

Vitassay qPCR

Toxoplasmosis

PCR en tiempo real para la detección cualitativa e identificación de ADN de *Toxoplasma gondii* en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and identification of *Toxoplasma gondii* DNA in clinical samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR Toxoplasmosis permite la detección cualitativa y la identificación del ADN de *Toxoplasma gondii* mediante PCR en tiempo real en muestras de sangre y LCR de pacientes con sospecha de una infección por *Toxoplasma gondii* por el profesional de la salud. Este producto está destinado para facilitar en el diagnóstico de las infecciones por *Toxoplasma gondii*, junto con los datos clínicos del paciente, los factores de riesgo epidemiológicos y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

Referencias

Vitassay qPCR Toxoplasmosis 4x8-well strip, low profile	7041078
Vitassay qPCR Toxoplasmosis 4x8-well strip, high profile	7042078

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S078/ 7042S078	Toxoplasmosis strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C078	Toxoplasmosis Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o ≤ -70°C).
- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL

- Vórtex
- Micropipetas (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario intracelular obligado que infecta a la mayoría de las especies de animales de sangre caliente, incluido el ser humano, y causa la enfermedad de la toxoplasmosis. *T. gondii* pertenece a la familia *Apicomplexa*. *T. gondii* se compone de más de 15 genotipos genéticamente distintos, que pueden organizarse en 6 clados. Históricamente, las cepas mejor estudiadas y caracterizadas se denominan tipo I, II y III (haplotipos 1, 2 y 3, respectivamente). Los únicos huéspedes definitivos conocidos de *Toxoplasma gondii* son los miembros de la familia *Felidae* (gatos domésticos y sus parientes). En el huésped humano, los parásitos forman quistes de tejido, más comúnmente en el músculo esquelético, el miocardio, el cerebro y los ojos.

Los seres humanos pueden infectarse al comer carne poco cocinada de animales infectados, al consumir alimentos o agua contaminados con heces de gato o por muestras ambientales contaminadas, por transfusión de sangre o trasplante de órganos y por vía transplacentaria de la madre al feto. Se calcula que el 30% de la población humana mundial está infectada de forma crónica. Las tasas de infección humana por *T. gondii* oscilan entre el 10% en Estados Unidos y más del 50% en Francia, Colombia y Brasil. Se considera que la toxoplasmosis es una de las principales causas de muerte atribuidas a enfermedades de origen alimentario en Estados Unidos.

Las personas sanas que se infectan con *Toxoplasma gondii* no suelen presentar síntomas porque su sistema inmunitario suele impedir que el parásito cause la enfermedad. Cuando se produce la enfermedad, suele ser leve, con síntomas parecidos a los de la gripe (por ejemplo, sensibilidad en los ganglios linfáticos, dolores musculares, etc.) que duran de semanas a meses y luego desaparecen. Sin embargo, el parásito permanece en el cuerpo de la persona en un estado inactivo, y puede reactivarse si la persona se vuelve inmunosuprimida. Sin embargo, si una mujer se infecta con *Toxoplasma* durante o justo antes del embarazo, puede transmitir la infección al feto (transmisión congénita). Los daños en el feto suelen ser más graves cuanto más temprano en el embarazo se produzca la transmisión. Los resultados potenciales pueden ser un aborto espontáneo, un niño nacido muerto y un niño nacido con signos de toxoplasmosis congénita (por ejemplo, agrandamiento anormal o pequeñez de la cabeza). Las personas con sistemas inmunitarios comprometidos también pueden experimentar síntomas graves.

El diagnóstico de la toxoplasmosis se basa rutinariamente en la serología. El diagnóstico de las infecciones congénitas puede lograrse mediante la detección del ADN de *T. gondii* en el líquido amniótico utilizando métodos moleculares como la PCR. El gen B1 repetido

35 veces se ha utilizado habitualmente para este diagnóstico molecular desde 1989, con una sensibilidad aceptable, pero más recientemente se ha descrito otra secuencia (REP-529) que se repite entre 200 y 300 veces, lo que permite detectar mejor las cargas parasitarias bajas.

Principio del test

Vitassay qPCR Toxoplasmosis se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de los genes *rep529* y *B1* de *Toxoplasma gondii*. Tras la extracción de DNA, la presencia de *Toxoplasma gondii* se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrólisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5' - 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR Toxoplasmosis se trata de una prueba lista para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana de los genes *rep529* y *B1* de *Toxoplasma gondii* es detectada en el canal FAM, mientras que el control interno es detectado en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos

ni reactivos a un área anterior. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.

- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

Procedimiento

Toma, transporte y conservación de muestras

Para la recogida, la conservación y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR Toxoplasmosis ha sido testado en muestras de sangre y LCR de pacientes con sospecha de una infección por *Toxoplasma gondii*. El usuario debe validar otros tipos de muestras.

En general, las muestras clínicas deben recogerse adecuadamente en recipientes limpios, etiquetarse correctamente y procesarse con prontitud para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. El transporte debe realizarse siempre conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Las muestras pueden transportarse a temperatura ambiente durante un máximo de 2 horas. Para un transporte de mayor duración (más de 2 horas), se recomienda el envío a -20°C o menos. Las muestras pueden conservarse congeladas a -20°C o menos (a -80°C idealmente) para una conservación de mayor duración. Los ciclos de congelación-descongelación deben ser evitados para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Para más información puede consultar las siguientes guías:

- IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94)

Extracción de DNA

Para el aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas se puede utilizar un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones del kit de extracción utilizado. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- MagDEA Dx SV Kit, utilizando el instrumento magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Toxoplasmosis Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo para cada uno de los ensayos).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) o Control positivo reconstituido (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la polimerasa	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	45
Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (*Toxoplasma gondii*), y HEX, VIC o JOE (Control Interno, CI). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación compruebe la emisión de señal de control interno (CI).

Utilice la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la reacción (antes de la interpretación de los resultados de las muestras), para garantizar que el *threshold* se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de *threshold* puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal. Se recomienda establecer los valores de *threshold* para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final.

Antes de analizar el resultado de las muestras debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación (Ct ≤40) en los canales FAM.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal (Ct >40 o no señal) de FAM.

El control interno (CI) debe mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos de control positivo y negativo.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el control positivo para cualquier canal. El ensayo se debe de repetir.

Una vez validado el resultado de los controles, con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados de las muestras:

<i>Toxoplasma gondii</i> (FAM)	Control interno (HEX)	Interpretación	
+	+/- ¹	Válido	DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> detectado
-	+ ²	Válido	DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> no Detectado ²
-	- ²	Inválido	Test fallido ²

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40)

Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct >40 o no señal)

¹ En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal).

² En el caso de que la detección de las regiones diana de *Toxoplasma gondii* resulte negativa, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct > 35 del control interno, el resultado se considera "invalido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado, en función del material disponible (obtener un nuevo espécimen y volver a testar, volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, repetir qPCR con la misma muestra de DNA aislada).

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

La evaluación clínica de Vitassay qPCR Toxoplasmosis se llevó a cabo utilizando un total de 22 muestras clínicas (8 muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR), 13 de sangre total con EDTA y 1 de suero), todas ellas positivas a *Toxoplasma gondii*. Las extracciones de ADN se realizaron con el kit MagDEA Dx SV, utilizando el instrumento magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.) y el termociclador utilizado fue el CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Los resultados obtenidos se compararon con el método molecular de rutina (RT-PCR casera validada en tiempo real) utilizado en Eurofins Biomnis. Los resultados obtenidos fueron positivos para el protozoo en todas las muestras. Se obtuvo una concordancia del 100% con la caracterización inicial.

Muestra	TP	TN	FP	FN	SE	SP
Todas muestras	22	0	0	0	1(0.84-1)	NA*
Sangre y derivados de la sangre	14	0	0	0	1(0.76-1)	NA*
LCR	8	0	0	0	1(0.63-1)	NA*

TP: verdadero positivo; TN: verdadero negativo; FP: falso positivo; FN: falso negativo; SE: sensibilidad; SP: especificidad. * Debido a la falta de resultados negativos verdaderos, no se pudo realizar el cálculo de la especificidad.

En conclusión, el kit de Vitassay qPCR Toxoplasmosis representa una herramienta de diagnóstico eficiente para la detección de *Toxoplasma gondii*, ya que los resultados muestran una alta concordancia.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de *Toxoplasma gondii* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección

de 4 copias de DNA/ μ L de muestra para *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre (tasa positividad $\geq 95\%$).

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de *Toxoplasma gondii* fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas con ninguna de las especies:

Prueba de reactividad cruzada					
<i>Leptospira</i>	-	Chikungunya Virus F24	-	<i>Anaplasma maginale</i>	-
<i>Bartonella henselae</i> cepa Houston-1	-	Chikungunya Virus Martinique	-	Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas cepa Neudorfl	-
<i>Borrelia hermsii</i>	-	Chikungunya Virus WHO IS (R91064)	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-
<i>Borrelia lusitanae</i>	-	<i>Coxiella burnetii</i> cepa Nine Mile Q	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
<i>Borrelia valaisiana</i>	-	Dengue 1 Hawaii A	-	<i>Rickettsia conorii</i> cepa Moroccan	-
<i>Borrelia azfeli</i> cepa P-Ko/1984	-	Dengue 2 Nueva Guinea C	-	Virus del Nilo Occidental NY99	-
<i>Borrelia bavariensis</i>	-	Dengue 3 H87	-	Virus del Nilo Occidental Heja	-
<i>Borrelia bisetti</i>	-	Dengue 4 H241	-	Virus del Nilo Occidental Ug37	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> cepa IRS	-	Virus de la Encefalitis Japonesa Nakayama	-	Virus de la Fiebre Amarilla cepa 17D	-
<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> cepa B31	-	<i>Theileria annulata</i>	-	Virus de la Fiebre Amarilla French Neurotropic	-
<i>Borrelia garinii</i> cepa tipo	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-	Zika FB-GWUH-2016	-
<i>Borrelia japonica</i>	-	Virus Usutu	-	Zika Virus cepa Africana	-
<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	Virus de la fiebre del Valle del Rift AR21229	-	Zika Virus cepa Asiática PF13/251013-18	-
<i>Borrelia spielmanii</i>	-	Virus de la fiebre del Valle del Rift MP12	-	Zika Virus Polinesia Francesa cepa 11474/16	-
Chikungunya S27 Petersfield	-	Virus de la Encefalitis San Luis	-	Zika Virus Polinesia Francesa cepa 11468/16	-

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Toxoplasmosis se evaluó frente al DNA extraído de *Toxoplasma gondii* (tipo II), mostrando resultados positivos.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Toxoplasmosis ha sido validado en los siguientes equipos:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^I
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- MIC qPCR Cycler (Bio Molecular Systems)
- LightCycler 480 Instrument II (Roche)
- NEOS-96 Real Time PCR System (Linear)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- QuantGene 9600 (BioEr Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^{II}

^I: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

^{II}: Para los equipos Rotor-Gene® Q y MIC qPCR Cycler, el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de los equipos.

Limitaciones

- Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido validado con DNA extraído de muestras de sangre y LCR. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. Esta prueba es un ensayo cualitativo.

- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por el *Toxoplasmosis* positive control durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por productos de PCR de reacciones anteriores.
- La detección puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido la extracción de DNA); c) Degradación del DNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; e) presencia de inhibidores de la amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); f) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante; g) mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de *Toxoplasma gondii*.
- La detección del DNA puede no indicar la presencia de protozoos viables y/o infecciosos o que *Toxoplasma gondii* sea el agente causante de los síntomas clínicos.
- Los resultados negativos no impiden la infección por *Toxoplasma gondii* y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimos y/o la etapa de infección más adecuados para su recolección. Considere la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar el protozoo.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con *Toxoplasma gondii*, y se han descartado otras enfermedades parasitarias, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR, el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.

Adjunto I. Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾
Azure Cielo 6
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Roche
LightCycler® 480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}
LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}

Formatos especiales ⁽⁷⁾
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cycler
Cepheid
SmartCycler®
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Qiagen
Rotor-Gene® Q

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 ⁽¹⁾
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena
qTOWER
BIONEER
Exicycler™ 96
BIOER
QuantGene 9600
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽⁸⁾
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
QIAquant 96

- (1) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos de PCR a tiempo real.
- (2) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (3) No lectura en canal ROX.
- (4) No lectura en canal Cy5.
- (5) Lectura solo en canales FAM y HEX.
- (6) Se requiere compensación de color específica.
- (7) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento de la prueba) y transvasar a los tubos específicos Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q o geneLEAD VIII System.
- (8) Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición.

Adjunto II. Canales de detección de los equipos a tiempo real más comunes

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480 II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition"
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III. Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

Intended use

Vitassay qPCR Toxoplasmosis allows the qualitative detection and identification of DNA from *Toxoplasma gondii* by Real-Time PCR in blood samples and CSF from patients suspected of *Toxoplasma gondii* infection by their healthcare professional. This product is intended to aid in the *Toxoplasma gondii* infections diagnosis, alongside the patient's clinical data, epidemiological risk factors, and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Toxoplasmosis 4x8-well strip, low profile	7041078
Vitassay qPCR Toxoplasmosis 4x8-well strip, high profile	7042078

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S078/ 7042S078	Toxoplasmosis strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C078	Toxoplasmosis Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4 x 8-cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated on the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. To avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex

- Micropipettes (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan parasite that infects most species of warm-blooded animals, including humans, and causes the disease toxoplasmosis. *T. gondii* is in the *Apicomplexa* family. *T. gondii* is comprised of 15+ genetically distinct genotypes, which can be organized into 6 clades. Historically, the best studied and characterized of these strains are called type I, II, and III (haplotypes 1, 2, and 3, respectively). The only known definitive hosts for *Toxoplasma gondii* are members of family *Felidae* (domestic cats and their relatives). In the human host, the parasites form tissue cysts, most commonly in skeletal muscle, myocardium, brain, and eyes.

Humans can become infected by eating undercooked meat of infected animals, consuming food or water contaminated with cat feces or by contaminated environmental samples, blood transfusion or organ transplantation and transplacentally from mother to fetus. It is estimated that 30% of the global human population is chronically infected. Rates of human *T. gondii* infection range from 10% in the United States to over 50% in France, Colombia, and Brazil. Toxoplasmosis is considered to be a leading cause of death attributed to foodborne illness in the United States.

Healthy people who become infected with *Toxoplasma gondii* often do not have symptoms because their immune system usually keeps the parasite from causing illness. When illness occurs, it is usually mild with “flu-like” symptoms (e.g., tender lymph nodes, muscle aches, etc.) that last for weeks to months and then go away. However, the parasite remains in the person’s body in an inactive state, and it can become reactivated if the person becomes immunosuppressed. However, if a woman becomes newly infected with *Toxoplasma* during or just before pregnancy, she can pass the infection to her unborn baby (congenital transmission). The damage to the unborn child is often more severe the earlier in pregnancy the transmission occurs. Potential results can be a miscarriage, a stillborn child and a child born with signs of congenital toxoplasmosis (e.g., abnormal enlargement or smallness of the head). Persons with compromised immune systems may also experience severe symptoms.

The toxoplasmosis diagnosis is routinely based on serology. Congenital infections diagnosis can be achieved by detecting *T. gondii* DNA in amniotic fluid using molecular methods such as PCR. The 35-fold repeated B1 gene has commonly been used for this molecular diagnosis since 1989, with acceptable sensitivity, but another sequence (REP-529) was described more recently as being repeated 200 to 300 times, which leads to a better detection of low parasite loads.

Principle of the test

Vitassay qPCR Toxoplasmosis is based on the real-time amplification of a conserved region of *rep529* and *B1* genes of *Toxoplasma gondii*. After DNA extraction, the *Toxoplasma gondii* presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to spread the primers, the probe is hydrolyzed by its exonuclease 5'-3' activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The increase in the resulting fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR Toxoplasmosis is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible inhibition reaction. The amplification of the target sequence *rep529* and *B1* genes of *Toxoplasma gondii* is detected through the FAM channel, whereas the internal control (IC) is detected through the HEX, VIC, or JOE channel (depending on the equipment used).

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile disposable aerosol resistant pipette tips or RNase/DNase positive displacement pipette tips is recommended.

- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the tube bottom, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the test functionality.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Specimen collection, transport, and conservation

For specimen collection, conservation, and transport, user-validated conditions must be followed. The Vitassay qPCR Toxoplasmosis has been tested blood samples and CSF from patients suspected of *Toxoplasma gondii* infection. Other sample types must be validated by the user.

Overall, clinical samples should be collected appropriately in clean containers, correctly labelled and promptly processed to ensure the test's quality. It is recommended to use fresh specimens for the test. Transport must always be carried out in accordance with local and national regulations for the transport of biological samples. The specimens should be transported at room temperature for up to 2 hours. For long term transport (more than 2 hours), we recommend shipping at -20°C or lower. The samples can be stored frozen at -20°C or lower (at -80°C ideally) for long-term conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For more information, refer to the following guidelines:

- IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94)

DNA extraction

For nucleic acid isolation from clinical specimens, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. The assay has been validated with the following extraction kits:

- MagDEA Dx SV Kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Toxoplasmosis Positive Control (red tube) with 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run for each assay.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative control (yellow tube) or reconstituted positive control (red tube) and add them into the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Polymerase activation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	45
Annealing/Extension (Data collection*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (*Toxoplasma gondii*) and HEX, VIC, or JOE (Internal Control) channels. Depending on the equipment used select the proper detection channel (Attached II).

Analysis and interpretation of results

The results analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, check the internal control (IC) signal emission.

Use the positive control amplification curve as a starting point during reaction validation (prior to interpretation of sample results), to ensure that the threshold falls within the exponential phase of the amplification curves and above any background noise signals. The threshold value may vary between different instruments due to different signal intensities. It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end user.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve ($Ct \leq 40$) in FAM channel, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence ($Ct > 40$ or no signal) in FAM channel, which validates the reaction.

The Internal Control (IC) should show an amplification signal ($Ct \leq 40$) in positive and negative controls wells.

The experiment seems to be failed if there is amplification signal in negative control or signal absence in the positive control for any channel. The assay should be repeated.

The clinical samples test results assessment should be performed once controls' results have been validated. The result interpretation is summarized in the following table:

<i>Toxoplasma gondii</i> (FAM)	Internal Control (HEX)	Interpretation	
+	+/- ¹	Valid	<i>Toxoplasma gondii</i> DNA detected
-	+ ²	Valid	<i>Toxoplasma gondii</i> DNA not Detected ²
-	- ²	Invalid	Test failed ²

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤40)

(-) Negative: No amplification signal (Ct >40 or no signal)

¹ Sometimes, the Internal Control (IC) detection is not necessary since a high copies number of the target can cause a preferential amplification of target-specific nucleic acids. The Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal).

² In the case of negative *Toxoplasma gondii* target genes detection, IC must show an amplification signal with Ct ≤35. If there is a signal' absence or Ct value > 35 of Internal Control, the result is considered 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR by diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or to re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition problems.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each qPCR steps and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate, depending on the available material (repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, obtain a new specimen and retest).

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

Quality Control

To confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Moreover, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

The Vitassay qPCR Toxoplasmosis clinical evaluation was performed using a total of 22 clinical samples (8 cerebrospinal fluid (CSF), 13 EDTA whole blood and 1 serum), all of which were positive for *Toxoplasma gondii*. DNA extractions were performed with the MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and the thermocycler used was the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The obtained results were compared with the routine molecular method (validated home-made real-time RT-PCR) used at Eurofins Biomnis. The obtained results were positive for the protozoan in all samples. A 100% concordance with the initial characterization was obtained.

Sample	TP	TN	FP	FN	SE	SP
All samples	22	0	0	0	1(0.84-1)	NA*
Blood and blood derivatives	14	0	0	0	1(0.76-1)	NA*
CSF	8	0	0	0	1(0.63-1)	NA*

TP: true positive; TN: true negative; FP: false positive; FN: false negative; SE: sensitivity; SP: specificity. * Due to the lack of true negative results, the specificity calculation could not be performed.

In conclusion, the Vitassay qPCR Toxoplasmosis kit represents an efficient diagnostic tool for the *Toxoplasma gondii* detection, as the results show high concordance.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of *Toxoplasma gondii* ranging from 10^7 to 10^1 copies/reaction. This assay has a detection limit of 4 DNA copies/ μ L for *Toxoplasma gondii* in blood samples (positive rate $\geq 95\%$).

Analytical specificity

The analytical specificity for the *Toxoplasma gondii* detection was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was observed with any of the species:

Cross-reactivity testing					
<i>Leptospira</i>	-	Chikungunya Virus F24	-	<i>Anaplasma maginale</i>	-
<i>Bartonella henselae</i> strain Houston-1	-	Chikungunya Virus Martinique	-	Tick-borne encephalitis virus strain Neudorfl	-
<i>Borrelia hermsii</i>	-	Chikungunya Virus WHO IS (R91064)	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-
<i>Borrelia lusitanae</i>	-	<i>Coxiella burnetii</i> strain Nine Mile Q	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
<i>Borrelia valaisiana</i>	-	Dengue 1 Hawaii A	-	<i>Rickettsia conorii</i> strain Moroccan	-
<i>Borrelia azfeli</i> strain P-Ko/1984	-	Dengue 2 New Guinea C	-	West Nile Virus NY99	-
<i>Borrelia bavariensis</i>	-	Dengue 3 H87	-	West Nile Virus Heja	-
<i>Borrelia bisetti</i>	-	Dengue 4 H241	-	West Nile Virus Ug37	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> strain IRS	-	Japanese Encephalitis Virus Nakayama	-	Yellow Fever Virus strain 17D	-
<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> strain B31	-	<i>Theileria annulata</i>	-	Yellow Fever Virus French Neurotropic	-
<i>Borrelia garinii</i> strain type	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-	Zika FB-GWUH-2016	-
<i>Borrelia japonica</i>	-	Usutu Virus	-	Zika Virus African strain	-
<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	Rift Valley Fever Virus AR21229	-	Zika Virus Asian strain PF13/251013-18	-
<i>Borrelia spielmanii</i>	-	Rift Valley Fever Virus MP12	-	Zika Virus French Polynesia strain 11474/16	-
Chikungunya S27 Petersfield	-	St Louis Encephalitis Virus	-	Zika Virus French Polynesia strain 11468/16	-

Analytical reactivity

The Vitassay qPCR Toxoplasmosis kit's reactivity was evaluated against DNA extracted from *Toxoplasma gondii* (Type II), showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Toxoplasmosis has been validated on the following equipment:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^I
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- MIC qPCR Cycler (Bio Molecular Systems)
- LightCycler 480 Instrument II (Roche)
- NEOS-96 Real Time PCR System (Linear)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- QuantGene 9600 (BioEr Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^{II}

^I: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

^{II}: For Rotor-Gene® Q and MIC qPCR Cycler the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific tubes of the equipment.

Limitations

- All obtained results must be interpreted by a specialist in conjunction with available clinical information and laboratory findings.
- This assay has been validated with DNA extracted from blood and CSF samples. The use of other samples has not been established.
- The correct test performance depends on the sample's quality; proper DNA from clinical specimens must be extracted.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This is a qualitative test.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination either by Toxoplasmosis Positive Control during its reconstitution, by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- Detection may be affected by several factors and their combinations which may lead to false negative results, including a) inadequate specimen sampling, shipping, storage, handling; b) procedural errors (including DNA extraction); c) DNA degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) pathogen load below the limit of detection for the assay; e) the presence of Real-Time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study

evaluating the effect of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent the infection or used during the treatment of the infection was not performed); f) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures; g) mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of *Toxoplasma gondii*.

- DNA detection may not indicate the presence of viable and/or infectious protozoa or that *Toxoplasma gondii* is the causative agent for clinical symptoms.
- The negative results do not preclude *Toxoplasma gondii* infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Optimum specimen types for *Toxoplasma gondii* identification and/or stage of infection most suitable for its collection have not been established yet. Consider the collection of multiple specimens from the same patient at different time points, which may increase the probability of detecting the protozoan.
- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible *Toxoplasma gondii* infection, and other parasitic diseases have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment, extraction system, sample type, and its previous treatment, among others.

Attached I. Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Azure Biosystems	Agilent Technologies
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96	qTOWER
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	BIOER
Roche	QuantGene 9600
LightCycler @480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	Bio-Rad
LightCycler @96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	iCycler iQ™ Real-Time PCR
	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
	My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Special Formats ⁽⁷⁾	DNA-Technology
Bio Molecular Systems	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Mic Real Time PCR Cyclers	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers ⁽⁸⁾
Cepheid	Eppendorf
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Precision System Science Co., Ltd.	Qiagen
geneLEAD VIII System	QIAquant 96
Qiagen	
Rotor-Gene® Q	

- (1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.
- (2) Select Ramp Speed "Standard".
- (3) No ROX caption.
- (4) No Cy5 caption.
- (5) Only FAM and HEX caption.
- (6) Specific compensation color is required.
- (7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q or geneLEAD VIII System.
- (8) See Attached III to configure exposure settings.

Attached II. Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR thermocyclers are specified in the following table:

Thermocycler	Vitassay Channel	Detection Channel	Observations
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III. Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

*If result in FAM channel is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.










Bibliography/Bibliografía

1. Kochanowsky JA, Koshy AA. (2018). *Toxoplasma gondii*. *Curr Biol*. Jul 23;28(14):R770-R771.
2. Zhao XY, Ewald SE. (2020). The molecular biology and immune control of chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J Clin Invest*. Jul 1;130(7):3370-3380.
3. Belaz S, Gangneux JP, Dupretz P, Guiguen C, Robert-Gangneux F. (2015). A 10-year retrospective comparison of two target sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* detection by quantitative PCR. *J Clin Microbiol*. Apr;53(4):1294-300.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Parasites Toxoplasmosis (*Toxoplasma* infection). Available at: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/> Accessed May 2022

Trademarks

All trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
			Número de referencia Catalogue number



VA Vitassay

Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

www.vitassay.com