

MASTAFLUOR™ Toxoplasma

Imunofluorescenční test pro detekci protilátek proti *Toxoplasma gondii* v lidském séru

Návod k použití



Pouze pro *in vitro* diagnostiku

Test	Kód	Kit pro
MASTAFLUOR™ Toxoplasma Screen	631181	10 x 5 testů
MASTAFLUOR™ Toxoplasma Screen	631182	10 x 10 testů
MASTAFLUOR™ Toxoplasma IgG	631183	10 x 5 testů
MASTAFLUOR™ Toxoplasma IgG	631184	10 x 10 testů
MASTAFLUOR™ Toxoplasma IgM	631185	10 x 5 testů
MASTAFLUOR™ Toxoplasma IgM	631186	10 x 10 testů

Skladujte při 2 – 8 °C

1. Úvod

Prvok *Toxoplasma gondii* se řadí do skupiny parazitických sporozoi. Nejčastěji infikuje savce, převážně kočky. Infekce člověka je nejvíce nebezpečná pro imunosuprimované osoby, u kterých může propuknout toxoplazmóza s těžkým průběhem. U imunokompetentních a zdravých lidí obvykle probíhá inaparentně, tedy bez příznaků.

Za nejobávanější je považována primární infekce matky v prvním trimestru těhotenství, kdy dochází k přímému přenosu *Toxoplasma gondii* z matky na plod, čímž může způsobit poškození očí nebo CNS plodu. Příznaky mohou přetrvávat i několik týdnů, měsíců nebo i let po narození.

Příčinou primární infekce často bývá konzumace syrového nebo nedostatečně tepelně upraveného masa, nejčastěji vepřového nebo skopového, ve kterém přetrvávají cysty *T. gondii*. Další možnou cestou infekce je přímé požití oocyst, např. s potravou kontaminovanou kočičím trusem.

Životní cyklus *T. gondii* probíhá ve 3 fázích vývoje: cysty, oocysty a tachyzoiti (bradyzoiti) a v závislosti na typu hostitele *T. gondii* zahajuje pohlavní nebo nepohlavní rozmnožování. Člověk se převážně infikuje požitím cyst nebo oocyst nebo transplacentárním přenosem tachyzoitů.

T. gondii se šíří do svalů nebo do mozku, kde se poté nepohlavně množí ve stádiu tachyzoitů. Důsledkem aktivace imunitního systému hostitele rozmnožování končí a *T. gondii* přetrvává ve stádiu cysty, které patrně přetrvává doživotně. V infikované kočce *Toxoplasma* zahajuje pohlavní rozmnožování, kdy vznikají oocysty, které jsou následně vylučovány s trusem. Po 3 dnech po vyloučení dochází ke sporulaci, kdy se oocysty stávají infekčními a takto mohou přežívat v půdě nebo ve vodě po dobu i několika měsíců.

Díky tomuto životnímu cyklu a spektru hostitelů je *T. gondii* rozšířená po celém světě. Nejméně 50 % populace západní a střední Evropy je nakažena a hostí tkáňové cysty. Se vzrůstajícím věkem roste i prevalence v populaci, přibližně o 1 % za rok.

2. Použití

Souprava MASTFLUOR™ *Toxoplasma* je určena pro detekci specifických protilátek proti *Toxoplasma gondii* v lidském séru a slouží pro confirmaci a diagnostiku infekce *T. gondii*.

Pro detekci protilátek třídy IgM je doporučeno použít kit MASTSORB (Kat.č. 651003) pro vyloučení revmatoidních faktorů.

Tento test je určen pouze pro použití *in vitro*.

3. Princip testu

Naředěné vzorky, negativní a pozitivní kontroly jsou přidány do jamek na sklíčku, které jsou potaženy fixovanými buňkami *Toxoplasma gondii*, a následně jsou inkubovány. Pokud jsou v séru přítomny specifické protilátky, navážou se na fixované buňky a vytváří stabilní komplex antigen-protilátka.

Sklíčka jsou poté promývána pro odstranění nenavázaného materiálu a navázané protilátky jsou detekovány přidáním konjugátu s fluorescenčně značeným anti-lidským IgG, IgM nebo IgA imunoglobulinem. Po dalším promývacím kroku pro odstranění nenavázaného konjugátu jsou sklíčka vyhodnocována pod fluorescenčním mikroskopem. Pozitivní reakce je pozorována jako zelená fluorescence buněk *T. gondii*.

4. Součásti soupravy

Souprava MASTFLUOR™ *Toxoplasma* obsahuje všechny potřebné reagenty. K dispozici je také balení obsahující pouze sklíčka.

	100 testů	50 testů	Specifikace
Sklíčka	10 x 10 (sklíčka x jamky)	10 x 5 (sklíčka x jamky)	Potaženy fixovanými buňkami <i>Toxoplasma gondii</i>
Pozitivní kontrola	0,5 mL	0,5 mL	IgG nebo IgM pozitivní sérum, obsahuje < 0,1% azidu sodného, připraven k použití
Negativní kontrola	0,5 mL	0,5 mL	IgG a IgM negativní sérum, obsahuje < 0,1% azidu sodného, připraven k použití
FITC-konjugát	3 mL	2 mL	IgG: FITC-značené anti-lidské IgG (γ-řetězec) IgM: FITC-značené anti-lidské IgM (μ-řetězec)

			Screen: FITC-značené anti-lidské IgG/IgM/IgA všechny konjugáty obsahují < 0,1% azidu sodného, připraveny k použití
Serum diluent	2 x 10 mL	1 x 10 mL	Sérum diluent, 5 x koncentrovaný, k ředění 1:5 před použitím
Evans Blue	3 mL	3 mL	Evansova modř, obsahuje < 0,1% azidu sodného, připravena k použití
Mounting Medium	3 mL	3 mL	Montovací médium, obsahuje < 0,1% azidu sodného, připraveno k použití
PBS Pufr	2 sáčky	2 sáčky	1 sáček pro rozpuštění v 1L destilované vody, pH 7,2 ± 0,2

Návod k použití

Před použitím čtěte příbalový leták a dodržujte doporučené postupy.

5. Potřebný materiál, který není součástí soupravy

- Sterilní zkumavky
- Mikropipety a špičky
- Barvicí nádoba nebo Coplinova nádoba
- Vlhká komůrka
- Odměrný válec pro PBS
- Destilovaná voda nebo voda vyšší kvality
- Kleště
- Transmisní fluorescenční nebo epifluorescenční mikroskop s 490 nm excitačním filtrem a 510 nm bariérovým filtrem
- Krycí sklíčka
- Promývací lahev

6. Uchování a stabilita reagensů

Všechny součásti kitu MASTFLUOR™ Toxoplasma jsou použitelné do data expirace uvedeném na obale. Všechny reagensie skladujte při teplotě 2 – 8 °C. Před použitím nechte všechny reagensie a sklíčka vytemperovat při pokojové teplotě.

Naředěný promývací pufr (PBS) skladujte při teplotě 2 – 8 °C po dobu max. 30 dní. Před použitím se ujistěte, zda je pufr vytemperován při pokojové teplotě.

Ostatní reagensie jsou použitelné až do data expirace, pokud jsou skladovány při teplotě 2 – 8 °C.

Vzorky (sérum, plazma) by měly být skladovány při teplotě 2 – 8 °C pod dobu max. 3 dnů. Pro delší skladování vzorky uchovávejte při teplotě -20 °C. Vzorky opakovaně nezamrazujte.

7. Upozornění a zvláštní opatření

- Pouze pro *in-vitro* diagnostiku! Zabraňte požití či spolknutí! Při práci dodržujte laboratorní bezpečnostní opatření. V laboratoři nejezte, nepijte ani nekuřte.
- Před použitím čtěte příbalový leták a dodržujte doporučené postupy. Neupravujte pracovní postup.
- Reagensie nepoužívejte po datu jejich expirace.
- Používejte ochranný oděv a příslušné ochranné pomůcky.
- Nenasávejte pipetu ústy.
- Používejte jednorázové plastové spotřební materiály vždy, když je to možné. Opakovaně použitelné skleněné materiály by měly být před jejich použitím důkladně umyty a opláchnuty přípravky bez obsahu detergentů.
- Kontrolní séra této soupravy byly testovány všeobecně uznávanými metodami na HBsAg a na protilátky proti HIV a HCV a byly stanoveny jako negativní. Nicméně z preventivních důvodů je nutné považovat materiál za potenciálně infekční a při práci používat ochranné latexové rukavice a další ochranné pomůcky. Nelze poskytnout žádnou záruku, že séra nejsou infekční.
- Používejte destilovanou vodu nebo vodu vyšší kvality

- Není možné míchat či jinak používat reagentie ze stejných souprav o jiné šarži. Reagentie jsou kalibrovány pro každou šarži.
- Kvůli zabránění vzniku kontaminace je nutné používat jednorázové, vyměnitelné špičky na pipety. Pro každý vzorek nebo reagentii používejte novou špičku.
- Zamezte vyschnutí jamek v průběhu postupu.
- Nevystavujte sklíčka přímému slunečnímu záření nebo jiným nepříznivým podmínkám během inkubace.
- Kontaminované plastové potřeby by měly být zlikvidovány a určeny ke spálení. Kontaminované skleněné potřeby by měly být autoklávovány při teplotě 121 °C nebo dekontaminovány v 2,5% roztoku chlornanu sodného. Veškerý kapalný odpad by měl být dekontaminován (např. roztokem chlornanu sodného).
- Nevystavujte FITC-konjugát přímému slunečnímu záření, UV nebo fluorescenčnímu záření. Udržujte ho ve tmě, jak jen je to možné.
- Nepoužívejte mikrobiálně kontaminované vzorky sér.
- Nepoužívejte hemolyzované, lipemické nebo ikterické vzorky sér.
- Obsahuje azid sodný jako konzervant, který může být po požití toxický. Azid sodný může reagovat s olovem a mědí za vzniku výbušných solí. Olovo nebo měď mohou být součástí odpadních trubek, proto vylévejte reagentie pod dostatečně tekoucí vodou.

8. Pracovní postup

1. Před použitím nechte všechny součásti soupravy a vzorky vytemperovat při pokojové teplotě (nejméně 20 °C).
2. Rozpusťte 1 sáček PBS v 1 litru destilované nebo deionizované vody.
Naředte 5x koncentrovaný Serum diluent v poměru 1:5 destilovanou nebo deionizovanou vodou (např. 10 mL diluentu + 40 mL vody). Pro ředění vzorků je doporučeno použít Serum diluent (ředěný).
3. Naředte všechna séra naředěným Serum diluentem (případně PBS) dle následujícího:

IgG:	1:64	např. 10 µL séra + 630 µL Serum diluentu (nebo PBS)
IgM:	1:16	např. 10 µL séra + 150 µL Serum diluentu (nebo PBS)
Screen:	1:64	např. 10 µL séra + 630 µL Serum diluentu (nebo PBS)

Pro IgM test je doporučeno použít MASTSORB (Kat.č. 651003) pro minimalizaci interference s revmatoidním faktorem. Vzorky testované testem Screen nesmí být připravovány pomocí MASTSORB! Také pozitivní kontrola nesmí být připravována pomocí MASTSORB!
4. Všechny kontroly jsou připraveny k použití. Nesmí být ředěny.
5. Opatrně vyjměte sklíčko za sáčku. Nedotýkejte se jamek ani jejich blízkému okolí.
6. Přidejte 20 – 25 µL naředěného vzorku a kontrol do příslušných jamek na sklíčku dle připraveného schématu. Ujistěte se, že jsou všechny jamky naplněny tak, aniž by roztok unikal z jamky. Přímý kontakt pipety s povrchem jamky může nepříznivě ovlivnit výsledek.
7. Vložte sklíčko do inkubační komůrky a inkubujte při pokojové teplotě dle následujícího:

IgG:	30 min.
IgM:	45 min.
Screen:	30 min.
8. Po skončení inkubace opatrně promyjte sklíčko pomocí promývací lahve s PBS tak, aby přímý proud PBS nezasahoval do jamek. Promytí může být provedeno tak, že je proud směřován do linie mezi jamkami uprostřed sklíčka a je nejprve promývána jedna strana sklíčka (jamky 1 – 5) a poté je stejným způsobem promývána druhá strana sklíčka (jamky 6 – 10).

9. Pomožte sklíčko do barvicí nádoby nebo do Coplinovy nádoby s PBS a každých 5 minut vyměňte PBS. Takto promývejte po dobu 15 minut.
10. Vyjměte sklíčko z barvicí nádoby s PBS a odstraňte přebytečný PBS. Pomocí filtračního papíru nebo papírové utěrky osušte okolí jamek a zadní část sklíčka. Nedotýkejte se povrchu jamek!
11. Ihned umístěte sklíčko do vlhké komůrky a přidejte 20 – 25 μ L FITC-konjugátu do každé jamky. Zamezte vyschnutí jamek!
12. Inkubujte v uzavřené vlhké komůrce při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
13. Zapněte mikroskop 15 minut před použitím.
14. Po inkubaci promyjte sklíčko pomocí PBS: zopakujte krok 9 a 10.
Volitelné: Přidejte 3 až 5 kapek Evans Blue před tímto posledním promývacím krokem. Může vylepšit diferenciaci pozitivních a negativních výsledků.
15. Vyjměte sklíčko z barvicí nádoby s PBS a odstraňte přebytečný PBS. Pomocí filtračního papíru nebo papírové utěrky osušte okolí jamek a zadní část sklíčka. Nedotýkejte se povrchu jamek!
16. Přidejte malé množství montovacího média do každé jamky. Přikryjte krycím sklíčkem. Ihned odečítejte výsledky. Dbejte na to, aby při přikládání krycího sklíčka nevznikaly vzduchové bublinky. Nadbytek montovacího média může způsobit fluorescenci pozadí z důvodu vysokého rozptylu světla. Případný nadbytek montovacího média odstraňte pomocí papírové utěrky tak, aby nedošlo k pohybu krycího sklíčka.
17. Odečítejte výsledky pomocí fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 400x nebo 800x.

9. Interpretace výsledků

Validace

Před testováním vzorků pacientů vždy prohlédněte i kontrolní vzorky. Kontroly musí vždy vykazovat danou intenzitu fluorescence. Pokud intenzita neodpovídá uvedeným hodnotám, nemůžou být odečítány vzorky pacientů. Test by měl být vyhodnocen jako neplatný a měl by být opakován.

Vzorek	Očekávaná intenzita fluorescence
IgG Pozitivní kontrola	3+ až 4+
IgM Pozitivní kontrola	2+ až 3+
Screen Pozitivní kontrola	3+ až 4+
Negativní kontrola	negativní

Pro správnou interpretaci výsledků vždy srovnávejte vzorek s pozitivní a negativní kontrolou.

Interpretace výsledků patientských vzorků

Vzorky sér by měly být vždy testovány a srovnávány s kontrolami. Kontroly by měly vždy být součástí každého testování.

Vzorek s intenzitou fluorescence +1 by měl být určen s ohledem na pozitivní kontrolu a měl by být ředěn dle titrů uvedených v QC certifikátu.

IgG a Screen pozitivní vzorky:

Pozitivní séra vykazují homogenní fluorescenci cytoplazmatické membrány *Toxoplasma gondii* (zeleně). Barvení obvykle pokrývá celou membránu. Cytoplasma se může jevit jako zeleně zbarvená nebo dokonce i s fluorescencí. Samotná fluorescence cytoplasmu bez současné fluorescence membrány musí být vyhodnocena jako negativní.

IgM pozitivní vzorky:

Pozitivní séra vykazují homogenní nebo jemně zrnitou fluorescenci cytoplazmatické membrány *Toxoplasma gondii* (zeleně). Samotná fluorescence cytoplasmu bez současné fluorescence membrány musí být vyhodnocena jako negativní.

Negativní vzorky:

Membrána *Toxoplasma gondii* nevykazuje žádnou fluorescenci. Samotná fluorescence cytoplasmu bez současné fluorescence membrány musí být vyhodnocena jako negativní.

Výsledky definované jako pozitivní:

IgG: ≥ 1:64

IgM: ≥ 1:16

Screen: ≥ 1:64

Výsledky interpretujte s ohledem na aktuální informace uvedené na stránkách RKI, WHO nebo FDA, a to proto, zda titry protilátek reflektují imunitu, žádnou imunitu nebo akutní infekci.

Pro určení titru ředte vzorek ředící řadou, přičemž začněte na „Screen“ titru. Jako diluent by měl být použit PBS.

Senzitivita / Specificita

	IgG	IgM	Screen
Senzitivita	100 %	100 %	92,6 - 100 %
Specificita	100 %	97,7 - 100 %	100 %

10. Omezení testu

1. Přítomnost ANA protilátek v séru může vést k fluorescenci cytoplasmu *Toxoplasma gondii*.
2. Tento test byl shledán jako vysoce senzitivní a vysoce specifický, nicméně je potřeba výsledky zohlednit vzhledem k dalším serologickým testům, klinickému obrazu a anamnéze pacienta a dalšími aspekty tak, aby byla diagnóza určena správně.

11. Literatura

1. www.rki.de
2. www.who.org
3. www.fda.gov
4. Thomas L.: Labor und Diagnose, 6. Auflage (2005) TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt.

Distributor:

GALI spol. s.r.o.
Ke Stadionu 179
Semily, 513 01
Tel: +420 481 689 050
Fax: +420 481 689 051
E-mail: info@gali.cz
Web: www.gali.cz

Výrobce:

Mast Diagnostica GmbH
Feldstraße 20
DE 23858 Reinfeld
Tel.: +49 4533 2007-0
Fax: +49 4533 2007-68
E-mail: mast@mast-diagnostica.de
Web: www.mastgrp.com