

# recomLine Toxoplasma IgG [Avidity] recomLine Toxoplasma IgM recomLine Toxoplasma IgA



Imunoblot s rekombinantními antigeny pro detekci protilátek třídy IgG, IgM a IgA a pro stanovení avidity protilátek třídy IgG proti *Toxoplasma gondii* v lidském séru a plazmě.

## 1. Obecné aspekty, použití testu

RecomLine Toxoplasma je kvalitativní *in-vitro* test pro detekci IgG, IgM a IgA protilátek proti proteinovým antigenům *Toxoplasma gondii*. Vzhledem k použití různých rekombinantních antigenů poskytuje test informace o specifických protilátkách, které jsou typické pro jednotlivá stádia infekce *Toxoplasma gondii*. Ve srovnání s metodou ELISA umožňuje recomLine Toxoplasma díky jednotlivým antigenům bezpečnou identifikaci specifických protilátek *Toxoplasma gondii*.

## 2. Toxoplasma gondii

Toxoplasmosu způsobuje parazit *Toxoplasma gondii*. Primárním hostitelem parazita jsou kočky. Pohlavní množení probíhá pouze v primárním hostiteli a vede k vylučování infekčních oocyst. Při alternativní cestě vývoje se člověk nakazí pozřením nedostatečně tepelně upraveného masa, jelikož *Toxoplasma gondii* přetrvává ve tkáních prasat, koz a dalších savců. Dalším zdrojem infekce je transplacentární přenos *Toxoplasma gondii* z čerstvě infikované matky na plod (kongenitální toxoplasmosa) (1, 6).

Toxoplasmosa je nejčastějším parazitárním onemocněním ve střední Evropě. Tomu odpovídá úroveň seroprevalence, která se zvyšuje s přibývajícím věkem. Seroprevalence vzrůstá přibližně o jedno procento za každý rok života. Poměr incidence kongenitální toxoplasmosy je zhruba 5 až 6 na 1000 živě narozených (1, 6).

Průběh infekce *Toxoplasma gondii* u imunokompetentních jedinců je obvykle asymptomatický, vzácně s nespecifickými chřipkovými příznaky. Primární infekce vede k celoživotní perzistenci parazita a zajišťuje celoživotní imunitu proti dalším toxoplasmovým infekcím (1).

Po infekci prochází patogen fází intercelulární proliferace s rychle se dělicími tachyzoity. Poté se tachyzoiti vlivem zahájení imunitní odpovědi začínají měnit na bradyzoity. Bradyzoiti přetrvávají v nervové tkáni a kosterní svalovině hostitele ve formě cyst po celý život (1, 6).

Kongenitální toxoplasmosa může způsobit závažné poškození plodu. V průběhu trvání gravidity se pravděpodobnost přenosu zvyšuje, avšak závažnost klinických projevů se snižuje. Infekce během prvního trimestru vede obvykle k úmrtí plodu. Další následky zahrnují zejména encefalitidu s projevy od těžkých neurologických poruch, přes subklinicky infikované děti s lehkými poruchami intelektu v dospělosti, až po jedince bez symptomů. Léčba může být zahájena tehdy, je-li potvrzena nákaza v průběhu gravidity. Tím významně klesá závažnost projevů a pozdních komplikací kongenitální toxoplasmosy (1).

Toxoplasmosa může vést rovněž ke komplikacím u imunosuprimovaných jedinců (1, 6).

## 3. Diagnostika

Vzhledem k častému asymptomatickému průběhu toxoplasmové infekce je diagnostický postup obvykle založen na serologických testech.

Sabinův – Feldmanův test zavedený v roce 1948 je díky vysoké senzitivitě stále zlatým standardem v diagnostice toxoplasmosy. Test je ale složitý a nákladný a proto je v současné době využíván pouze jako referenční metoda (5).

Dalšími používanými metodami jsou imunofluorescence, enzymová imunoanalýza, KFR a aglutinační testy (1, 3, 4).

Hlavním cílem těchto diagnostických postupů prováděných většinou preventivně během gravidity je odlišení akutní infekce v graviditě od infekce získané již před početím.

Humorální imunitní odpověď začíná tvorbou protilátek třídy IgM během několika dnů s vrcholem již za 2 – 4 týdny. V mnoha případech je detekovatelný také titr protilátek třídy IgA. Hladina protilátek třídy IgG začíná vzrůstat asi za 2 týdny po infekci s vrcholem asi 6-8 týdnů až 3 měsíce po infekci a poté začíná postupně klesat. První 3 měsíce po infekci se označují jako fáze I (serokonverze). Během tohoto období se doporučuje kontrola titru každé 2 – 3 týdny. V následné fázi II přetrvávají vysoké titry a nedochází k jejich dalšímu vzestupu. Tato fáze trvá od 3 do 6 měsíců po infekci a označuje se jako fáze aktivní infekce. Během fáze II se doporučuje kontrola titru rovněž každé 2 – 3 týdny. Fáze I a fáze II dohromady tvoří fázi akutní infekce. V dalším průběhu (fáze III) začínají hladiny protilátek klesat, nejdříve ve třídě IgA a IgM, poté ve třídě IgG. Specifické protilátky třídy IgM přetrvávají běžně jeden rok, v některých případech však mohou přetrvávat až 3 roky i déle. Tato fáze (asi 6 – 12 – 36 měsíců po infekci) se označuje jako fáze subakutní infekce. I v této fázi jsou doporučovány kontroly titru pro průkaz, zda nedochází k dalšímu vzestupu titru. V následné fázi latentní infekce nejsou detekovatelné protilátky třídy IgA a IgM a přetrvávají střední nebo nízké hladiny protilátek třídy IgG. Je přítomná imunita proti dalším infekcím *Toxoplasma gondii* (12).

Lze shrnout, že detekce protilátek třídy IgM není dostačující pro diagnostiku akutní toxoplasmosy. Ve vzácných případech je akutní infekce provázena velmi nízkou nebo dokonce nedetekovatelnou hladinou protilátek třídy IgM (nízký responder IgM). V případě časného zahájení terapie titry protilátek, zejména ve třídě IgM, rychle mizí.

Diagnostika infekce může být zjednodušena stanovením avidity IgG protilátek. Protilátky třídy IgG v časně fázi mají nízkou aviditu, protilátky po prodělané infekci mají vysokou aviditu. Nízce avidní protilátky mohou být uvolněny z vazby na testovacím stripu pomocí aviditní reagentie, zatímco vysoce avidní protilátky nejsou touto metodou odstraněny. Současné vyšetření vzorku s aviditní reagentií a bez aviditní reagentie odliší, zda mají protilátky třídy IgG nízkou (akutní infekce) nebo vysokou aviditu (stav po prodělané infekci).

Aviditní reagentie pro testování s recomLine Toxoplasma IgG je dodávána firmou ALLDIAG (výr.č. 11010).

Konfirmace protilátek třídy IgM není považována za adekvátní kritérium akutní toxoplasmové infekce; stanovení avidity IgG protilátek v séru je proto velmi důležitým krokem v diagnostice toxoplasmosy (1, 3, 4, 10).

Rekombinantní antigeny použité v testu pocházejí z tachyzoitů typických pro produktivní fázi infekce a z bradyzoitů nebo z obou forem. Protilátková odpověď proti těmto imunodominantním antigenům umožňuje konfirmaci stádia infekce.

**Tab. 1:** Použité rekombinantní antigeny

Antigen	Charakteristika
ROP1 (p66)	Antigen z tachyzoitů a bradyzoitů, charakteristická odpověď ve třídě IgM s přetrváváním IgM protilátek i v subakutní fázi infekce, zřídka protilátky třídy IgA, obvykle pouze v akutní fázi, nízce avidní IgG protilátky často v latentní fázi, nezanechává titer IgG po dříve prodělané infekci.
MAG1 (p65)	Antigen z bradyzoitů, obvykle bez odpovědi IgA a IgM, protilátky třídy IgG (nízce avidní) pravidelně na začátku fáze I, bez přítomnosti nízce avidních IgG protilátek v subakutní a latentní fázi.
SAG1 (p30) *	Antigen z tachyzoitů, příležitostně nespecifická reaktivita s protilátkami třídy IgM, protilátky IgG (nízce avidní) pravidelně až ve fázi II, bez přítomnosti nízce avidních IgG protilátek v latentní fázi, titer IgG protilátek obvykle přetrvává celoživotně.
GRA7 (p29)	Antigen z tachyzoitů a bradyzoitů, zřídka IgM protilátky, výlučně v akutní fázi, IgG protilátky (nízce avidní) přítomny již v časně fázi I, zvyšující se avidita IgG protilátek až do konce fáze I, titer IgG protilátek obvykle přetrvává celoživotně.
GRA8 (p35)	Antigen z tachyzoitů a bradyzoitů, protilátky třídy IgM v akutní fázi obvykle přítomny, v subakutní fázi klesají, IgG protilátky (nízce avidní) přítomny již v časně akutní fázi, nízce avidní protilátky často také v subakutní a latentní fázi, nezanechává titer IgG po dříve prodělané infekci.

\*V literatuře je SAG1 popisován jako antigen, proti němuž se tvoří protilátky během akutní fáze infekce. V tomto testu je použitý rekombinantní SAG1 protein, který neobsahuje všechny epitopy přítomné v nativním SAG1 proteinu. Protilátky třídy IgG proti rekombinantnímu SAG1 jsou obvykle detekovatelné až ve fázi II toxoplasmové infekce. Použití rekombinantního SAG1 v recomLine Toxoplasma umožňuje lepší rozlišení různých stádií infekce *Toxoplasma gondii*.

- **imunodominantní antigeny z tachyzoitů a bradyzoitů,**
- **test detekuje protilátkové odpovědi ve třídě IgG, IgM a IgA; jejich intenzity mohou být hodnoceny samostatně,**
- **je možné samostatné hodnocení avidity IgG protilátek proti jednotlivým antigenům,**  
Ve srovnání s běžnými metodami imunoblotu založenými na separovaném lyzátu antigenů má test recomLine Toxoplasma následující charakteristiky:
  - **jasně definované, rekombinantní, vysoce čištěné antigeny s mnohem vyšší úrovní specifity.**
  - **Interpretace výsledků je mnohem snazší,**
  - **vyšší senzitivita díky optimalizovaným množstvím antigenů,**
  - **kontrolní bandy pro jednotlivé třídy IgG, IgM a IgA,**
  - **vnitřní cutoff kontrola na každém testovaném stripu.**

V testu recomLine Toxoplasma jsou rekombinantní antigeny použity v následujícím pořadí: ROP1 (66kDa), MAG1 (65kDa), SAG1 (30kDa), GRA7 (29kDa), GRA8 (35kDa).

Antigeny použité v tomto testu usnadňují detekci a identifikaci specifických protilátek třídy IgG, IgM nebo IgA proti hlavním proteinům *Toxoplasma gondii*. Tím lze hodnotit reaktivitu proti nejdůležitějším antigenům v jednom provedení testu.

#### 4. Princip testu

Rekombinantní vysoce čištěné proteiny jsou nanášeny na nitrocelulóзовou membránu. Tato matrix je nastříhána na jednotlivé stripy.

Při detekci specifických protilátek proti *Toxoplasma gondii* jsou stripy inkubovány s naředěnými vzorky séra nebo plazmy, čímž se protilátky navážou na antigeny na stripech. Nenavázané protilátky jsou odstraněny promytím a stripy jsou poté inkubovány s anti-lidským IgG, IgM, IgA vázaným s křenovou peroxidázou. Specificky navázané protilátky jsou detekovány pomocí barevné reakce katalyzované peroxidázou. V případě reakce antigenu s protilátkou se objeví tmavý proužek na korespondujícím místě na stripu.

Na horním konci stripu se nachází pět kontrolních proužků:

1. Pod číslem stripu je proužek sloužící jako kontrola reaktivity. Tento proužek musí být v každém séru pozitivní.
2. Tři konjugátové kontrolní proužky: IgG/IgM/IgA. Tyto proužky slouží jako kontrola detekované třídy protilátek. Je-li například strip použitý pro detekci protilátek třídy IgG, objeví se zřetelný konjugátový kontrolní proužek IgG. Totéž platí analogicky pro konjugátové proužky IgM a IgA.
3. Kontrola „cutoff“: pro kontrolu zbarvení a vyhodnocení stripu. Podle intenzity tohoto proužku se hodnotí reaktivita protilátky jako pozitivní, hraniční nebo negativní.

#### 5. Obsah soupravy

Reagencie obsažené v jednom balení jsou dostačující pro 20 testů.

Každá souprava obsahuje:

<b>WASHBUF 10 X</b>	100 ml	Promývací roztok ( <b>10x koncentrovaný</b> ) Obsahuje fosfátový pufr, NaCl, KCl, detergent, konzervační látky: methylothiazolon (0,1%) a oxyprion(0,2%).
<b>SUBS TMB</b>	40 ml	Substrátový roztok tetramethylbenzidin (TMB, <b>k přímému použití</b> )
<b>MILKPOW</b>	5 g	Odstředěné mléko v prášku
<b>INSTRU</b>	1	Návod k použití
<b>EVALFORM</b>	1	Vyhodnocovací formulář

##### 5.1 recomLine Toxoplasma IgG [Avidity]

Kromě položek uvedených v bodě 5 obsahuje každá souprava:

<b>TESTSTR</b>	2 ks	Zkumavky s 10 postupně číslovanými stripy potaženými rekombinantními antigeny <i>Toxoplasma gondii</i>
<b>CONJ IgG</b>	500 $\mu$ l	Anti-lidský IgG konjugát ( <b>zelené víčko, 100 x koncentrovaný</b> ) Králičí, obsahuje NaN <sub>3</sub> (<0,1 %), MIT (<0,1 %), Chloracetamide (<0,1%)

##### Stanovení avidity

Pro stanovení avidity IgG protilátek proti *Toxoplasma gondii* je na vyžádání k dispozici následující reagencie:

<b>AVIDI</b>	1	Aviditní reagencie (pevná) pro přípravu 60 ml roztoku
--------------	---	---

Kat. číslo:11010

##### 5.2 recomLine Toxoplasma IgM

Kromě položek uvedených v bodě 5 obsahuje každá souprava:

<b>TESTSTR</b>	2 ks	Zkumavky s 10 postupně číslovanými stripy potaženými rekombinantními antigeny T.gondii
<b>CONJ IgM</b>	500 $\mu$ l	Anti-lidský IgM konjugát ( <b>fialové víčko, 100 x koncentrovaný</b> ) Králičí, obsahuje NaN <sub>3</sub> (<0,1 %), MIT (<0,1 %), Chloracetamide (<0,1%)

##### 5.3 recomLine Toxoplasma IgA

Kromě položek uvedených v bodě 5 obsahuje každá souprava:

<b>TESTSTR</b>	2 ks	Zkumavky s 10 postupně číslovanými stripy potaženými rekombinantními antigeny T.gondii
----------------	------	--

**CONJ IgA**

500 □

Anti-lidský IgA konjugát (**bezbarvé víčko, 100 x koncentrovaný**)  
Králičí, obsahuje NaN<sub>3</sub> (<0,1 %), MIT (<0,1 %), Chloracetamide (<0,1%)

## 6. Další potřebné reagentie a vybavení, které nejsou součástí soupravy

Deionizovaná voda, vakuový extrakční systém s odpadní nádobou a desinfekcí na infekční roztoky, mikropipety, plastové pinzety, třepačka, graduovaný odměrný válec, váhy.

## 7. Informace o testu a reagentiích

### 7.1. Bezpečnostní opatření:

- ❖ Pracujte v ochranných rukavicích.
- ❖ Konjugát obsahuje azid sodný, MIT (methyisothiazolone) a Chloracetamide. Vyhněte se kontaktu s kůží a sliznicemi.
- ❖ Veškeré reagentie a materiály, které přijdou do styku s potenciálně infekčním vzorkem, musí být řádně dezinfikovány nebo autoklávovány po dobu nejméně 1 hodiny při 121°C.
- ❖ Inkubační vaničku používejte jen jedenkrát.
- ❖ S testovacími proužky zacházejte opatrně pomocí pinzety.

### 7.2. Zacházení se soupravou

Reagentie ukládejte před i po použití při teplotě 2 – 8°C, **nezmrazujte**. Všechny komponenty soupravy nechte před použitím nejméně 30 minut temperovat při laboratorní teplotě (18-25°C). Celá procedura je prováděna při laboratorní teplotě.

Koncentrované konjugáty před použitím dobře promíchejte. Rovněž séra pacientů před použitím promíchejte. Zkumavku s testovacími stripy neotevírejte před začátkem vyšetření; zabráníte tím kondenzaci vody. Stripy, které nebudou použity, musí být ponechány ve zkumavce a uloženy při 2 – 8°C (zkumavku dobře uzavřete, stripy nesmí před použitím navlhnout!)

Dodržujte prosím dobu expirace jednotlivých komponent soupravy.

Lze používat pouze ty reagentie, jejichž číslo šarže souhlasí s číslem šarže na štítku soupravy.

Test musí být prováděn zkušenou a oprávněnou kvalifikovanou osobou.

Je možná automatizace, pro více informací, prosím, kontaktujte ALLDIAG.

### 7.3. Příprava roztoků

#### 7.3.1. Příprava pracovního ředění promývacího pufru A

Pufry jsou používány nejen k promývání, ale i k ředění vzorků séra a konjugátu. Podle počtu testovaných proužků připravte odpovídající objem promývacího pufru A (viz tabulka 2). Nejprve rozpustíte mléčný prášek v koncentrátu promývacího pufru A a pak ke směsi přilijte deionizovanou vodu (ředění 1+9). Testujete-li jiný počet proužků, než je uvedeno v tabulce, je nutné potřebný objem promývacího pufru dopočítat.

Pracovní ředění promývacího pufru A může být při 2-8°C skladováno 4 týdny. Pracovní ředění promývacího pufru A je mírně zakalené a bez zápachu.

**Tab. 2:** Příprava promývacího pufru A

Použitý proužky	Mléčný prášek	Koncentrovaný promývací pufry A	Deionizovaná voda	Pracovní ředění promývacího pufru A
1	0.1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0.2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0.3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0.5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
15	1.5 g	30 ml	270 ml	300 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml

#### 7.3.2. Příprava roztoku konjugátu

Roztok konjugátu musí být připraven těsně před použitím. Pracovní ředění roztoku konjugátu není možné dále skladovat.

1 díl koncentrovaného IgG, IgM, respektive IgA konjugátu se ředí se 100 díly pracovního ředění promývacího pufru A (1+100).

Potřebná množství jednotlivých roztoků udává tabulka 3. Testujete-li jiný počet proužků, než je uvedeno v tabulce, je nutné potřebné objemy daných roztoků dopočítat.

**Tab. 3: Objemy pro ředění anti-lidského IgG, IgM, respektive IgA konjugátu**

Použité proužky *	Koncentrovaný IgG nebo IgM konjugát	Pracovní ředění promývacího pufru A
1	20 µl	2 ml
2	40 µl	4 ml
3	60 µl	6 ml
5	100 µl	10 ml
10	200 µl	20 ml
15	300 µl	30 ml
20	400 µl	40 ml

\* Objemy jsou počítány bez „mrtvého objemu“. Připravujte proto roztok konjugátu pro 1-3 proužky navíc v závislosti na způsobu zpracování testu (ručně nebo na automatu).

#### 7.3.3. Roztok substrátu

Roztok substrátu je připraven k přímému použití. Před použitím jej vytemperujte na laboratorní teplotu (18-25°C).

Je nutné vyvarovat se kontaminaci roztoku substrátu, např. použitím kontaminované špičky, neboť by se tak ovlivnila citlivost testu.

#### 7.4. Skladování a stabilita

Reagencie skladujte při 2-8°C.

Pracovní ředění promývacího pufru A může být při 2-8°C skladováno 4 týdny.

Roztok konjugátu musí být připraven vždy čerstvý.

### 8. Vzorky

Jako vzorek lze použít krevní sérum nebo plazmu, které byly separovány bezprostředně po odběru. Je potřeba se vyvarovat jakékoliv bakteriální kontaminace. Případné pevné částice ve vzorku musí být odstraněny před testováním centrifugací.

Použití chylózních, hemolytických nebo ikterických vzorků může způsobit tmavé pozadí při vyšetření recomLine Toxoplasma IgG/IgM/IgA. Tyto vzorky mohou také vést k chybným výsledkům a neměly by být proto používány.

#### Upozornění!

Nemůžete-li test provést okamžitě, mohou být vzorky skladovány při teplotě 2-8°C až 2 týdny. Dlouhodoběji je lze skladovat při minimální teplotě -20°C. Opakované zmrazování a rozmrazování vzorků není doporučováno, neboť se tím ovlivňuje kvalita výsledků.

### 9. Pracovní postup

#### 9.1. Obecné informace

Reprodukovatelnost výsledků závisí především na preciznosti promývání proužků (postup promytí uveden v bodech 9.3. a 9.5.).

#### 9.2. Inkubace vzorku

1. 1 inkubační žlábek je určen pro 1 testované sérum. Do každého žlábků napipetujte **2 ml** pracovního ředění promývacího pufru A. Plastovou pinzetou opatrně ponořte testovací proužek do příslušného žlábků naplněného promývacím pufrům. Číslo proužku musí směřovat vzhůru.

**Upozornění:** Testovací proužek musí být do promývacího pufru zcela ponořen.

Do vyhodnocovací tabulky zaznamenejte číslo zkumavky s použitými testovacími proužky a číslo každého proužku.

#### 2. Přidání vzorků

**IgG/IgM/IgA test:** Do příslušných žlábků napipetujte **20 µl** neředěného vzorku - lidské sérum nebo plazma (**ředění 1 + 100**).

Dbejte na to, abyste vzorek přidávali u konce proužku ponořeného v promývacím pufru A, a co možná nejdříve opatrně promíchali.

Do vyhodnocovací tabulky zaznamenejte číslo vzorku a třídu imunoglobulinů (IgG, IgM).

Inkubační misku přikryjte víčkem a za jemného třepání při laboratorní teplotě **1 hodinu** inkubujte.

**Upozornění:** Dbejte na to, aby se roztoky nedostaly do jiných žlábků. Víčko otevírejte a zavírejte opatrně, aby jednotlivé roztoky nevystříkly ven ze žlábků (riziko křížové kontaminace).

### 9.3. Promytí

1. Po uplynutí inkubační doby opatrně odstraňte plastové víčko.
2. Zředěné sérum ze žlábků opatrně odsajte.  
*Upozornění! Odsávejte roztoky ze žlábků vždy čistou špičkou nebo špičky vždy řádně promyjte deionizovanou vodou. Používáte-li promývačku, řiďte se pokyny výrobce.*
3. Následně do každého žlábků přidejte **2 ml** pracovního ředění promývacího pufru A a za jemného třepání **5 minut** inkubujte. Poté pufr odsajte.
4. Promytí dle bodu 3 opakujte ještě **tříkrát**.

### 9.4. Inkubace s konjugátem

Po promytí proužků do každého žlábků přidejte **2 ml** připraveného **roztoku konjugátu** (viz tabulka 3). Za jemného třepání při laboratorní teplotě **45 minut** inkubujte. Během inkubace musí být žlábků zakryty plastovým víčkem.

### 9.5. Promytí

Roztok konjugátu ze žlábků odsajte a proužky opět promyjte (viz bod 9.3).

### 9.6. Reakce substrátu

Do každého žlábků přidejte **1.5 ml roztoku substrátu** a za jemného třepání inkubujte při laboratorní teplotě **5-10 minut**.

Zastavte reakci, jakmile se objeví cutoff kontrolní proužek.

### 9.7. Zastavení reakce

1. Po odsátí roztoku substrátu proužky třikrát promyjte deionizovanou vodou.
2. Plastovou pinzetou proužky opatrně vyjměte, umístěte je mezi dvě vrstvy absorbčního papíru a nechte 2 hodiny sušit. Suché proužky vlepte do vyhodnocovací tabulky a odečtené výsledky zapište do protokolu.
3. Proužky by měly být uchovávány na temném místě.

### 9.8. Určení avidity protilátek

Postup testu pro stanovení avidity protilátek je detailně popsán v návodu na použití avidity reagentu.

## 10. Souhrn pracovního postupu

1.	Vytemperujte všechny reagenty na laboratorní teplotu.
2.	Vložte proužky do 2 ml pracovního ředění promývacího pufru A a zkontrolujte, zda jsou v pufru zcela ponořeny.
3.	Přidejte 20 µl vzorku, respektive cut-off kontrol.
4.	Za jemného třepání při laboratorní teplotě 1 hodinu inkubujte.
5.	Na třepačce třikrát po pěti minutách promývejte 2 ml pracovního ředění promývacího pufru A.
6.	Přidejte 2 ml odpovídajícího roztoku konjugátu.
7.	Za jemného třepání při laboratorní teplotě 45 minut inkubujte.
8.	Na třepačce třikrát po pěti minutách promývejte 2 ml pracovního ředění promývacího pufru A.
9.	Přidejte 1.5 ml roztoku substrátu a za jemného třepání při laboratorní teplotě inkubujte 5–10 minut
10.	Proužky promyjte nejméně třikrát deionizovanou vodou.
11.	Proužky nechte mezi 2 vrstvami absorbčního papíru 2 hodiny sušit a poté odečtete výsledky.

## 11. Vyhodnocení

### 11.1 Vyhodnocení intenzity proužků

1. Do přiloženého vyhodnocovacího formuláře zaznamenejte datum, číslo šarže a zkumavky a vyšetřovanou třídu protilátek.
2. Do formuláře zaznamenejte identifikační číslo vzorku.
3. Jednotlivé testované stripky nalepte do odpovídajících polí ve vyhodnocovacím formuláři. Testované stripky umístěte tak, aby proužek pro kontrolu reaktivity ležel na vyznačené čáře. Pomocí průhledné lepicí pásky přichyťte stripky vlevo od vyznačené čáry. Úplné přilepení testovaných stripů lepidlem nebo lepicí páskou může vést ke změnám barevné reakce.
4. Přítomnost proužků na testovaných stripech určete pomocí předtištěného kontrolního stripu na vyhodnocovacím formuláři. Proužky zaznamenejte do formuláře (tab. 4). Proužky na testovaných stripech hodnotte samostatně pro jednotlivé třídy imunoglobulinů.

## 11.2 Kontrola výsledků

Test může být hodnocen, jsou-li splněna následující kritéria:

- Proužek pro kontrolu reaktivity (první proužek) je tmavě zbarvený.
- Třída protilátek (druhý až čtvrtý proužek): příslušný konjugátový kontrolní proužek musí mít jasnou barevnou reakci. Další dva konjugátové kontrolní proužky mohou mít slabé, nespecifické zbarvení.
- Cut-off kontrola (pátý proužek): slabé, ale jasně patrné zbarvení.

**Tab. 4:** Intenzita proužků hodnocená podle cut-off proužku

Proužky	Intenzita
Negativní	-
Intenzita slabší než cut-off proužek	±
Stejná intenzita jako cut-off proužek	+
Silná intenzita (silnější než cut-off proužek)	++
Velmi silná intenzita	+++

### Důležité!

Vzorec proužků v testech *recomLine Toxoplasma IgG, IgM a IgA* může mít různé intenzity. Test *IgG recomLine* může mít vyšší intenzitu a tmavší proužky než *IgM, resp. IgA recomLine*. Intenzita proužků je dána koncentrací specifických protilátek proti *Toxoplasma gondii*.

Hodnocení výsledků avidity: viz. kapitola 11.5 pod tabulkou 8.

## 11.3 Výsledky testu a interpretace

Základem pro spolehlivé a jednoduché vyhodnocení testu je bodové ohodnocení antigenů *Toxoplasma gondii* v soupravě *recomLine Toxoplasma*, které vychází z klinického hodnocení a matematické analýzy. Výsledek testu je dán součtem bodů a následným vyhodnocením.

Výsledek testu se určí součtem bodů pro jednotlivé proužky dle jejich intenzity +, ++ nebo +++ (tabulka 4).

Výsledný počet bodů se zaznamená do sloupce označeného značkou pro sumu. Stanoví se pozitivní, hraniční nebo negativní výsledek vzorku a zaznamená se do vyhodnocovacího formuláře.

**Tab. 5:** Bodové ohodnocení antigenů *T.gondii* v soupravě *recomLine Toxoplasma*

Antigen	Body pro IgG třídu	Body pro IgM třídu	Body pro IgM třídu
ROP1	1	6	4
MAG1	2	1	2
SAG1	4	0	4
GRA7	4	2	4
GRA8	4	4	4

**Tab. 6:** Vyhodnocení testu *recomLine Toxoplasma*

Součet bodů	Vyhodnocení
≤ 3	Negativní
4 – 5	Hraniční
≥ 6	Pozitivní

## 11.4 Pokyny pro interpretaci výsledků

Imunitní odpověď na infekci *Toxoplasma gondii* je velmi variabilní. Skutečnost, že odpovídající IgM protilátky jsou v mnoha případech stále detekovatelné roky po infekci, značně ztěžuje interpretaci serologických nálezů. Při hodnocení výsledků testu musí být protilátky třídy IgG a IgM posuzovány společně.

Hlavním markerem odpovědi ve třídě IgM je u soupravy *recomLine Toxoplasma* antigen ROP1. Protilátky třídy IgM proti dalším antigenům jsou méně signifikantní. Protilátky třídy IgM proti ROP1 jsou téměř vždy přítomny během časné fáze infekce a obvykle odpovídají za dlouhodobé přetrvávání titru IgM. V časné fázi infekce jsou často detekovatelné rovněž protilátky třídy IgM proti GRA8, které také často přetrvávají i po odeznění akutní fáze infekce, obvykle ale ne tak dlouho. Odpověď ve třídě IgM proti GRA7 je vzácná, zpravidla velmi slabá a objevuje se pouze v akutní fázi infekce. Izolované nálezy protilátek třídy IgM (tj. pouze ROP1 nebo GRA8 reaktivita) bez detekce protilátek třídy IgG musí být hodnoceny velmi opatrně. Může dojít k serokonverzi, ale nelze vyloučit nespecifickou reaktivitu. Proto je nutná kontrola titru za 2 – 3 týdny.

Odpověď ve třídě IgA je obvykle velmi variabilní. Může zcela chybět, ale přítomnost protilátek třídy IgA může podpořit nálezní akutní toxoplasmové infekce. Vzorek protilátek třídy IgA neinformuje dostatečně o aktuálním stavu infekce. Odpověď ve třídě IgG charakterizuje především GRA7 a SAG1. Zatímco protilátky třídy IgG proti GRA7 a GRA8 jsou běžně přítomny již na začátku fáze I, protilátky třídy IgG proti MAG1 se objevují později. Protilátky třídy IgG proti SAG1 se neobjevují dříve než ve fázi II (hodnocení rekombinantního SAG1 viz. Tabulka 1). Protilátky třídy IgG proti SAG1 a/nebo GRA7 jsou obvykle detekovatelné celoživotně, zatímco titr IgG protilátek proti ROP1 a GRA8 postupně klesá pod detekční limit. Hraniční nálezy IgG protilátek (tj. pouze GRA7) nepotvrzují imunitu proti toxoplasmové infekci.

Ve většině případů umožňuje stanovení avidity IgG protilátek proti jednotlivým antigenům přesnější posouzení stavu infekce, zejména při odlišení akutní infekce *Toxoplasma gondii* od subakutní infekce s perzistujícími protilátkami třídy IgM (viz. 11.4). Vzorky s nejasnými nebo spornými výsledky by měly být v závislosti na klinickém stavu znovu vyšetřeny za 3 – 5 týdnů. Při negativním výsledku během gravidity by měl být za 8 – 13 týdnů proveden a testován nový vzorek (3).

Negativní výsledek nevylučuje zcela možnost toxoplasmové infekce. Falešně negativní výsledek se může objevit tehdy, je-li odběr proveden před zahájením imunitní odpovědi.

Při všech interpretacích, zvláště u slabě pozitivních výsledků, je třeba brát v úvahu všechna další dostupná klinická data. Je nezbytná úzká spolupráce mezi laboratoří a ošetřujícím lékařem.

U infekční mononukleózy (EBV infekce) se může objevit polyklonální stimulace B lymfocytů. To může vést k nespecifickým reakcím v testech detekujících protilátky třídy IgM. Přítomnost revmatoidního faktoru pravděpodobně neovlivní výsledek testu ve třídě IgM. Použití ikterických sér může vést k vyššímu počtu pozitivních výsledků.

**Tmavé stripy:** séra některých pacientů mohou vytvářet tmavé zbarvení na celém nitrocelulózovém stripu (séra pacientů s alergiemi na proteiny mléka). Za tento fenomén jsou odpovědné různé faktory. Hodnocení těchto stripů je možné pouze s určitými omezeními. „Inverzní“ proužky (bílé proužky na tmavém pozadí) jsou negativní. Korespondující sérum by mělo být vždy znovu testováno jinými serologickými metodami.

### 11.5 Hodnocení infekčního stavu pomocí avidity IgG protilátek

Stanovení avidity IgG protilátek proti *Toxoplasma gondii* se provádí pomocí aviditní reagentie, kat. č. 11010. Protilátková odpověď ve třídě IgG proti jednotlivým specifickým antigenům začíná v různých fázích infekce. Tyto IgG protilátky postupně dozrávají z nízké avidních na vysoce avidní. Na základě této skutečnosti lze stanovit aktuální stav infekce. Je popsán typický průběh IgG odpovědi při infekci *Toxoplasma gondii*; jednotlivé případy se mohou od typického průběhu lišit. Na začátku fáze I se objevují pouze nízké avidní IgG protilátky proti GRA7 a GRA8. V průběhu fáze I se avidita proti GRA7 a GRA8 postupně zvyšuje a objevují se první protilátky proti MAG1. Na konci fáze I se mohou objevit první vysoce avidní protilátky proti GRA7 a/nebo GRA8 a středně avidní protilátky proti MAG1. Imunitní odpověď proti SAG1, která je v akutní fázi obvykle slabá, se může rovněž začít objevovat. V průběhu fáze II se zvyšuje reaktivita proti SAG1 a avidita protilátek proti SAG1 postupně vzrůstá. Vedle vysoce avidních protilátek proti GRA7 se objevují vysoce avidní protilátky proti MAG1. Pro subakutní fázi infekce (fáze III) jsou charakteristické vysoce avidní protilátky proti GRA7 a MAG1 a střední až vysoce avidní protilátky proti SAG1.

V postakutní fázi infekce se mohou objevit nízké nebo středně avidní IgG protilátky proti ROP1 a GRA8. Ve vzácných případech se po akutní fázi infekce mohou objevovat samotné IgG protilátky se střední aviditou proti GRA7, MAG1 nebo SAG1. Nálezy avidity proti těmto antigenům musí být proto při interpretaci avidity hodnoceny opatrně.



**Tab. 2:** Poznámky k hodnocení infekčního stavu pomocí avidity IgG protilátek.

IgG	IgG avidita	IgM	Interpretace
<b>negativní</b>	nedetekováno	<b>negativní</b>	Bez sérologických známek infekce
<b>negativní</b>	nedetekováno	<b>pozitivní</b> (většinou ROP1, často GRA8, zřídka GRA7)	Suspektní akutní infekce (fáze I)
<b>pozitivní</b> (GRA7 a/nebo GRA8, později MAG1, zřídka SAG1)	Nízká až vysoká proti GRA7 a GRA8, nízká až střední proti MAG1	<b>pozitivní</b> (většinou ROP1, často GRA8, zřídka GRA7)	Suspektní akutní infekce (fáze I)
<b>pozitivní</b> (GRA7, GRA8, MAG1, slabě SAG1)	Vysoká proti GRA7, střední až vysoká proti GRA8 a MAG1, současně nízká až střední (zřídka vysoká) proti SAG1	<b>pozitivní</b> (většinou ROP1, často GRA8)	Suspektní akutní infekce (fáze II)
<b>pozitivní</b> (GRA7, MAG1, SAG1)	Střední až vysoká proti SAG1, vysoká proti MAG1 a GRA7	<b>pozitivní</b> (většinou ROP1, zřídka GRA8)	Suspektní subakutní infekce s přetrvávajícími IgM (fáze III)
<b>pozitivní</b> (většinou SAG1, GRA7, často MAG1)	Vysoká proti MAG1, SAG1 a GRA7	<b>negativní</b>	Latentní infekce (fáze IV)

Jednotlivé fáze toxoplasmové infekce odpovídají obvykle následujícím časovým úsekům:

Fáze I: 0 – 3 měsíce po infekci

Fáze II: 3 – 6 měsíců po infekci

Fáze III: 6 – 12 (- 36) měsíců po infekci

Fáze IV: > 12 - > (- 36) měsíců po infekci (12, podle H.Hlobil, K.Friese: „Pränatale Toxoplasmose. Infektionserkrankungen der Schwangeren und des Neugeborenen, 1998, 292-307, viz. „Diagnostika“, kapitola 3).

**Tab. 3:** Charakteristické výsledky stanovení infekční fáze

Infekční fáze (I - IV)		ROP1	MAG1	SAG1	GRA7	GRA8
<b>Fáze I:</b>	IgG	-----	-----	-----	-----	-----
	IgG avidity	-----	-----	-----	-----	-----
	IgM	pozitivní	-----	-----	((pozitivní))	(pozitivní)
<b>Fáze I:</b>	IgG	pozitivní	(pozitivní)	((pozitivní))	Pozitivní	pozitivní
	IgG avidita	-----	Nízká ⇒ i*	-----	nízká ⇒ i*, ⇒ vysoká	nízká ⇒ i*, ⇒ vysoká
	IgM	pozitivní	-----	-----	((pozitivní))	(pozitivní)
<b>Fáze II:</b>	IgG	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
	IgG avidity	-----	i* ⇒ vysoká	nízká ⇒ i*	vysoká	vysoká
	IgM	pozitivní	-----	-----	-----	(pozitivní)
<b>Fáze III:</b>	IgG	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
	IgG avidity	-----	vysoká	vysoká	vysoká	-----
	IgM	pozitivní	-----	-----	-----	((pozitivní))
<b>Fáze IV:</b>	IgG	(pozitivní)	pozitivní	pozitivní	pozitivní	(pozitivní)
	IgG avidity	-----	vysoká	vysoká	vysoká	-----
	IgM	-----	-----	-----	-----	-----

\*i = střední, (pozitivní): často reaktivní, ((pozitivní)): zřídka reaktivní

## Interpretace stanovení avidity

IgG avidita: Stripy *recomLine IgG* a *recomLine IgG* s aviditou jsou položeny paralelně vedle sebe: přímé srovnání intenzity jednotlivých proužků *recomLine IgG* (koncentrace protilátky) s odpovídajícím *recomLine IgG* – avidita.

„vysoká“ >> 50% (často identické) intenzity proužku *recomLine IgG*

„střední“ ~ 50% intenzity proužku *recomLine IgG*

„nízká“ << 50% intenzity *recomLine IgG*

## 12. Klinické výsledky

### 12.1 Séra z čerstvých toxoplasmových infekcí

Bylo vyšetřeno celkem 28 sér z předpokládaných čerstvých toxoplasmových infekcí získaných z referenční laboratoře, u každého séra byly odebrány 2 – 7 vzorků (111 sér). 26 infekcí se vyskytlo u gravidních žen, 2 u pacientů se zvětšenými lymfatickými uzlinami.

#### Gravidní ženy:

Z 12 případů, u kterých byla přesně známa doba začátku terapie, byl pozitivní výsledek v *recomLine IgM* zjištěn při zahájení terapie v 11 případech; v 9 případech byl také pozitivní výsledek v *recomLine IgG*. V 7 případech byl rovněž pozitivní výsledek v *recomLine IgA*, tři byly hraniční. V 11 případech došlo k rychlejšímu poklesu IgM reaktivity než v referenčním testu. U jednoho průběhu nebyla v *recomLine IgM* jako v jediném testu zjištěna pozitivní IgM reakce; u tohoto průběhu nebyly nalezeny IgG ani IgA protilátky v *recomLine* ani v žádném z dalších referenčních testů.

Ve všech dalších případech byla zvyšující se IgG odpověď doprovázena pozitivní IgM a/nebo IgA odpovědí, která ve většině případů klesala rychleji než v referenčním testu. Ve dvou případech po terapii nebyly nalezeny žádné titry IgM a IgA.

V 7 případech byl výsledek v *recomLine IgG* pozitivní nebo hraniční, zatímco referenční test byl stále negativní.

Z 26 IgG pozitivních počátečních sér mělo 25 sér vzorec IgG proužků typický pro akutní infekci (viz. 11.3 a 11.4). Ve všech těchto případech byla v *recomLine IgG* stanovena nízká až střední avidita. V jednom případě vzorec IgG proužků odhalil subakutní infekci s vysokou IgG aviditou.

#### Pacienti se zvětšenými lymfatickými uzlinami:

Byli vyšetřeni 2 pacienti se zvětšenými lymfatickými uzlinami (bez terapie). Oba případy byly IgG a IgM pozitivní, jeden také IgA pozitivní.

V prvním případě byl vzorec IgG proužků typický pro akutní infekci; avidita IgG byla nízká. Ve dvou dalších odběrech se vzorec IgG proužků změnil ve smyslu subakutní a postakutní infekce a IgG avidita vzrůstala paralelně s poklesem titrů IgM a IgA.

Ve druhém případě vzorec IgG proužků a nízká avidita IgG odpovídaly akutní infekci s vysokou hladinou IgM; v dalším vzorku se vzorec IgG proužků změnil ve smyslu subakutní infekce se střední aviditou a klesající hladinou IgM.

**Tato vyšetření potvrdila, že *recomLine IgG* detekuje protilátky třídy IgG s vysokou senzitivitou i v časně fázi infekce. Vzorec IgG proužků a stanovení IgG avidity jsou základem pro efektivní diagnostiku akutní toxoplasmové infekce. Reaktivity IgM klesají po ukončení akutní fáze infekce při terapii v *recomLine IgM* ve srovnání s referenčními testy rychleji.**

### 12.2 Pozitivní séra

IgG: Pomocí dvou referenčních testů ELISA bylo 193 vzorků určeno jako IgG pozitivní/hraniční. Všechna séra byla metodou *recomLine IgG* hodnocena jako pozitivní/hraniční (senzitivita 100,0%).

IgM: Pomocí tří referenčních testů ELISA bylo 95 vzorků určeno jako pozitivní/hraniční. 79 z nich bylo v testu *recomLine IgM* hodnoceno jako pozitivní/hraniční (senzitivita 83,2%). Nižší hladina senzitivity koresponduje se zmíněnou detekcí akutních IgM protilátek místo perzistujících IgM protilátek v testu *recomLine IgM* (viz. séra z čerstvých toxoplasmových infekcí).

IgA: Pomocí dvou referenčních testů ELISA bylo 18 vzorků určeno jako IgA pozitivní/hraniční. 8 sér bylo v testu *recomLine IgA* hodnoceno jako pozitivní, 10 sér jako hraniční (senzitivita 100,0%).

### 12.3 Negativní séra

IgG: Pomocí dvou referenčních testů (IFT, ELISA) bylo 186 vzorků určeno jako IgG negativní. 175 z nich bylo v testu *recomLine IgG* hodnoceno jako negativní (specifita 94,1%). 11 výsledků bylo hraničních, dva z nich byly IgM pozitivní.

IgM: Pomocí dvou referenčních testů ELISA bylo 133 vzorků určeno jako IgM negativní. 124 z nich bylo v testu *recomLine IgM* hodnoceno jako negativní (specifita 93,2%). 2 výsledky byly hraniční a 7 pozitivních,

z nich dva byly IgG hraniční.

IgA: Pomocí dvou referenčních testů ELISA bylo 25 vzorků určeno jako IgA negativní. 24 z nich bylo v testu recomLine IgA hodnoceno jako negativní (specifická 96%).

#### 12.4 Dárci krve

Séra dárců krve byla analyzována následovně: 99 (IgG), 100 (IgM), 100 (IgA).

Tab. 9: Výsledky vyšetření sér dárců krve

	IgG	IgM	IgA
pozitivní	52	8	1
hraniční	10	3	8
negativní	37	89	91

#### 12.5 Potenciálně interferující séra

Nebyly zjištěny chybné výsledky testu při vyšetření potenciálně interferujících látek, tj. chylózních a hemolytických sér a sér s pozitivním revmatoidním faktorem a ANA. Ikterická séra by vzhledem k vyššímu počtu pozitivních výsledků neměla být používána.

U infekční mononukleózy (EBV infekce) může dojít k polyklonální stimulaci B lymfocytů. To může vést k nespecifickým reakcím v testech detekujících protilátky třídy IgM.

#### 12.6 Srovnání sérum-plazma

Při vyšetření vzorků od 25 pacientů nebyly zjištěny rozdíly mezi analýzou séra nebo plazmy.

#### 12.7 Stanovení avidity IgG protilátek

63 vzorků z předpokládaných čerstvých toxoplasmových infekcí bylo vyšetřeno pomocí recomLine IgG a referenčního testu pro stanovení avidity. Úroveň shody byla 98,2% pro nízkou až střední aviditu.






Dalších 30 vzorků z předpokládaných postakutních a dříve prodělaných toxoplasmových infekcí bylo vyšetřeno pomocí recomLine IgG a referenčního testu pro stanovení avidity. Úroveň shody byla 80% pro střední až vysokou aviditu. Ze čtyř vzorků s nízkou aviditou v referenčním testu a vysokou aviditou v recomLine IgG byl pouze jeden IgM pozitivní; vzorec IgG proužků odpovídal postakutní až dříve prodělané infekci. Jeden vzorek měl v referenčním testu vysokou aviditu a v recomLine IgG nízkou aviditu; podle vzorce IgG proužků se jednalo o akutní toxoplasmovou infekci.

### 13. Literatura

- (1) U. Groß, T. Roos und K. Friese: **Toxoplasmose in der Schwangerschaft.** *Deutsches Ärzteblatt* 2001, 98 (46):2778-2783
- (2) **Diskussion zu dem Beitrag Toxoplasmose in der Schwangerschaft.** *Deutsches Ärzteblatt* 2002, 99 (16):920-921
- (3) K. Janitschke: **Laboratoriumsdiagnostik der Toxoplasma-Infektion in der Sterilitätsbehandlung, der Schwangerschaft, bei Neugeborenen und Säuglingen sowie Kleinkindern.** *J Lab Med.* 2002, 26 (7/8), 372-378
- (4) K. Janitschke und H. Hlobil: **Aktuelle Empfehlungen zur Vorgehensweise bei der Untersuchung auf Toxoplasma-Antikörper bei Schwangeren, Neugeborenen und Kleinkindern.** *J Lab Med.* 1998, 22 (9), 495-498
- (5) M. Saathoff, I. Reiter-Owona und H.M. Seitz: **Fünzig Jahre Sabin-Feldman-Test: Anmerkungen zur Spezifität und zur Sensitivität des „Gold Standard“.** 1999, *J Lab Med.* 1999, 23 (9), 494-497
- (6) A.M. Tenter, A.R. Heckerroth und L.M. Weiss: **Toxoplasma gondii: from animals to humans.** *Int J Parasitol* 2000, 30, 1217-1258
- (7) U. Groß (Ed.): **Toxoplasma gondii.** *Curr Topics Microbiol Immunol* 1996, 219
- (8) B. Chumpitazi, A. Boussaid, H. Pelloux, C. Racinet, M. Bost und A. Goullier-Fleuret: **Diagnosis of congenital Toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods.** *J Lab Med.* 1999, 22 (9), 495-498
- (9) D. Aubert, G.T. Maine, I. Villena, J.C. Hunt, L. Howard, M. Sheu, S. Brojanac, L.E. Chovan. S.F. Nowlan und J.M. Pinon: **Recombinant antigens to detect Toxoplasma gondii-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay.** *J Clin Microbiol.* 2000, 38 (3), 1144-1150
- (10) B.J. Suter, S. Blatter, M. Bittar, E.H. Viollier: **Toxoplasmose-IgG-Avidität: Welchen Stellenwert hat sie in der Schwangerschaft?.** *Schweiz Med Wochenschr.* 1999, 38, 1938-1941

(11)P.T. Marcolino, D.A.O. Silva, P.G. Leser, M.E. Camargo und J.R. Mineo: **Molecular markers in acute and chronic phases of human Toxoplasmosis: Determination of immunoglobulin G avidity by Western blotting.** *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000, 7 (3), 384-389

#### 14. Vysvětlivky symbolů

	Počet testů v soupravě
<b>EVALFORM</b>	Vyhodnocovací formulář
<b>INSTRU</b>	Návod k použití
	Podívejte se do pracovního postupu
<b>CONT</b>	Obsah soupravy
<b>IVD</b>	<i>In vitro</i> diagnostická souprava
<b>LOT</b>	Číslo šarže
	Nezmrazujte
<b>REF</b>	Katalogové číslo
	Použitelné do uvedené doby expirace
	Teplotní limitace. Skladujte při x-y°C

#### 15. Kontakty

##### Výrobce:

ALL.DIAG  
 10, rue Ettore Bugatti – BP6  
 67038 Strasbourg Cedex 2  
 tel: 03 88 78 80 88, fax: 03 88 78 76 78  
 www.alldiag.com; info@alldiag.com

##### Dodavatel:

LABOSERV s.r.o.  
 Hudcova 78b, 612 00 Brno  
 Tel: +420 541 243 113, Fax: +420 541 243 114  
 email: laboserv@laboserv.cz  
 objednávkový email: objednavky@laboserv.cz  
 http://www.laboserv.cz