

TPHA TYRIMO RINKINYS

T.pallidum atikūnų aptikimui žmogaus serume, naudojant mikro hemagliutinaciją.

**Tik In-Vitro diagnostikai ir profesionaliam naudojimui
Laikyti 2°C - 8°C temperatūroje**

PASKIRTIS

TPHA tyrimo rinkinys yra skirtas Treponema pallidum atikūnų (IgG ir IgM antikūnų) žmogaus serume ar plazmoje nustatymui, pagrįstas pasyvios hemagliutinacijos principu.

ĮVADAS

Sifilis yra venerinė liga, kurią sukelia spirochetos mikroorganizmas Treponema pallidum. Kadangi šis organizmas negali būti kultivuojamas ant dirbtinės terpės, sifilio diagnozė priklauso nuo klinikinės koreliacijos su specifiniais antikūnais, kurie nustatomi serologiniais tyrimais. Serologiniai sifilio tyrimai, naudojant kardioliipiną ir lecitiną kaip antigenus yra paprasti atlikti, bet dažnai pasireiškia biologiniai klaidingai teigiami (BFP) reakcijų rezultatai, nes testuose naudojami ne treponemos antigenai.

TPI ir FTA-ABS tyrimuose naudojami patogeniški Treponema pallidum kaip antigenai, tačiau šie tyrimai kelia tam tikrų rūpesčių serodiagnostikoje. TPI testas reikalauja gyvo patogeninio T.Pallidum, o FTA-ABS tyrimo procedūra reikalauja fluorescencinio mikroskopo. Abu tyrimai reikalauja aukšto lygio darbuotojų kompetencijos.

Buvo nustatyta, kad TPHA tyrimo rinkinys yra patogus atlikti ir yra specifinis tyrimas treponemos infekcijos diagnozei, kurios specifika yra panaši į TPI tyrimą ir jautrumas panašus į FTA-ABS tyrimą. Šis tyrimas reikalauja minimalios laboratorinės įrangos ir yra labai paprastas atlikti. TPHA reagentai yra naudojami nustatyti T.pallidum žmogaus serumo antikūnams, naudojant netiesioginį hemagliutinacijos (IHA) metodą. Konservuoti paukščių eritrocitai yra padengti antigeniniais patogeniniais komponentais T.pallidum (Nichol štamai). Šios bandomosios ląstelės agliutinuoja dalyvaujant specifiniams T.pallidum antikūnams ir sudaro charakteringus darinius mikrotitravimo plokštelėse.

Bet kokios įvykstančios nespecifinės reakcijos aptinkamos naudojant kontrolės ląsteles, kurios yra paukščių eritrocitai, nepadengti T.pallidum antigenų. Naudojant šias kontrolines ląsteles, gali būti absorbuojamos nespecifinės reakcijos. Antikūnai yra absorbuojami ekstrakto pagalba prie netipinių treponemų, Reiterio treponemomis, įtrauktomis į ląstelių suspensiją. Tyrimo rezultatai yra gaunami per 45-60 minučių, o ląstelių agliutinacijos modeliai abu yra vertinami lengvai ir ilgą laiką.

Tiriamas mėginys skiedžiamas absorbuojančiu skiedikliu, kad būtų pašalinti galimai kryžmiškai reaguojantys heterofiliniai antikūnai ir pašalinami, blokuojant arba absorbuojant potencialiai kryžminį atsaką.

MEDŽIAGOS

PATEIKTOS RINKINYE MEDŽIAGOS

- Tyrimo ląstelės; konservuoti paukščių eritrocitai, padengti T.pallidum antigenų.
- Kontrolės ląstelės; konservuoti paukščių eritrocitai.
- Skiediklis.
- Teigiamas kontrolinis serumas; (skiestas 1:20), naudokite gryną. Tai duos ekvivalentinį titrą 1/640: / 2560 kiekybiniame tyrime.
- Neigiamas kontrolinis serumas; (skiestas 1:20), naudokite gryną.
- Pakuotės lapelis.

KITOS REIKALINGOS MEDŽIAGOS

- Dozatoriai, skirti 10:25:75 ir 190 mikrolitrų tūriui.
- U formos mikrotitravimo plokštelės.

ATSARGUMO PRIEMONĖS

Reagentuose ir kontrolėse yra konservantų, kurių sudėtyje yra 0,1% natrio azido. Vengti patekimo ant odos ar gleivinės. Atliekant tyrimus, turėtų būti laikomasi normalių laboratorijos atsargumo priemonių.

REAGENTŲ NAUDOJIMAS

Visiems reagentams turi būti leidžiama pasiekti kambario temperatūrą prieš naudojimą. Jokių reagentų neužšaldykite. Nenaudokite hemolizuoto, užteršto ar lipeminio serumo ar plazmos, nes tai neigiamai paveiktų rezultatus.

REAGENTŲ LAIKYMAS

- Rinkinys turėtų būti laikomas 2-8°C temperatūroje, vertikaloje padėtyje.
- Esant šioms sąlygoms, rinkinio eksploatacinės charakteristikos bus išlaikytos mažiausiai 15 ar 18 mėnesių nuo pagaminimo dienos.
- Rinkinio galiojimo pabaigos datą rasite ant pakuotės etiketės.
- Reagentai turi būti pašalinti, jei jie užteršiami ar nepaėjo kontrolės.
- Kiekvieno rinkinio reagentai buvo standartizuoti išgaunant atitinkamą reakciją ir todėl reagentai neturėtų būti tarpusavyje keičiami su kitų partijų rinkinių komponentais.

MĖGINIO PARUOŠIMAS

- Tyrimo rinkinys skirtas naudoti tik su serumu.
- Plazmos mėginiai neturėtų būti naudojami.
- Mėginiai turi būti nehemolizuoti ar su priemaišomis.
- Serumo mėginiai gali būti laikomi 2-8°C temperatūroje, jei yra pridėtas konservantas.
- Ilgalaiam saugojimui serumai turėtų būti laikomi -20°C temperatūroje. Venkite bet kokio užterštumo seilėmis. Tai sukels teigiamus klaidinančius rezultatus.

PROCEDŪROS

KOKYBINIS METODAS

Kiekvienam mėginiui reikia 3 šulinėlių mikrotitravimo plokštelėje.

- 1.Įpilkite 190 µl skiediklio į šulinėlį 1.
- 2.Įpilkite 10 µl serumo į šulinėlį 1 (mėginio praskiedimas 1:20).
- 3.Naudodami mikropipetę, sumaišykite šulinėlio 1 turinį ir perkeltkite 25 µl mišinio į šulinėlius 2 ir 3.
- 4.Užtikrinkite, kad testo ir kontrolės ląstelės būtų kruopščiai atskirtos. Pridėkite 75µl kontrolinių ląstelių į šulinėlį 2. 75 µl testo ląstelių į 3 šulinėlį.
- 5.Kruopščiai sumaišykite turinį.
- 6.Inkubuokite 45-60 minučių kambario temperatūroje.
- 7.Atsargiai! Laikykite plokštelę atokiai nuo karščio, tiesioginių saulės spindulių ir bet kokio vibracijos šaltinio.
- 8.Vertinkite rezultatus. Rezultatai yra stabilūs 24 valandas, jei plokštelė yra uždengta ir yra laikomasi pirmiau nurodytų atsargumo priemonių.

PASTABA

Kontrolės, esančios rinkinyje gali būti atliekamos lygiagrečiai, jos yra atskiestos ir paruoštos naudojimui.

KIEKYBINIS METODAS

Kiekvienam mėginiui reikia 8 šulinėlių mikrotitravimo plokštelėje, pažymėtų raidėmis nuo A iki H.

- 1.Įpilkite 25 µl skiediklio į šulinėlius B - H imtinai.
- 2.Perpilkite 25 µl 1:20 serumo skiedinio iš kontrolinio testo į šulinėlius A ir B.
- 3.Paimkite 25 µl praskiesto serumo iš šulinėlio B ir paeiliui atskieskite šulinėlius B - H imtinai 25 µl alikvotais, pašalinkite 25 µl praskiesto serumo iš šulinėlio H.
- 4.Užtikrinkite, kad testo ląstelės būtų kruopščiai resuspenduotos. Įpilkite 75 µl tiriamųjų ląstelių į šulinėlius nuo A iki H imtinai. Gausite 1/80 serumo skiedinio šulinėlyje A iki 1 /10240 šulinėlyje H.
- 5.Švelniai ir kruopščiai sumaišykite turinį.
- 6.Inkubuokite 45-60 minučių kambario temperatūroje.
- 7.Atsargiai! Laikykite plokštelę atokiai nuo karščio, tiesioginių saulės spindulių ir bet kokio vibracijos šaltinio.
- 8.Vertinkite rezultatus. Rezultatai yra stabilūs 24 valandas, jei plokštelė yra uždengta ir yra laikomasi pirmiau nurodytų atsargumo priemonių.

REZULTATAI

REZULTATAI	TESTO LAŠTELĖS	KONTROLINĖS LAŠTELĖS
Stipriai teigiamas	Pilnai laštelėmis pasidengęs šulinėlio dugnas	Nėra agliutinacijos
Silpnai teigiamas	Laštelės dengia apytiksliai 1/3 šulinėlio dugno	Nėra agliutinacijos
Nenustatytas	Lašelių sluoksnio fone aiškiai atviras centras	Nėra agliutinacijos
Neigiamas	Laštelės kompaktiškai pasiskirsto ant dugno su tipišku mažu švari centru.	Nėra agliutinacijos
Nespecifinis*	Teigiama reakcija	Teigiama reakcija

Nespecifinė absorbcija*

- Į mažą mėgintuvėlį įpilkite 10 µl, tada pridėkite 190 µl kontrolinių lašelių. Sumaišykite gerai ir palikite pastovėti 30 minučių.
- Centrifuguoti 15 minučių esant 1000 aps/min ir tirkite pagal kokybinį metodą.

Pastaba:

Jei rezultatas yra pakartotinai nespecifinis, mėginys turėtų būti ištirtas kitu metodu pvz. tiriant reagentus arba FTA-ABS.
Nors TPHA testas yra labai specifiškas, klaidingai teigiami rezultatai gali pasireikšti pacientams, sergantiems raupsais, infekcinėmis ligomis, esant mononukleozai ir jungiamojo audinio sutrikimams. Patvirtinimui turėtų būti naudojamas FTA-ABS testas.

REZULTATŲ VERTINIMAS

Stipriai teigiama reakcija gali rodyti užsilenkimus lašelių fono kraštuose. Kai testas gaunamas teigiamas, reikia stebėti kontrolinį šulinėlį. Kontrolinės laštelės turėtų glaudžiai nusėsti ant dugno. Jos neturėtų būti lyginamos su nereaktyviom serumo struktūrom, nes kontrolinės laštelės sudarys labiau kompaktišką struktūrą nei tyrimo laštelės.

Silpna teigiama reakcija gali parodyti, kad nėra pilno lašelių pasidengimo ant šulinėlio dugno.

NETEISINGAS rezultatas gali parodyti agliutinaciją kontroliniame šulinėlyje, kas rodo mėginių nespecifinių agliutininų buvimą. Serumai, dėl kurio gaunamas šis rezultatas gali būti absorbuotas naudojant kontrolines lašteles, apibūdinant kaip nespecifinę absorbciją.

NENUSTATOMAS rezultatas gali parodyti abejotiną reakciją su tyrimo laštelėmis. Rezultatas gali rodyti žemą antikūnų lygį esant pradiniam pirminiam sifiliui.

Šis mėginys turi būti iš naujo patikrintas atliekant kokybinį tyrimą, tada kitas mėginys turėtų būti tiriamas vėliau, siekiant nustatyti, ar nėra didėjančio titro. Taip pat patartina atlikti pakartotiną tyrimą ir (arba) atlikti tyrimą kitu patvirtinimo metodu (FTA-ABS). **NEIGIAMAS** gali rodyti lašteles, nusistovėjusias reakcijos šulinėlio apačioje.

ATLIKIMAS

Jautrumas

Su klinikiniais mėginiais lyginant juos su FTA-ABS ir (arba) klinikinėm diagnozėm buvo 99,7% (298/299)

Specifiškumas

Su klinikiniais mėginiais buvo 99,3% (301/303).

Kryžminis reaktyvumas

Reaktyvūs rezultatai gali reikšti aktyvią ar sėkmingai gydomą infekciją.














Buvo nustatyta, kad rezultatų neįtakuoja (10 klinikinių mėginių)

- Reumatoidinis faktorius.
- Po hepatito B vakcinacijos.
- Genitalijų herpes.
- Leptospirozė.
- EBV infekcija.
- SLE
- Laimo liga.

LITERATŪRA

1. Rathlev T. - Haemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic Treponema pallidum WHO/VDT/RES 1965 ; 77 : 65.
2. Tomizawa T, Kasamatsu S. - Haemagglutination tests for diagnosis of syphilis. A preliminary report. Japan. J. Med. Sci. Biol. 19, 305-308,1966.
3. Rathlev T. - Haemagglutination test utilizing pathogenic Treponema pallidum for the serodiagnosis of syphilis. Br J Vener Dis 1967 ; 43 : 181-5.
4. Tomizawa T. Kasamatsu S. Yamaya S. - Usefulness of the haemagglutination test using Treponema pallidum antigen (TPHA) for the serodiagnosis of syphilis. Jap J Med Sci Biol 1969; 22: 341-50.
5. Sequeira P, J, L. Eldridge A, E. – Treponemal Haemagglutination test. Br J Vener Dis 1973; 49: 242-8.
6. Larsen S.A., Hambie E.A., et coll., Specificity, sensitivity and reproducibility among the fluorescent treponemal antibody absorption test, the microhemagglutination assay for Treponema pallidum antibodies, and the hemagglutination treponemal test for syphilis. J. Clin. Microbiol., 1981 ; 14 : 441 – 445.
7. Houg H. - Syphilis: new diagnostic directions. Intern. J. STD and AIDS 1992; 3: 391-413.
8. Sluis J.J. Van Der. - Laboratory Techniques in the diagnosis of syphilis: a review. Genitourin Med. 1992; 68 : 413-9.

ATLAS MEDICAL
William James House, Cowley Rd,
Cambridge, CB4 4WX, UK
Tel: ++44 (0) 1223 858 910
Fax: ++44 (0) 1223 858 524
PPI080A01
Rev F (09.06.2016)
Catalogue Number Store at
For In-Vitro Diagnostic
use

 REF	Catalogue Number		Store at
 IVD	For In-Vitro Diagnostic use		Caution
	Number of tests in the pack		Read product insert before use
 LOT	Lot (batch) number		Manufacturer
	Fragile, handle with care		Expiry date
	Manufacturer fax number		Do not use if package is damaged
	Manufacturer telephone number		

Vertimas tikras