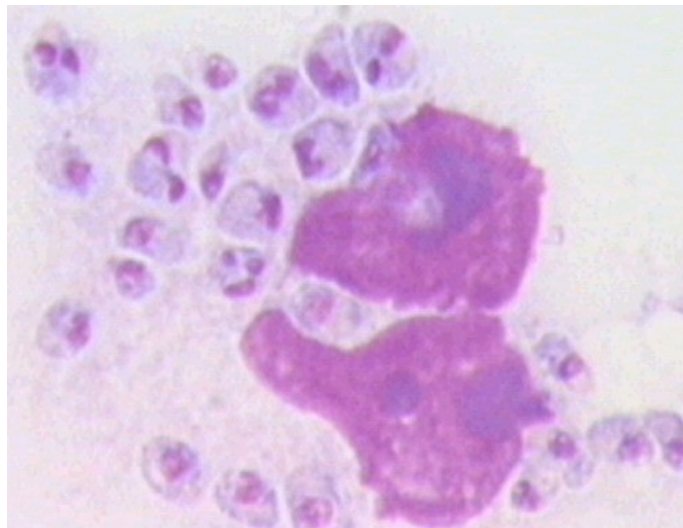


	Código:	IDX-016	Ver:	1
--	----------------	---------	-------------	---



TOXO

Sistema para la detección de la presencia de ADN
de *Toxoplasma gondii*



Reg. MSP 21205

Valdense 3616. 11700. Montevideo. Uruguay.

Teléfono (598) 2 336 83 01.
Fax (598) 2 336 71 60.
info@atgen.com.uy
www.atgen.com.uy

	Código:	IDX-016	Ver:	1
--	----------------	---------	-------------	---

Uso exclusivo en investigación.

Los resultados del test sólo pueden ser utilizados para análisis preliminar.

La compra de este producto no incluye ni proporciona una licencia para llevar a cabo aplicaciones patentadas.

Utilidad del Kit

El kit TOXO de ATGen permite determinar la presencia de ADN de *T.gondii* con una sensibilidad analítica de 40 fg de ADN por reacción de PCR a partir de muestras de sangre o líquido amniótico.

Principio de Ensayo

La técnica se basa en la extracción del ADN de las muestras y la posterior amplificación por PCR de una secuencia de 524 pb específica del ADN de *T.gondii* que se visualiza en geles de acrilamida.

El kit incluye un control de amplificación que controla la aparición de resultados falsos negativos.

Todo el procedimiento puede ser completado en 8 horas.

Toxoplasma gondii

Las técnicas de rutina para el diagnóstico de la toxoplasmosis se basan en la detección indirecta de la respuesta inmune del paciente frente al parásito *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*). Sin embargo, hay algunas situaciones clínicas en las que es aconsejable la detección directa de la presencia de *T.gondii*, para la confirmación del diagnóstico y la adopción de una conducta terapéutica.

Este es el caso de la confirmación de una infección aguda durante el embarazo, de la toxoplasmosis congénita en neonatos y niños o la reactivación de una infección crónica en pacientes inmunodeprimidos.

La PCR es, en estas situaciones, una herramienta diagnóstica importante ya que permite la detección directa del ADN del parásito, de una forma fácil, rápida y específica.

El kit de ATGen para la detección de la presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* en líquidos biológicos se basa en la amplificación por PCR de un fragmento específico del ADN del parásito de 524 pb que se encuentra presente en alto número de copias en el genoma parasitario.

Nuestros resultados sobre sensibilidad del sistema muestran que es posible detectar hasta 1 taquizoito/ 500 µl de sangre y líquido amniótico.

Nuestro sistema de diagnóstico incluye además un control de amplificación, que es un control de la formación de replicones con los iniciadores utilizados en el diagnóstico. Este control se basa en la amplificación simultánea del ADN de la muestra problema junto con una secuencia sintética de mayor peso molecular que la banda de amplificación específica de *T.gondii*.

Validez de la prueba

El test permite determinar la presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* con una sensibilidad analítica de 1 taquizoito en 500 ul de sangre o líquido amniótico, si se siguen las instrucciones descritas en este protocolo.

Las cargas de *T.gondii* en sangre o líquido amniótico son bajas, por lo que es conveniente procesar la mayor cantidad disponible de muestra (ver requerimientos) para evitar la aparición de falsos negativos.

	Código:	IDX-016	Ver:	1
--	----------------	---------	-------------	---

Precauciones

1. Uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*.
2. Todas las muestras, reactivos y controles pueden tener potencialmente riesgo biológico.
3. No utilizar después de la fecha de caducidad.



Condiciones de almacenamiento

El Kit se conserva a -20°C , para asegurar un óptimo funcionamiento hasta la fecha de vencimiento impresa en el envase.

Requerimientos de la muestra

Sangre

2 - 5 ml

Líquido amniótico

2 - 10 ml

Presentación del kit

Tipo: Diagnóstico de uso *in vitro*

El kit de ATGen **TOXO** para la detección de la presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* incluye:

- **1 tubo conteniendo la mezcla de reacción denominada Mezcla de reacción TOXO.** Contiene la mezcla de reacción para la amplificación de un fragmento de 524 pb presente en el ADN de *T. gondii*.
- **1 tubo conteniendo ADN control de Toxoplasma gondii** para ser amplificado con la mezcla de reacción TOXO denominado **ADN control Toxo.**
- **1 tubo conteniendo la mezcla de reacción denominada Mezcla de reacción Control.** Contiene la mezcla de reacción con los mismos cebadores que la mezcla de reacción TOXO y el vector conteniendo el control interno de amplificación de 663 pb.
- **1 tubo conteniendo la enzima Taq ADN polimerasa** denominado **Taq polimerasa.**

Todos los reactivos incluidos en el kit TOXO se conservan a -20°C .

Los kits se comercializan en formato de 20 y 50 reacciones.

El kit es estable a -20°C durante 6 meses.

No contiene productos tóxicos

Materiales necesarios no suministrados

- Acrilamida, buffer de electroforesis y buffer de carga.
- Contenedor para descarte con bioseguridad.
- Fuente y cubeta de electroforesis vertical.
- Guantes y túnica.
- Pipetas adecuadas.
- Puntas de pipeta (tips) con filtro.

	Código:	IDX-016	Ver:	1
--	----------------	---------	-------------	---

- Sistema de tinción de geles con nitrato de plata.
- Termociclador.
- Tubos de PCR libres de ADN.
- Vortex.
- Sistema de extracción de ADN a partir de muestras de sangre y líquido amniótico.
- Sistema de electroforesis para geles de acrilamida para visualizar la amplificación.

Preparación del ADN

- Se extrae el ADN de todo el volumen disponible de ambas muestras (sangre o líquido amniótico) por medio de procedimientos que presenten alto rendimiento y pureza. Se recomienda la utilización del kit **ADN fácil** de ATGen o la técnica de extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico¹.
- Los ADNs obtenidos se resuspenden en 10 µl de agua para PCR o TE (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA, pH=8) 10 minutos a 65°C o 24 horas a 4°C.

Nota: las cargas de *T.gondii* en sangre o líquido amniótico son bajas, por lo que es conveniente procesar la mayor cantidad disponible de muestra (de acuerdo a los requerimientos especificados).

Instrucciones de uso Previos

Descongelar la mezcla de reacción **TOXO** y la mezcla de reacción **Control**, agitar vigorosamente en vortex.
Realizar las manipulaciones en frío.

Mezcla de reacción **TOXO**.

- Preparar en un tubo de PCR una mezcla con un volumen igual a 17 µl del mix **TOXO** multiplicado por el número de muestras a analizar + 2 (controles positivo y negativo).
Reacciones con mix **TOXO** = n° muestras + 2.
- Adicionar a la mezcla 1 µL de **Taq ADN polimerasa** por cada una de las reacciones a realizar con la mezcla de reacción **TOXO**.
- Alicuotar las mezclas realizadas en tubos de PCR utilizando 18 µL por tubo. Rotular apropiadamente.

Mezcla de reacción **Control**.

- Preparar en otro tubo de PCR una mezcla con un volumen igual a 17 µL del mix **Control** por cada una de las muestras a analizar.
Reacciones con mix **Control** = n° muestras.
- Adicionar a la mezcla 1 µL de **Taq ADN polimerasa** por cada una de las reacciones a realizar con la mezcla de reacción **Control**.

¹. Maniatis T., Fritsch E. & Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Ed. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

	Código:	IDX-016	Ver:	1
--	----------------	---------	-------------	---

- Alicuotar las mezclas realizadas en tubos de PCR utilizando 18 μ L por tubo. Rotular apropiadamente.

Protocolo de amplificación:

- Adicionar 2 μ L de la solución de ADN preparado a partir de cada muestra a tubos de PCR conteniendo cada una de las mezclas de reacción preparadas previamente (**Toxo y Control**).
- Agregar a un tubo de PCR preparado con la mezcla TOXO, 2 μ L de ADN control Toxo, para testar la amplificación del ADN de *T. gondii* (**control positivo de amplificación**).
- Agregar a un tubo de PCR preparado con la mezcla TOXO, 2 μ L de agua (**control negativo de amplificación**).
- Programar el termociclador para 40 ciclos de 94°C/0:30, 60°C/0:30, 72°C/0:30; una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C.
- Colocar los tubos en el termociclador cuando alcance los 94°C.

Obtención de los resultados:

- Cargar entre 10 y 20 μ L de cada producto de amplificación en gel de acrilamida al 6%.
- Migrar hasta que el colorante azul de xilene cianol haya salido del gel.
- Teñir con nitrato de plata.

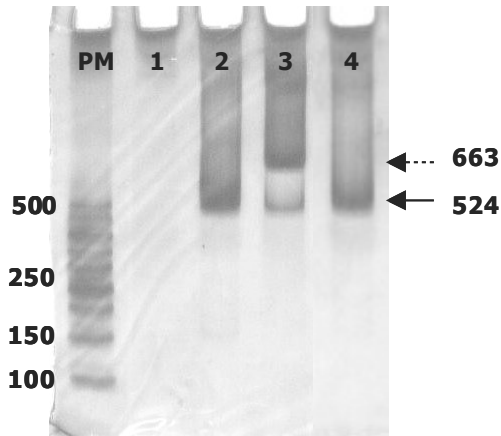
Opcionalmente, la amplificación se puede testar por electroforesis en gel agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, cargando 20 μ L de cada producto. Sin embargo, la sensibilidad es menor en el caso de la detección en agarosa teñida con bromuro de etidio que en el caso de gel de acrilamida teñido con nitrato de plata.

Interpretación de los resultados:

	<i>T.gondii</i>	Control interno (CI)
Producto amplificado	524 pb	663 pb

	Código:	IDX-016	Ver:	1
--	----------------	---------	-------------	---

Ejemplo para la interpretación de los resultados:



Gel de acrilamida al 6% revelado con nitrato de plata mostrando un resultado positivo obtenido a partir de una muestra de líquido amniótico con el kit TOXO de ATGen.

Resultado:

Carril 1: Control negativo de amplificación. Se debe verificar ausencia de amplificación.

Carril 2: Muestra problema amplificada con mezcla TOXO. En este caso se observa amplificación por lo que el resultado se informa como: Presencia de ADN de *T.gondii*.

Carril 3: Muestra problema amplificada con mezcla Control: En este caso se observa amplificación de ambas bandas: *T.gondii* (524 pb) y Control interno (663 pb).

Nota: El control interno cumple con la función de controlar la reacción de PCR:

- Si no se observa amplificación con la mezcla TOXO y el CI amplifica correctamente, el resultado se informa como: Ausencia de ADN de *T.gondii**.
- Si no se observa amplificación con la mezcla TOXO ni con la mezcla Control, ha ocurrido alguna falla (presencia de inhibidores en la muestra o problemas en la amplificación) por lo que el resultado es: Indefinido.
- En el caso que se muestra como se observó amplificación en el carril 2, el resultado del carril 3 no aporta información adicional. Puede suceder que si el ADN de *T.gondii* es muy abundante con la mezcla Control se visualice sólo la banda de 524 pb, lo que no interfiere con el resultado.

Carril 4: Control positivo de amplificación. Se debe observar la banda de 524 pb específica de *T.gondii*. Este es un control externo por lo que no sirve para validar el resultado de la muestra problema.

- Cuando se informa ausencia de ADN de *T.gondii* se debe especificar el límite de sensibilidad del método (1 taquizoito en 500 ul de sangre o líquido amniótico).