONES DEL PROCESO

Contaminaciones cruzadas que ocurren durante la colecta de la muestra, procesamiento, transporte y almacenamiento podrán ocasionar resultados falsos. No se recomienda el uso de heparina en la toma de muestras para pruebas moleculares, debido a la inhibición de la PCR, pudiendo generar resultados falsos negativos.

Las muestras con presencia de inhibidores de la PCR deben diluirse para reducir su efecto en la reacción.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

CONTROL DE CALIDAD

Exactitud

COMPARACIÓN DE MÉTODOS Y ESPECIFICIDAD METODOLÓGICA

El kit **Bio Gene Toxoplasma PCR** fue comparado con otro protocolo para la cuantificación del DNA de Toxoplasma. Fueron realizadas 50 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 el 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)	2,412	3,411
Desvio Patrón (Log)	0,043	0,070
Coefficiente de Variación (%)	1,804	2,056

REPRODUCTIBILIDAD

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

	Día 1	Día 2	Día 3
Concentración Promedio (Log)	3,417	3,377	3,317
Desvío Patrón (Log)	0,064	0,069	0,068
Coefficiente de Variación (%)	1,888	2,057	2,069

Sensibilidad Clínica

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

Método		Datos Clínicos		Total
Bio Gene Toxoplasma PCR	Resultado	Positivo	Negativo	
	Positivo	31	0	31
	Negativo	0	25	25
RESULTADO TOTAL		31	25	56

Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica encontrada en los estudios de desempeño fue 0,41 copias/ μ L (- 0,387 log), o sea, la técnica fue capaz de detectar aproximadamente 2 moléculas alvo en 5 μ L del producto de extracción del DNA adicionado a reacción de amplificación.

Linealidad

La linealidad encontrada en los estudios de rendimiento fue de 5.230 log (2.03×10^5 copias/ μ L).

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

Toxoplasma gondii es el agente causante de la toxoplasmosis puede transmitirse a través del trasplante de órganos, la transfusión de sangre, el contacto con heces de gatos infectados y la ingestión de alimentos contaminados. En los adultos la infección es

generalmente asintomática, pero hay casos en los inmunosuprimidos con daños en el sistema nervioso central. En las mujeres embarazadas hay un riesgo de infección fetal durante el embarazo en el primer trimestre sin embargo el riesgo de infección es más baja, cuando los resultados son grave ocurre, como aborto involuntario y la hidrocefalia. Las infecciones adquiridas más tarde en el embarazo se producen con más frecuencia y tienden a ser menos graves, pero pueden dar lugar a trastornos congénitos, como calcificaciones cerebrales y problemas de aprendizaje. El diagnóstico precoz en las mujeres embarazadas es esencial para evitar o reducir al mínimo las consecuencias para el recién nacido. Por lo tanto, la detección cuantitativa de la toxoplasmosis por PCR en tiempo real es muy importante.

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. Shen, L.J; Li, W; He, Y.H. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. Chinese Journal of Schistosomiasis Control. 2011 Aug;23(4):465-7, 469. Review. Chinese.
3. Sterkers, Y; Varlet-Marie, E; Marty, P; Bastien, P; ANOFEL Toxoplasma-PCR Quality Control Group. Diversity and evolution of methods and practices for the molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis in France: a 4-year survey. Clin Microbiol Infect. 2010 Oct;16(10):1594-602.
4. Wallon, M; Franck, J; Thulliez, P. et al. Accuracy of real-time polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. Obstet Gynecol. 2010 Apr;115(4):727-33.

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 Toxoplasma PCR
en la ANVISA: 10269360314

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

	PRIMEROS AUXILIOS		ELABORADO POR
	NÚMERO DE LOTE		CONTROL
	FECHA DE FABRICACIÓN		CONTROL POSITIVO
	ESTABLE HASTA (FECHA - SIN ABRIR)		CONTROL NEGATIVO
	TEMPERATURA LIMITE (MANTENER A)		RIESGO BIOLÓGICO
	CONTENER SUPERFICIE PARA «X» TESTES		INFLAMABLE
	CONSULTAR INSTRUCCIONES DE USO		EXPLOSIVO
	RESULTADO DE DIAGNOSTICO IN VITRO		TOXICO
	EMISOR, IMPORTADOR AUTORIZADO		MARCA CE
	RIESGO DEL RAYO T-CABLE		NO FUMAR SI EL EMPAQUE ES INFUMABLE



Toxoplasma PCR

English . Usage instructions

REF K177

Review: May/2021

INDEX

Function	3
Principle of Action	3
Presentation	3
Reagents	4
Equipaments and Operational Inputs	4
Transportation and Storage Conditions	4
Special Care	4
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
Linearity	12
Diagnostic Significance	12
Bibliographic References	13
Customer Service	13
Universal Symbolology	14

FUNCTION

Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* DNA using Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) technology. Designed for *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF ACTION

The **Bio Gene Toxoplasma PCR** test is a *in vitro* assay based on the quantitative detection of Toxoplasma DNA by Real-Time PCR.

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

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

Reagent	Presentation	
	50 Tests	150 Tests
R1	1 x 55 μL *	1 x 165 μL *
R2	1 x 525 μL *	3 x 525 μL *
R3	1 x 525 μL	3 x 525 μL
R4	1 x 55 μL *	1 x 165 μL *
R5	1 x 600 μL *	1 x 600 μL *
R6	1 x 50 μL	1 x 150 μL
R7	1 x 500 μL *	1 x 500 μL *
R8	2 x 1,5 mL	2 x 1,5 mL
R9	1 x 1 mL	1 x 2 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: 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 x 10⁵ copies/μL): 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- 1.5 ml microcentrifuge tubes.
- 4- PCR reaction tubes or plate.
- 5- Powder free latex gloves or similar material.
- 6- Microcentrifuge (3,000 - 12,000 rpm).
- 7- Vortex.
- 8- Micropipettes and sterile filter pipette tips (0.5-10μL, 10-100μL, 100-1000μL).
- 9- 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 and 30°C for 7 days. 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 whole blood, amniotic fluid and cerebrospinal fluid. Samples should be collected according to laboratory recommendations for molecular testing. They must be transported and stored as described below¹:

Amniotic fluid and cerebrospinal fluid: between 2 to 8° C for up to 1 day. For long-term storage, it is recommended to freeze samples at – 70° C.

Whole blood: between 2 to 8° C for up to 3 days.

DNA (extracted): Use DNA samples suitable for PCR amplification with adequate purity and concentration. For long-term storage, it is recommended to freeze samples at – 70° C. Avoid repeated freezing and thawing of the samples.

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 (see item B,3) 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 each vial of **Mix Taq (R2)*** reagent with 525µL of **Mix Buffer (R3)** reagent.

*For the presentation of 150 tests resuspend the **Mix Taq (R2)** vials as need of use.

*The **Mix Taq (R2)** reagent does not contain passive reference Dye (ROX).

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	Presentation	
	50 Tests	150 Tests
PCR Solution (R1)	55 µL	165 µL
IC PCR Solution (R4)	55 µL	165 µL
*Internal Control (R5)	600 µL	600 µL

*R5 and R7 reagents contain RNA/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 90 μL of the **Diluent (R8)** in each microtube and name them as B, C and D respectively.
- 4- Pipette 10 μL of **Standard A (R7)** in microtube B and mix.
- 5- Replace the tip and pipette 10 μL of microtube B in microtube C and mix.
- 6- Replace the tip and pipette 10 μL 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/wells to be used on the reaction, in accord to the number of samples, controls and quantitative standards to be used.
- 2- Prepare the final PCR solution in accord with reactions number required.

Reagents	1 Reaction	25 Reactions	50 Reactions	100 Reactions
Mix Taq (R2)	10 μL	250 μL	500 μL	1 mL
PCR Solution (R1)	1 μL	25 μL	50 μL	100 μL
CI PCR Solution (R4)	1 μL	25 μL	50 μL	100 μL
Water (R9)	3 μL	75 μL	150 μL	300 μL

To prepare different reaction number must be multiplied the volume of reagents for a reaction by the number of required reactions.

- 3- Pipette 15 μL of the final PCR solution in microtubes or wells previously determined.
- 4- Add 5 μL of extracted DNA sample or 5 μL of Quantitative Standards or 5 μL of **Negative Control (R6)** in previously determined tubes.
- 5- Mix well.

- 6-** The total volume of the reaction is 20 μ L. Each PCR run should include the relevant controls: Negative Control, Internal Control and Quantitative Standards.
- 7-** Transport the tubes/plate to the thermocycler and follow the instructions in 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:

Target	Detector	Quencher
Toxoplasma	FAM	NFQ-MGB
Internal Control	VIC	

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

3- Set the quantitative standards:

Standard A - 2×10^5 copies/ μ L

Standard B - 2×10^4 copies/ μ L

Standard C - 2×10^3 copies/ μ L

Standard D - 2×10^2 copies/ μ L

4- Set the cycling conditions:

Stage	Temperature	Time	Cycles
1	95°C	2 minutos	1
2	95°C	10 segundos	50
	60°C	60 segundos	

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

F. Result Validation

1- Standard Curve

Standard Curve	Permitted Range	Amplification / Detection
Correlation Coefficient (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	Amplification/ Detection
FAM	VIC		
Undetermined	Undetermined	Negative	Valid

3- Samples

Toxoplasma		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, samples concentration 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.

1- Conversion calculation for copies/mL

$$\text{Result in copies/mL} = \frac{\text{Copies}/\mu\text{L} \times \text{Elution volume } (\mu\text{L})^{**}}{\text{Extracted sample volume (mL)}^{**}}$$

*Result of sample quantification provided by the equipment in copies/ μ L.

**According to the protocol of the extraction kit used.

Example: Elution volume: 30µL
Sample volume: 200µL (0.2 mL)
Quantification of the sample: 5000 copies/µL

$$\text{Result in copies/mL} = \frac{(5000 \text{ copies/}\mu\text{L} \times 30\mu\text{L})}{0.2 \text{ mL}}$$

$$\text{Result in copies/mL} = 750,000 \text{ copies/mL}$$

PROCESS LIMITATIONS

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

The heparin use in the samples collection for molecular tests is not recommended, due to the PCR inhibition which can generate false negative results.

The samples with presence of PCR inhibitors should be diluted to reduce their effect on the reaction.

PRODUCT PERFORMANCE QUALITY CONTROL

Accuracy

COMPARISON OF METHODS AND METHODOLOGY SPECIFICITY

The **Bio Gene Toxoplasma PCR** test was compared with another protocol for the quantification of the Toxoplasma DNA. 50 analyzes were performed and the results were evaluated. Comparing the two tests, the difference between the results obtained was ≤ 0.5 log. This show 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)	2.412	3.411
Standard Deviation (Log)	0.043	0.070
Coefficient of variation (%)	1.804	2.056

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)	3.417	3.377	3.317
Standard Deviation (Log)	0.064	0.069	0.068
Coefficient of variation (%)	1.888	2.057	2.069

Clinical Sensitivity

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

Method		Clinical Data		Total
Bio Gene Toxoplasma PCR	Result	Positive	Negative	
	Positive	31	0	31
	Negative	0	25	25
TOTAL		31	25	56

Analytical Sensitivity

It was found in the performance study that the analytical sensitivity of the kit is 0.41 copies/ μ L (- 0.387 log). This means the assay is capable to detect approximately 2 target molecules in 5 μ L DNA extraction product, used on the amplification reaction.

Linearity

The linearity found in the performance studies was 5.230 log (2.03×10^5 copies/ μ L).

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Toxoplasma gondii is the etiological agent of toxoplasmosis can be transmitted through organ transplantation, blood transfusion, contact with feces from infected cats and ingestion of contaminated food. In adults the infection is usually asymptomatic, but there are cases in immunosuppressed with damage to the central nervous system. In pregnant, there is a risk

of fetal infection throughout pregnancy in the first trimester the risk of infection is lower, however, when the outcomes are serious occurs, such as miscarriage and hydrocephalus. Infections acquired later in pregnancy occur more often and tend to be less severe, but can lead to congenital disorders, such as cerebral calcifications and impaired learning. Early diagnosis in pregnant is essential to avoid or minimize consequences to the neonate. Therefore, the quantitative detection of toxoplasmosis by real time PCR is very important to be a sensitive method, precise and responsive.

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. Shen, L.J; Li, W; He, Y.H. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. Chinese Journal of Schistosomiasis Control. 2011 Aug;23(4):465-7, 469. Review. Chinese.
3. Sterkers, Y; Varlet-Marie, E; Marty, P; Bastien, P; ANOFEL Toxoplasma-PCR Quality Control Group. Diversity and evolution of methods and practices for the molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis in France: a 4-year survey. Clin Microbiol Infect. 2010 Oct;16(10):1594-602.
4. Wallon, M; Franck, J; Thulliez, P. et al. Accuracy of real-time polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. Obstet Gynecol. 2010 Apr;115(4):727-33.

CUSTOMER SERVICE

Customer Advisory Service

Phone: 0800 031 5454

E-mail: sac@bioclin.com.br

ANVISA registration for Bio Gene Toxoplasma PCR: 10269360314

UNIVERSAL SYMBOLOGY

	CUSTOM NUMBER		MANUFACTURED BY
	WATER CODE		CONTROL
	DATE OF MANUFACTURE		POSITIVE CONTROL
	LOAD BY (last day of month)		NEGATIVE CONTROL
	TEMPERATURE LIMITATION (temp °C)		BIOHAZARD RISK
	CHEMICAL SUPPRESSION FOR qPCR TESTS		FLAMMABLE
	COMPLETE INSTRUCTIONS FOR USE		CORROSIVE
	NO OTHER INFORMATION ENTRY		POISON
	NO OPEN FLAME SOURCES NEARBY DURING USE		CE MARK
	NO OPEN FLAME SOURCES NEARBY DURING USE		NO OPEN FLAME SOURCES NEARBY DURING USE



Bioclin · QUIBASA



Rua Teles de Menezes . 92 . Belo Horizonte . MG . Brasil . CEP: 31565-130

Tel +55 31 3439 5454 . www.bioclin.com.br

FARM. RESP. Sílvia Wandalsen Arndt - CRF MG 7422

C.N.P.J.: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira