

IDENTIFICAZIONE DI DNA DI *Toxoplasma gondii* IN MATRICI ALIMENTARI (CARNI O LAVORATI) MEDIANTE LAMP

INDICE

1	SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2	PRINCIPIO DEL METODO	2
3	BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI	3
4	DEFINIZIONI	4
5	APPARECCHIATURA DI PROVA	4
6	REATTIVI E MATERIALI	5
7	PROCEDIMENTO	6
	7.1 <i>Preparazione del campione di prova</i>	6
	7.2 <i>Esecuzione della prova</i>	6
8	ESPRESSIONE DEI RISULTATI	9
9	CARATTERISTICHE DEL METODO	10
10	MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE	10

1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente documento definisce un metodo di prova interno per determinare mediante LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), la presenza di DNA di *Toxoplasma gondii* in matrici alimentari. Il metodo può essere applicato a carni o lavorati (ad esempio salsicce, polpette, etc.) freschi (non stagionati o cotti).

2 PRINCIPIO DEL METODO

La LAMP è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici specifici dei quali si conosca la sequenza nucleotidica. Se una specie possiede una porzione di DNA caratteristica per sequenza nucleotidica, è possibile disegnare da 4 a 6 differenti oligonucleotidi (primers) progettati per riconoscere 6 o 8 brevi porzioni. Due dei primers sono infatti progettati per riconoscere ciascuno due sequenze complementari differenti. La combinazione dei suddetti primers permette quindi l'amplificazione esclusiva del DNA della specie di interesse. La reazione procede grazie ad una particolare DNA polimerasi che, abbinando la normale attività di sintesi del DNA con quella di dislocazione della catena dell'acido nucleico, permette l'amplificazione della sequenza di interesse a temperatura costante (62-65°C) sotto forma di ripetizione concatenate (di numero crescente) della sequenza bersaglio. La LAMP è caratterizzata da una maggiore sensibilità e specificità rispetto alla PCR convenzionale, permettendo di identificare anche piccole tracce di DNA esogeno all'interno di una matrice.

Toxoplasma gondii è un protozoo che infetta tutti gli animali a sangue caldo (mammiferi o uccelli), compreso l'uomo. Nei felini, ospiti definitivi, si compie la fase sessuata del ciclo del parassita che viene rilasciato nelle feci sotto forma di oocisti. A seguito dell'ingestione delle oocisti da parte di mammiferi o uccelli, ospiti intermedi, il parassita raggiunge vari tessuti dell'ospite (in special modo muscoli e cervello), nei quali la forma asessuata del protozoo (tachizoita) va incontro a numerose replicazioni e alla formazione di cisti tissutali contenenti da decine a migliaia di parassiti (bradizoiti). Quando i felini ingeriscono carni infette (oppure oocisti) il ciclo ricomincia. L'infezione nell'uomo, toxoplasmosi, può essere acquisita sia mediante ingestione delle oocisti che contaminano gli alimenti (frutta, verdura, acqua), sia per consumo di carne cruda o poco cotta proveniente da animali con cisti tissutali. La toxoplasmosi nei soggetti normoergici è generalmente asintomatica; nei soggetti immunodepressi invece, può causare encefaliti, polmoniti, miocarditi, epatiti e corioretiniti. Se l'infezione viene acquisita in gravidanza, il parassita può essere trasmessa al feto causando gravi patologie fetali, fino all'aborto o danni permanenti che si possono sviluppare nell'età adulta.

Utilizzando la tecnica LAMP è possibile evidenziare in modo univoco la presenza di DNA di *Toxoplasma gondii* in tessuti animali mediante l'amplificazione di una sequenza di 529 paia di basi (bp) altamente specifica e ripetuta fino a 300 volte nel genoma del parassita. Una miscela di 6 oligonucleotidi (Tabella A) permette l'amplificazione specifica della sequenza di 529 bp. L'avvenuta amplificazione può essere evidenziata sia mediante aggiunta di un composto che risulta fluorescente ai raggi UV solo se legato al DNA, oppure mediante visualizzazione in elettroforesi su gel d'agarosio di un profilo a scaletta (ladder) di frammenti di amplificazione.

Tabella A - Sequenza degli oligonucleotidi che compongono il LAMP Primers Mix (6.13) e relativi codici.

Sequenza oligonucleotidi	Codice
5'-TGGTTGGAAGCGACGAGAGTTCCAGGAAAAGCAGCCAAG -3'	BIP
5'-TCCTCACCTCGCCTTCATCTAGGACTACAGACGCGATGC -3'	FIP
5'-CCACAGAAGGGACAGAAGTC -3'	F3
5'-TCCGGTGTCTCTTTTTCCAC -3'	B3
5'-TCCAAGACGGCTGGAGGAG -3'	LF
5'-CGGAGAGGGAGAAGATGTTTCC -3'	LB

3 BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI

Jones JL, Dubey JP. Foodborne toxoplasmosis. Clin Infect Dis. 2012 Sep;55(6):845-51.

Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int J Parasitol. 2000 Jan;30(1):69-75.

El-Nawawi FA, Tawfik MA, Shaapan RM. Methods for inactivation of *Toxoplasma gondii* cysts in meat and tissues of experimentally infected sheep. Foodborne Pathog Dis. 2008 Oct;5(5):687-90.

Zhang H, Thekiso OM, Aboge GO, Kyan H, Yamagishi J, Inoue N, Nishikawa Y, Zakimi S, Xuan X. *Toxoplasma gondii*: sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. Exp Parasitol. 2009 May;122(1):47-50.

Kong QM, Lu SH, Tong QB, Lou D, Chen R, Zheng B, Kumagai T, Wen LY, Ohta N, Zhou XN.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): early detection of *Toxoplasma gondii* infection in mice. Parasit Vectors. 2012 Jan 3;5:2.

Cuttell L, Corley SW, Gray CP, Vanderlinde PB, Jackson LA, Traub RJ. Real-time PCR as a surveillance tool for the detection of *Trichinella* infection in muscle samples from wildlife. Vet Parasitol. 2012 Sep 10;188(3-4):285-93.

Berger-Schoch AE, Herrmann DC, Schares G, Müller N, Bernet D, Gottstein B, Frey CF. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in feline faeces (oocysts) and meat from sheep, cattle and pigs in Switzerland. Vet Parasitol. 2011 May 11;177(3-4):290-7.

UNI EN ISO 22174: 2005. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca di microrganismi patogeni negli alimenti – requisiti generali e definizioni.

ISO/FDI 20837:2006(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Requirements for sample preparation for qualitative detection.

ISO/FDI 20838:2006(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Requirements for amplification and detection for qualitative methods.

DNeasy Blood and Tissue kit, Qiagen, Handbook 07/2006. Instruction for use of products 69504 and 69506.

4 DEFINIZIONI

529 bp, sequenza non codificante di 529 nucleotidi presente fino a 200-300 copie solo nel genoma di *Toxoplasma gondii*.

Oligonucleotide, breve sequenza (15/30 basi nucleotidiche) utilizzata per amplificare un frammento specifico di DNA

LAMP Mix, miscela di 6 oligonucleotidi che amplificano in modo specifico la sequenza 529 bp.

DNA di riferimento, DNA genomico purificato da tachizoiti di *Toxoplasma gondii*.

Controllo positivo di estrazione, polpette di carne suina (5g±1g) contenenti tachizoiti di *Toxoplasma gondii* (10.000 tachizoiti/5g carne), trattate nella stessa sessione di lavoro dei campioni in esame per verificare la corretta conduzione del protocollo di estrazione del DNA

DNA campione, preparazione di DNA estratto da singolo campione.

Controllo positivo di amplificazione, DNA genomico purificato da tachizoiti di *Toxoplasma gondii*. E' utilizzato nelle sessioni di amplificazione del DNA campione per verificare il corretto funzionamento della reazione LAMP.

Controllo negativo di amplificazione, acqua grado reagente. E' utilizzato nelle sessioni di amplificazione del DNA campione per verificare il corretto funzionamento della reazione LAMP.

Inoltre, nel presente documento sono utilizzate le definizioni e la terminologia della norma UNI EN ISO 22174.

5 APPARECCHIATURA DI PROVA

5.1 Agitatore Vortex

5.2 Termostato a temperatura variabile da 45 a 100°C con sistema rotante

5.3 Centrifuga refrigerata da banco per provette da 1,5 mL, 10.000 x g

5.4 Congelatore, temperatura ≤ -15°C

5.5 Termoblocco vibrante a temperatura variabile da 25 a 100°C

5.6 Magnete con alloggiamento multiplo per provette da 1,5 mL

5.7 Termociclatore per PCR

5.8 Frigorifero, 1 - 8°C

5.9 Sistema per elettroforesi orizzontale completo di accessori e alimentatore di corrente

5.10 Bilancia tecnica, risoluzione 0,1 g

5.11 Transilluminatore UV

5.12 Sistema per acquisizione di immagini

5.13 Micropipette (1-10 µL, 2-20 µL, 20-100 µL, 50-200 µL e 200-1000 µL)

5.14 Sistema di produzione di acqua di grado analitico (18M Ω/cm)

5.15 Agitatore orbitale

5.16 Etanolo 95-100%.

6 REATTIVI E MATERIALI

- 6.1 Proteinasi K.** Reagente reperibile in commercio (tipo DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, 20 mg/ml). Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.2 Tampone di incubazione.** Soluzione contenente 40 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA e 1% SDS. Il tampone di incubazione viene preparato al momento dell'uso, nelle quantità appropriate all'esecuzione della prova, a partire da soluzioni reperibili in commercio di: 1M Tris pH 8.0, 500 mM EDTA e 10% SDS. Le soluzioni sono conservate secondo le specifiche del produttore.
- 6.3 Tampone di lisi.** Soluzione reperibile in commercio (tipo Tampone AL, DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen). Conservare a temperatura ambiente.
- 6.4 Tamponi di lavaggio.** Soluzioni reperibili in commercio (tipo DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen). Preparare secondo le specifiche del produttore, identificare tale soluzione con la sigla 'AW1' e 'AW2'. Conservare a temperatura ambiente.
- 6.5 Colonna di recupero.** Materiale reperibile in commercio (tipo DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen), ed identificata dal produttore come "DNeasy Mini spin columns".
- 6.6 Provetta di raccolta.** Tubi da 2 mL reperibili in commercio (tipo DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, ed identificata dal produttore come Collection tube).
- 6.7 Provette da 0,2 mL, 1,5 mL, 15 mL, 50 mL.** Materiale reperibile in commercio adatto per biologia molecolare.
- 6.8 Tampone di eluizione.** Soluzione reperibile in commercio (tipo, DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, e identificata dal produttore come Buffer AE). Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.9 LAMP tampone di reazione 2X.** Soluzione composta dalla miscelazione di singoli componenti reperibili in commercio: 10X ThermoPol DF (detergent-free) e 100 mM MgSO₄; 5M Betaine; 100% Tween 20 (per 1 ml di tampone di reazione 2X i componenti sono miscelati come segue: 320 µl di betaina 5M, 200 µl di 10X ThermoPol DF; 120 µl di MgSO₄ 100mM, 2 µl di Tween 20 100% e 358 µl di acqua di grado analitico). Aliquotare la miscela e conservare in congelatore a -20 °C (5.4) per un massimo di 24 mesi.
- 6.10 Deossinucleotidi trifosfato (dNTP) mix.** Preparazione commerciale di deossinucleotidi trifosfato (100 mM) ciascuno alla concentrazione di 25 µmol, per reazioni di amplificazione. Conservare il prodotto in congelatore (5.4) a -20 °C.
- 6.11 Bst DNA polymerase (Large Fragment).** La Bst DNA polymerase è un enzima reperibile in commercio adatto alla conduzione di esperimenti di amplificazione LAMP. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.12 Oligonucleotidi.** Preparazione commerciale. Il prodotto liofilizzato viene ricostituito secondo le indicazioni del produttore ad una concentrazione di 100 pmol/µL con acqua di grado analitico (5.14). L'avvenuta ricostituzione viene riportata con data e firma nel rapporto tecnico allegato agli oligonucleotidi dalla ditta produttrice. Conservare il prodotto liofilizzato in congelatore (5.4) fino a un massimo di 5 anni. Conservare il prodotto ricostituito in congelatore (5.4) fino ad un massimo di 24 mesi.
- 6.13 LAMP Primers Mix.** Miscela di oligonucleotidi utilizzata per la LAMP. La miscela è ottenuta combinando un idoneo volume degli oligonucleotidi riportati in Tabella A in acqua di grado analitico (5.14) affinché la concentrazione finale corrisponda a: 40 pmol/µL per BIP e FIP, 5 pmol/µL per F3 e B3, 20 pmol/µL di LF e LB. Aliquote di 100µL vengono preparate e conservate in congelatore (5.4) fino a un massimo di 24 mesi.
- 6.14 Loading buffer 6x,** prodotto commerciale che permette di eseguire l'elettroforesi di molecole di DNA. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.15 Agarosio** prodotto commerciale definito adatto alla conduzione di elettroforesi per molecole di DNA. Conservare a temperatura ambiente.

- 6.16 TAE soluzione 50x**, prodotto commerciale (2M Tris-acetato, 50mM EDTA, pH 8.2–8.4 a 25°C). Conservare a temperatura ambiente.
- 6.17 TAE soluzione 1x**, preparazione di 1000 mL: prelevare 20 mL dalla soluzione 50x e portare il volume a 1.000 mL con acqua distillata. Preparare al momento dell'uso.
- 6.18 Bromuro di etidio soluzione**, prodotto commerciale 10 mg/L. Soluzione di lavoro: diluire 1:100.000 (per 100 mL di soluzione aggiungere 1 µL). Conservare a temperatura ambiente in bottiglia.
- NOTA: Il bromuro di etidio è potenzialmente mutageno, carcinogeno e teratogenico, trattare con cautela tutte le soluzioni che contengono questa sostanza indossando guanti monouso.
- 6.19 L1000**, prodotto commerciale contenente molecole marcatrici di peso molecolare per DNA. Viene ritenuto idoneo ogni prodotto commerciale che contenga molecole multiple di 250-1.000 bp nel range 250-10.000 bp. Conservare in frigorifero (5.8) secondo le specifiche del produttore.
- 6.20 Acqua grado reagente o Milli-Q**, resistività $\geq 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$.
- 6.21 SYBR Green I**, prodotto commerciale. Soluzione di lavoro: diluire 1:100. Conservare aliquotato in congelatore (5.4) fino a un massimo di 24 mesi.
- 6.22 Campione di riferimento**, polpette di carne suina (5g) contenenti tachizoiti di *Toxoplasma gondii* (1000 tachizoiti/5g carne). Conservare in congelatore (5.4) fino ad un massimo di **2 anni**
- 6.23 DNA di riferimento**, DNA genomico purificato da tachizoiti di *Toxoplasma gondii* (10ng/µL). Conservare in congelatore (5.4) fino ad un massimo di **5 anni**.
- 6.24 Biglie di vetro**, prodotto reperibile in commercio del diametro di 0.5-1 mm.

7 PROCEDIMENTO

7.1 Preparazione del campione di prova

Il campione pervenuto (5g±1g in provette da 50 mL), viene controllato per la verifica dell'integrità del contenitore, assicurandosi che non vi sia traccia di perdita del contenuto.

Qualora l'operatore reputi che il campione di prova non sia idoneo all'esecuzione del test, questo non viene eseguito.

I campioni vengono quindi posti in congelatore (5.4) per almeno 4 giorni prima di procedere all'esecuzione della prova. In tali condizioni il campione può essere conservato per 5 anni prima dell'estrazione.

7.2 Esecuzione della prova

7.2.1 Estrazione del DNA da campione da sottoporre al test

Se non diversamente specificato, la procedura viene eseguita a temperatura ambiente.

Ogni sessione di prova prevede che un campione di riferimento (6.22) venga sottoposto alla procedura di estrazione ed identificato come "controllo positivo di estrazione".

Prima di cominciare la procedura, preparare un volume sufficiente di Tampone di incubazione (6.2).

- Scongela a temperatura ambiente le provette contenenti il campione di riferimento (6.22) ed il/i campione/i di prova.
- Aggiungere 2,5 g ($\pm 0,3$ g) di biglie di vetro (6.24).
- Aggiungere 10 mL di tampone di incubazione (6.2).

- d) Omogenizzare il campione mediante agitazione su vortex (5.1) al massimo dei giri per 90 sec.
- e) Aggiungere 200 µL di Proteinasi K (6.1)
- f) Incubare a 55°C (±3°C) per 16-18 h in termostato con sistema rotante (5.2)
- g) Trasferire 200 µL di omogenato in provetta pulita da 1,5 mL (6.7). L'omogenato restante è trasferito in provetta da 15 mL (6.7) e conservato in congelatore (5.4) per un massimo di 6 mesi.
- h) Aggiungere 200 µL di tampone di lisi (6.3) e agitare brevemente su vortex (5.1)
- i) Incubare per 10 minuti a 70 °C in termoblocco (5.5). Durante l'incubazione lasciare in agitazione a circa 1400 oscillazioni al minuto.
- j) Centrifugare (5.3) le provette a 13.000 rpm per 1 minuto.
- k) Trasferire la fase liquida in una nuova provetta da 1.5 mL (6.7).
- l) Aggiungere 200 µL di etanolo 95-100% (5.16) e agitare brevemente su vortex.
- m) Per ogni campione, posizionare una colonna di recupero (6.5) in una provetta di raccolta (6.6).
- n) Trasferire la fase liquida (punto l) nella colonna di recupero (6.5) e centrifugare (5.3) a 8.000 rpm per 1 minuto
- o) Eliminare la provetta di raccolta (6.6) e posizionare la colonna di recupero (6.5) in una nuova provetta di raccolta (6.6).
- p) Aggiungere 500 µL di tampone di lavaggio AW1 (6.4) alla colonna di recupero e centrifugare (5.3) a 8.000 rpm per 1 minuto
- q) Eliminare la provetta di raccolta (6.6) e posizionare la colonna di recupero (6.5) in una nuova provetta di raccolta (6.6).
- r) Aggiungere 500 µL di tampone di lavaggio AW2 (6.4) alla colonna di recupero e centrifugare (5.3) per 3 minuti a 13.000 rpm.
- s) Trasferire la colonna di recupero (6.5) all'interno di una provetta da 1.5 mL (6.7).
- t) Aggiungere 30 µL di tampone di eluizione (6.8) alla colonna di recupero (6.5) ed incubare per 1-2 minuti a temperatura ambiente.
- u) Centrifugare (5.3) a 8000 rpm per 1 minuto, eliminare la colonna di recupero (6.5), conservare le provette da 1,5 mL (6.7) contenenti gli estratti di DNA.
- v) Gli estratti così preparati vengono definiti 'DNA/campione' e conservati in congelatore (5.4). In tali condizioni possono essere conservati fino a 5 anni.

7.2.2 Amplificazione LAMP

Dove non espressamente indicato mantenere le provette in ghiaccio, utilizzare puntali con barriera e indossare guanti monouso.

Ad ogni sessione è previsto l'utilizzo di un controllo positivo, ovvero DNA di riferimento (6.23), e di un controllo negativo, ovvero acqua (6.20), per verificare la corretta conduzione della reazione di amplificazione.

La seguente procedura prevede l'utilizzo di una miscela LAMP a concentrazione 2x, in caso di concentrazione diversa modificare il protocollo secondo le specifiche del produttore.

- a) Scongela: DNA/campione, LAMP tampone di reazione 2X (6.9), Deossinucleotidi trifosfato (dNTP) mix (6.10), LAMP Primers Mix (6.13), Bst DNA polymerase (6.11), controllo positivo di amplificazione (DNA di riferimento 6.23).
- b) Marcare con un numero progressivo una quantità adeguata di provette da 0,2 µL (6.7).
- c) Preparare un volume adeguato di miscela di amplificazione cumulativa. Calcolare i volumi sulla base della miscela di amplificazione del singolo campione (Tabella B) e del numero totale dei campioni da analizzare aumentato di 3 unità (1 per il controllo positivo, 1 per il controllo negativo di amplificazione ed 1 per una reazione addizionale).

Tabella B – miscela di amplificazione del singolo campione: componenti e relativi volumi

LAMP tampone di reazione 2X (6.9)	12.5 µL
LAMP Primers Mix (6.13)	6 µL
Bst DNA polymerase (6.11)	1 µL
Deossinucleotidi trifosfato (dNTP) mix (6.10)	1.4 µL
H ₂ O (6.20)	2.1 µL
Totale	23 µL

- d) Mescolare la miscela di amplificazione mediante vortex (5.1) e se necessario centrifugare (5.3) al massimo dei giri per pochi secondi.
- e) Trasferire 23 µL della miscela di amplificazione cumulativa in ciascuna delle provette da PCR (punto “b”).
- f) Aggiungere in ogni provetta 2 µL di preparazione di DNA/campione da analizzare.
- g) Chiudere le provette, mescolare mediante vortex (5.1) e centrifugare (5.3) al massimo dei giri per pochi secondi.
- h) Avviare il ciclo di amplificazione (Tabella C) del termociclatore (5.7), aspettare che la temperatura raggiunga 63°C e, dopo avere messo in pausa lo strumento, inserire le provette nel blocco termico. Abbassare il coperchio e uscire dalla pausa.

Tabella C – ciclo di amplificazione

Amplificazione	90 min/63°C
Inattivazione	2 min/80°C

- i) Finita la fase di amplificazione centrifugare (5.3) le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- l) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero (5.8).

7.2.3 Visualizzazione ed interpretazione dei risultati

7.2.3.1 *Fluorescenza della soluzione di amplificazione agli UV*

- a) Aggiungere 10 µL di soluzione di lavoro di SYBR Green I (6.21).
- b) Controllare visivamente l'eventuale variazione di colore da arancio a verde e sul transilluminatore UV (5.11) la presenza della fluorescenza.

Il test di amplificazione è ritenuto valido se:

- i) il controllo positivo di amplificazione mostra visivamente variazione di colore da arancio a verde e fluorescenza agli UV;
- ii) il controllo negativo di amplificazione non mostra visivamente variazione di colore (arancio) e nessuna fluorescenza agli UV;

Il risultato viene valutato mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

7.2.3.2 *Elettroforesi su gel d'agarosio*

- a) Aggiungere 5 µL di loading buffer 6x (6.14).
- b) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero (5.8) fino al momento dell'elettroforesi.
- c) Assemblare l'apparato per elettroforesi (5.9) seguendo le raccomandazioni della ditta produttrice. Nella preparazione del gel utilizzare un pettine adeguato al numero di campioni

- in esame.
- d) Pesare (5.10) 1,5 g di agarosio (6.15) e versarlo in 100 mL di TAE 1x (6.17) preparato in un contenitore di vetro.
 - e) Pesare (5.10) la soluzione.
 - f) Risospendere delicatamente la polvere mediante rotazione.
 - g) Portare la sospensione di agarosio ad ebollizione per circa 30 sec. Se all'ispezione visiva la soluzione non appare omogenea continuare la fase di ebollizione per altri 30 sec.
 - h) Reintegrare con acqua il volume perso durante l'ebollizione.
 - i) Lasciare raffreddare la soluzione di agarosio.
 - j) Prima che la soluzione cominci a solidificare aggiungere 1 μ L di soluzione di bromuro di etidio (6.13).
 - k) Agitare delicatamente per disperdere uniformemente il bromuro di etidio e versare l'agarosio nel piatto per il gel preparato in precedenza (punto c).
 - l) Aspettare che il gel solidifichi non meno di 30 minuti.
 - m) Collocare il piatto contenente il gel nel sistema per elettroforesi.
 - n) Coprire il gel con tampone TAE 1x (6.17).
 - o) Caricare in ogni pozzetto 15 μ L del prodotto di amplificazione (punto 7.2.1"l") seguendo il numero progressivo di marcatura delle provette (punto 7.2.2 "b").
 - p) Caricare il primo pozzetto con 10 μ L della soluzione L1000 (6.19).
 - q) Connettere l'apparato per elettroforesi con l'alimentatore e impostare un valore di tensione di 10 v/cm di gel.
 - r) Lasciare il gel sotto tensione per circa 30 minuti o fino a quando il colorante più veloce contenuto nel loading buffer (6.14) non raggiunga 1 cm dal bordo del gel.
 - s) Dopo 30 minuti, controllare sul transilluminatore UV (5.11) la separazione delle bande. La corsa elettroforetica è ritenuta sufficiente se è possibile distinguere facilmente tutte le bande del marcatore di pesi molecolari compresi tra 50 e 2.000 bp. Se la separazione è insufficiente, lasciare il gel sotto tensione fino ad avere una separazione adeguata.
 - t) A corsa conclusa trasferire il gel nel sistema di acquisizione di immagini (5.12) ed effettuare una stampa del risultato.

Il profilo delle bande di amplificazione evidenziate dall'elettroforesi viene valutato per comparazione delle stesse con i pesi molecolari di riferimento L1000 (6.19) e con i controlli positivi di estrazione e amplificazione. La valutazione visiva viene ritenuta sufficiente ed adeguata.

Il test di amplificazione è ritenuto valido se:

- i. il controllo positivo di amplificazione mostra un profilo a scaletta (ladder) di frammenti di amplificazione;
- ii. il controllo negativo di amplificazione non mostra prodotti di amplificazione o eventualmente solo bande riferibili agli oligonucleotidi inutilizzati e/o a loro derivati (primer dimer);
- iii. il controllo positivo di estrazione mostra un profilo a scaletta (ladder) di frammenti di amplificazione.

8 ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Esprimere i risultati nel rapporto di prova secondo le seguenti modalità:

Se il prodotto di amplificazione produce un profilo a scaletta (ladder) di frammenti, allora il campione è identificato come **POSITIVO** per la presenza di DNA di *Toxoplasma gondii*.

Qualora il test risulti valido, il campione analizzato sarà ritenuto **NEGATIVO** sia che non mostri alcuna amplificazione sia che mostri un profilo di amplificazione non confrontabile con i controlli positivi, anche se dopo amplificazione la provetta mostri fluorescenza agli UV.

In caso di risultato NEGATIVO non è possibile escludere comunque la presenza di DNA di *Toxoplasma gondii* nella matrice in quanto la quantità di DNA del parassita potrebbe essere inferiore al limite di sensibilità del metodo.

9 CARATTERISTICHE DEL METODO

Il presente metodo è stato valutato per sensibilità, specificità e ripetibilità. I risultati sono stati utilizzati per confermare che il metodo è adatto allo scopo previsto e sono riportati nel relativo fascicolo di validazione, al quale si rimanda.

10 MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE

Il presente metodo di prova può essere eseguito solo da personale autorizzato.

I dispositivi individuali di protezione sono rappresentati da guanti monouso e camice.

Per il comportamento generale da adottare da parte degli operatori fare riferimento ai manuali emessi dal Servizio di Prevenzione e Sicurezza del Lavoro dell'Istituto a disposizione del personale dei laboratori e anche visionabili sul sito <http://intranet.iss.it/prev/index.php?lang=1&anno=2020&tipo=13> (*Manuale per gli operatori che lavorano nei laboratori a carattere chimico e biologico; Manuale operativo per la gestione dei rifiuti prodotti all'interno dell'ISS*).