

IMMUTREP® TPHA Ref OD221/ OD071/ OD081

Treponema pallidum hemagliutinacijos testas Sifilio Serodiagnozei Laikyti 2°C to 8°C. NEUŽŠALDYTI.
Naudoti tik in vitro diagnostikai.

ĮVADAS IR PASKIRTIS

Sifilis yra kompleksinė liga, kuri paprastai perduodama lytiniu keliu. Jos sukėlėjas, *Treponema pallidum* negali būti išaugintas ant įprastinių laboratorinių terpių ar ląstelių kultūroje. Infekcija paprastai diagnozuojama aptinkant specifinius antikūnus *T. pallidum* paciento serume ar likvore.

Antikūnus galima aptikti jau po 3-4 savaičių po užsikrėtimo, o jų stebimas titras gali išlikti dar ilgą laiką po gydymo. Susidaro dvi antikūnų grupės: viena reaguoja su netreponeminio tipo antigenais, naudojamiems VDRL Carbon Antigen ir RPR testuose, kita - su antigenais, specifiskais *T. pallidum* atžvilgiu. Antikūnai prieš netreponeminius antigenus paprastai aptinkami aktyvioje susirgimo stadijoje, o po sėkmingo gydymo jų lygis nukrinta. Specifiški antikūnai išlieka ilgą laiką pacientą išgydžius.

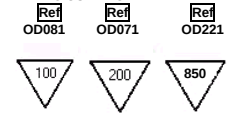
Būtina tirti abiejų grupių antikūnus, nes netreponeminiai antikūnai gali atsirasti ne tik dėl sifilio infekcijos.

IMMUTREP TPHA yra specifiskas, jautrus pasyviojo hemagliutinacijos testas, skirtas antikūnų prieš *Treponema pallidum* serume ar likvore. Tik profesionaliam naudojimui.

TESTO PRINCIPAS

IMMUTREP-TPHA testą sudaro formolizuoti gaidžio eritrocitai, padengti antigenu, kontroliniai (nepadengti) formolizuoti gaidžio eritrocitai, skiediklis ir kontroliniai serumai. Kai praskiesti teigiami mėginiai sumaisomi su įjautrintais eritrocitais, antikūnai sąveikauja su įjautrintu antigenu ir vyksta ląstelių agliutinacija. Mikrotitravimo plokštelės šulinėlio dugne susidaro charakteringos išvaizdos ląstelių nuosėdos. Jei antikūnų nėra, ląstelės nuosėda dugne ir susidaro kompaktiška tabletė. Šis testas kalibruotas pagal WHO Reference Serumą Serodiagnostiniams testams treponeminių infekcijoms nustatyti - Ref 3-1980 +/- vienas dvigubas praskiedimas: taip užtikrinamas tinkamas jautrumas.

RINKINIO SUDĖTIS



Test	Cells	8.5ml	2x8.5ml	2x33ml
T. Pallidum antigenu padengti konservuoti gaidžio eritrocitai (apie 0.36% w/v) buferyje. Darbinė koncentracija.				

Control	Cells	8.5ml	2x8.5ml	2x33ml
Konservuoti gaidžio eritrocitai (apie 0.36% w/v) buferyje. Darbinė koncentracija				

DIL	20ml	2X20ml	3 x 57ml
Diluentas - skiediklis. Specialiai parinktas triušio serumas (apie 0.4%) buferyje. Darbinė koncentracija.			

Control	+	1ml	1ml	9ml
Teigiama kontrolė. Praskiestas buferyje (1/20) serumas, kuriame yra antikūnų T. pallidum. Darbinė koncentracija.				

Control	-	1ml	1ml	9ml
Teigiama kontrolė. Praskiestas buferyje (1/20) serumas, kuriame nėra antikūnų T. pallidum. Darbinė koncentracija.				

LĄSTELIŲ LAŠINTUVAI	2	2	0
INSTRUKCIJA	1	1	1

REIKALINGOS, BET Į RINKINĮ NEĮEINANČIOS PRIEMONĖS

Rekomenduojama naudoti Dynex M24A mikrotitravimo plokštelės U-formos šulinėliais. Mikrotitravimo lašintuvai 25µl lašai nulašinti arba Micropipettes 10, 25, 75, 100µl and 190µl tūriams.
Pastaba: 75µl lašintuvai netinka ir su 850 testų rinkiniu netiekiami.

PERSPĖJIMAI

IMMUTREP TPHA reagentai yra žmogiškos kilmės. Pagal patvirtintą FDA metodikas patikrinta, kad jose nebūtų ŽIV ir ŽIV II, HbsAg ir HCV antikūnų. Vis dėlto joks testas negali visiškai užtikrinti, kad žmogaus kilmės medžiagose nėra infekcijos, todėl rekomenduojama visus reagentus naudoti ir išmesti kaip biologiskai pavojingus. Nepraryti

IMMUTREP TPHA reagentuose nėra pavojingų medžiagų, kurių naudojimą reglamentuotų Cheminių medžiagų naudojimo taisyklės. Tačiau visus reagentus reikia naudoti ir išmesti kaip biologiskai pavojingus. Reagentai galutinai išmetami, laikantis šalies įstatymų.
IMMUTREP TPHA reagentuose yra konservanto 0.095% natrio azido, kurio prarijus galima apsinuodyti. Natrio azidas gali reaguoti su vario ir švino vamzdžiais, sudarydamas sprogias druskas, todėl išpylus reikia jį nuplauti dideliu kiekiu vandens, kad nesikauptų vamzdyne

LAIKYMAS

Reagentai laikomi 2°C to 8°C temperatūroje vertikaliai. Rinkinyje atitinka specifikacijas nuo pagaminimo datos iki galiojimo laiko, nurodyto ant rinkinio ir jo komponentų pakuočių. Galiojimo terminas - paskutinė ant rinkinio ir buteliukų etiketė nurodyto mėnesio diena. Nenaudokite reagentų pasibaigus galiojimo laikui. Venkite laikyti reagentus aukštesnėje temperatūroje ar apšviestus tiesioginių saulės spindulių.

NEUŽŠALDYKITE REAGENTŲ. Užšaldyti reagentai visiškai sugadinami.

BANDINIO ĖMIMAS IR PARUOŠIMAS

Veninio kraujo ėminiai leidžiami sukrešėti. Sukrešėjusio kraujo bandinys centrifuguojamas ir surenkamas skaidrus serumas. Testui reikia šviežio serumo bandinių.

Paimamas paciento likvoro bandinys.

Nenaudokite hemolizuoto, užteršto ar lipeminio serumo ar plazmos, nes galite gauti klaidingus rezultatus.

Prieš testuojant serumą galima laikyti 2°C – 8°C temperatūroje 48 val. Jei prireikia laikyti ilgiau, bandiniai saugomi –20°C temperatūroje iki 1 metų. Prieš atliekant testą atšildytus bandinius reikia išmaišyti.

Neužšaldykite ir neatšildykite bandinių pakartotinai, nes galite gauti klaidingus rezultatus.

REAGENTŲ PARUOŠIMAS

Visiems reagentams leidžiama sušilti iki kambario temperatūros (20 °C - 25°C), prieš naudojant jės atsargiai išmaišomi. Neleiskite jiems supuoti.

Rinkinyje yra ląstelių lašintuvai testo ir kontrolinėms ląstelėms. Laisvai iš šio lašintuvo nukrentantis lašas yra 75µl tūrio. Į šiuos lašintuvus supilamos suspensijos: *į raudoną lašintuvą – Testo ląstelės*
į baltą lašintuvą – Kontrolinės ląstelės

APRIBOJIMAI

Testas nėra patvirtintas kitokio pobūdžio bandiniams, tik serumui ir likvorui.

Šiuo testu galima tirti tik serumo ir likvoro mėginius. Joks hemagliutinacijos testas negali atskirti antikūnus prieš *T. pallidum* nuo antikūnų, atsiradusių dėl *T. pertenuis* ir *T. carateum* infekcijos.

Jokie kiti interferuojantys nebuvo specifiskai identifiukuoti, tačiau teigiamus rezultatus reikia patvirtinti, pvz., FTA-Abs metodu ir papildyti klinikiniais įrodymais.

Nesama antrinio testo naudojimo protokolo.

Silpnai teigiami ar įtariami kaip teigiami rezultatai turi būti įvertinti papildomai. Neturėtų būti diagnozuojama remiantis tik vienu klinikiniu tyrimu. Interpretuojant testo rezultatus griežtai rekomenduojama atsižvelgti į visus klinikinius duomenis.

Testo rezultatas taip pat gali būti neigiamas ankstyvoje aktyvaus sifilio stadijoje ar vėlyvo latentinio sifilio atveju. Siekiant pateikti gydytojui padėsiant pilną tyrimų vaizdą, rekomenduojama atlikti VDRL/anglies dalelių antigeno ar RPR testą, kadangi jais galima nustatyti aktyvų sifilį. OMEGA gamina tam skirtus IMMUTREP VDRL, IMMUTREP CARBON ANTIGEN ir IMMUTREP RPR testus.

ANALIZĖS PROCEDŪRA

Visiems reagentams ir bandiniams leidžiama sušilti iki kambario temperatūros (20°C - 25°C) ir įsitikinama, kad reagentai visaiškai suspenduoti. Bandiams pirminio apdorojimo nereikia.

KOKYBINĖ (ATKRANKINĖ) PROCEDŪRA

Kiekvienam testui atlikti reikia 4 mikrotitravimo plokštėles šulinėlių.

1. Sulašinti skiedinį į mikrotitravimo lėkštelę tokia tvarka:

- Pirmoje eilėje - po 25 µl, antroje eilėje - po 100 µl, trečioje ir ketvirtoje eilėje - po 25 µl.

2. Sulašinti po 25 µl kiekvieno mėginio į pirmos eilės šulinėlį.

- Išmaišyti pirmos eilės šulinėlio turinį ir perkelti 25 µl į antrą eilę.
- Gerai išmaišyti ir perkelti 25 µl iš antros eilės į trečią.
- Gerai išmaišyti ir išmesti 25 µl iš trečio eilės.
- Perkelti 25 µl iš antros eilės į ketvirtą.
- Gerai išmaišyti ir išmesti 25 µl iš ketvirtos eilės.

3. 75 µl gerai išmaišytų kontrolinių ląstelių įšalinti į trečią eilę.

4. 75 µl gerai išmaišytų Testo ląstelių įšalinti į ketvirtą eilę.

Išmaišyti švelniai tapšnojančiomis plokštėlėmis.

5. Tokiu būdu trečioje ir ketvirtoje eilėse gaunamas serumo praskiedimas 1:80.

6. Plokštėles uždenkti ir palikti stovėti 45-60 min (arba gali būti paliktos pernakt).

7. Įvertinamas agliutinacijos vaizdas.

Pastaba: Rinkinio kontrolės yra jau praskiestos ir dedamos tiesiai į 3 ir 4 eilių šulinėlius (skiedinio nereikia).

ALTERNATYVUS VIENO ŠULINĖLIO PRASKIEDIMO PROTOKOLAS SKRININGUI.

1. Įlašinti 190 µl skiediklio į pirmą eilę
 2. Įlašinti 10 µl bandinio į 1 eilę ir išmaišyti
 3. Išmesti 150 µl iš 1 eilės šulinėlio (ų)
 4. Perkelti 25 µl iš pirmos eilės į antrą
 5. Įlašinti 75 µl gerai išmaišytų Testo ląstelių į pirmą eilę
 6. Įlašinti 75 µl gerai išmaišytų Kontrolinių ląstelių į antrą eilę
 7. Išmaišyti švelniai tapšnojančiomis plokštėlėmis.
- Tokiu būdu pirmos ir antros eilės šulinėliuose gaunamas serumo praskiedimas 1:80.
6. Plokštėles uždenkti ir palikti stovėti 45-60 min (arba gali būti paliktos pernakt).
 7. Įvertinamas agliutinacijos vaizdas.

KIEKYBINĖ PROCEDŪRA

Jeigu teigiami rezultatai kasdieniniame darbe yra papildomai tiriami kiekybiškai, atrankinio tyrimo procedūra gali būti modifikuojama: kontrolinės ląstelės nenaudojamos, ruošiamas tik galutinis serumo skiedinys. Dauguma bandinių bus neigiami arba aiškiai teigiami. Kontrolinės ląstelės gali būti naudojamos kiekybiniam įvertinimui. Metodas aprašytas žemiau.

1. Skiediniai paruošiami mikrotitravimo plokštėlėje taip:

- Kiekvienam bandiniui tirti įlašinti 25 µl skiediklio į kiekvieną šulinėlį viename plokštėlės šulinėlių stulpelyje. Kontrolinių titravimui skiediklis lašinamas nuo trečio eilės.
- 25 µl iš antros pirminės atrankos plokštėlės įlašinti į 1-ą kiekybinio testo plokštėlės eilutę.
- Sumaišyti ir 25 µl išmesti.
- 25 µl iš 2 atrankinės plokštėlės eilės perkelti į 2 kiekybinio tyrimo plokštėlės eilę.
- Paruošti nuoseklius dukartinius skiedinius 2 - 8 eilutėse perkeltiant 25 µl (Kontrolių skiedimas pradedamas nuo 3 eilutės).

2. Sulašinti 75 µl gerai išmaišytų kontrolinių ląstelių į pirmą eilutę.

3. Sulašinti po 75 µl gerai išmaišytų testo ląstelių į 2 - 8 eilutes.

Išmaišyti švelniai tapšnojančiomis plokštėlėmis

4. Tokiu būdu pirmoje ir antroje eilėse gaunamas serumo praskiedimas 1:80.

Pastaba: Rinkinio kontrolės jau praskiestos ir 25 µl jų lašinami tiesiai į 1, 2 ir 3 eilių šulinėlius, toliau perkus skiedžiami, pradedant nuo 3 eilutės. (1 ir 2 eilutes skiediklio įlašinti nereikia).

REZULTATAI IR INTERPRETACIJA

Rinkinio kontrolės arba žinomo lygio bandiniai turi būti tiriami kaskart atliekant testą. Rinkinio neigiamos kontrolės rezultatai turi būti neigiamas po 45 min. Rinkinio teigiamos kontrolės rezultatai turi būti teigiamas po 45 min. Jei kontrolių ar žinomo lygio bandinių rezultatai ne tokie, kokie turėtų būti, testo rezultatai laikomi negaliojančiais.

Atrankinė procedūra

Agliutinuotos ląstelės sudaro tolygų nuosėdų sluoksnį ant šulinėlio dugno. Neagliutinuotos ląstelės sudaro kompaktišką tablelę šulinėlio centre. Silpnai

agliutinuotos ląstelės nusėda šulinėlio dugne charakteringų žiedų. Testavimo ląstelių agliutinacija (bet ne kontrolinių ląstelių) rodo, kad mėginyje yra specifinių antikūnų prieš T. pallidum. Agliutinacijos nebuvimas rodo, kad antikūnų lygis yra žemiau šios sistemos nustatymo ribos. Nelyginkite kontrolinių ląstelių agliutinacijos vaizdą su tiriamojo serumo agliutinacijos vaizdą – kontrolinės ląstelės sudaro kompaktiškesnę ląstelių tablelę. Jei įvyksta ir kontrolinių ląstelių, ir testavimo ląstelių agliutinacija, tai rodo, kad yra antikūnų prieš pačias ląsteles. Tokiu atveju rezultatai anuluojami ir testas turi būti pakartotas.

Jei testas ir vėl nepavyksta, reikia pakartoti bandymą, prieš tai atlikus tiriamojo serumo absorbciją. Tam tiriamasis serumas praskiedžiamas 1/4 kontrolinėmis ląstelėmis ir paliekamas stovėti kambario temperatūroje 45-60 min. Po centrifugavimo (1000 aps./min., 5 min.) supunant praskiedžiamas 1/5 skiedikliu. Toks skiedinys testuojamas tiesiogiai, be kitų skiedimų, naudojant testavimo ląstelių ir kontrolinių ląstelių suspensijas. Taip pat rekomenduojama atlikti FTA-ABS testą.

Kiekybinė procedūra

Kaip ir atrankinėje procedūroje. Titras yra didžiausias praskiedimas, kuriame vyksta agliutinacija. Teigiamo kontrolinio serumo titras turi būti 1/2560 (+/- vienas praskiedimas). Pradinis praskiedimas kiekybiniam nustatymui yra 1:80.

IMMUTREP TPHA testu be prozonos (Hook) efekto yra pavykę nustatyti 1/164000 titrą.

REKOMENDACIJOS

Hemagliutinacijos testai yra jautrūs šilumai, tiesioginiams saulės spinduliams ir vibracijai. Venkite šių faktorių inkubacijos metu.

Venkite bandinių ir reagentų užteršimo seilėmis - dėl to galima gauti klaidingus rezultatus.

Kiekvienam bandiniui naudokite naują antgalį- taip išvengsite kryžminio užteršimo.

Iškart po naudojimo užsukite reagentų buteliukus.

Lašinkite reagentus tiesiai į šulinėlio dugną, neleiskite tekėti šulinėlio sienelėmis. Prieš testavimą leiskite reagentams sušilti iki kambario temperatūros (20°C - 25°C). Išmaišykite juos atsargiai sukdami ar vartydami buteliukus.

Testą gali atlikti darbuotojai, įgiję bent bazinį laboratorinį pasirengimą.

Nenaudokite apgadintų ar užterštų rinkinio komponentų.

Rinkinio komponentai yra suderinti ir skirtingų rinkinių komponentai neturėtų būti keičiami ir maišomi.

VERTINIMO DUOMENYS

Bandiniai buvo tiriami Europos Reference centru. Šie bandiniai gauti iš akušerijos klinikų, genitourinarių klinikų bei visuomenės sveikatos centrų.

	Teigiami bandiniai	Neigiami bandiniai	Viso
Syphilis teigiamas	203	3	206
Syphilis neigiamas	3	669	672
	206	672	878

Sis tyrimas rodo:

Jautrumas 98.5%

Specifškumas 99.6%

Atsikartojamumas IMMUTREP TPHA yra 100% (+/- vienas dukartinis praskiedimas).

LITERATŪRA

1. Tomizawa, T. and Kasamatsu, S. Jap. J. Med. Sci. Biol. 19, 305 (1966).
2. Rathlev, T., Brit. J. Vener. Dis., 43, 181 (1967).
3. Tringali, G., Ann. Sc. Pav., 12, 311 (1970).
4. Uete, T., Fukazawa, S., Ogi, K. and Takeuchi, Y., Brit., J. Vener. Dis., 47, 73 (1971)
5. Garner, M.F., Backhouse, J. L., Daskalopoulos, G. and Walsh, J.L., 48, 474 (1972)
6. Johnston, N.A., Brit. J. Vener. Dis. 1972, 48, 474 (1972)
7. Sequeira, P.J.L. and Eldridge, A. E., Brit. J. Vener. Dis. 43, 242 (1973)
8. Lensinski, J., Krach, J. and Kadziewicz, E., Brit. J. Vener. Dis. 50, 33 (1974)
9. O'Neill, P., Warner, R.W. and Nicol, C.S., Brit. J. Vener. Dis. 49, 427 (1973)
10. Young, H., Henrichsen, C. and Robertson, D.H.H., Brit. J. Vener. Dis. 50, 341 (1975)

8010 Issue 5A Revised May 2015.

© Omega Diagnostics Ltd 2015.



OMEGA DIAGNOSTICS LTD
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva, FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 & 13485 CERTIFIED COMPANY