|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **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 kardiolipiną 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 štamas). 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 antigenu. 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.    **REZULTATAI**   |  |  |  | | --- | --- | --- | | **REZULTATAI** | **TESTO LĄSTELĖS** | **KONTROLINĖS LĄSTELĖS** | | Stipriai teigiamas | Pilnai ląstelėmis pasidengęs šulinėlio dugnas | Nėra agliutinacijos | | Silpnai teigiamas | Ląstelės dengia apytiksliai 1/3 šulinėlio dugno | Nėra agliutinacijos | | Nenustatytas | Ląstelių sluoksnio fone aiškiai atviras centras | Nėra agliutinacijos | | Neigiamas | Ląstelės kompaktiškai pasiskirsto ant dugno su tipišku mažu švariu centru. | Nėra agliutinacijos | | Nespecifinis\* | Teigiama reakcija | Teigiama reakcija |   **Nespecifinė absorbcija\***  1. Į mažą mėgintuvėlį įpilkite 10 μl, tada pridėkite 190 μl kontrolinių ląstelių. Sumaišykite gerai ir palikite pastovėti 30 minučių.  2. 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 reaginus arba FTA-ABS.  Nors TPHA testas yra labai specifiškas, klaidingai teigiami rezultatai gali pasireikšti pacientams, sergantiems raupsais, infekcinėmis ligomis, esant mononukleozei ir jungiamojo audinio sutrikimams. Patvirtinimui turėtų būti naudojamas FTA-ABS testas.  **REZULTATŲ VERTINIMAS**  **Stipriai teigiama** reakcijagali rodytiužsilenkimus ląstelių fono kraštuose. Kai testas gaunamas teigiamas, reikia stebėti kontrolinį šulinėlį. Kontrolinės ląstelės turėtų glaudžiai nusėsti ant dugno. Jos neturėtų būti lyginamos su nereaktyviom serumo struktūrom, nes kontrolinės ląstelės sudarys labiau kompaktišką struktūrą nei tyrimo ląstelės.  **Silpna teigiama** reakcija gali parodyti, kad nėra pilno ląstelių pasidengimo ant šulinėlio dugno.  **NETEISINGAS** rezultatas gali parodyti agliutinaciją kontroliniame šulinėlyje, kas rodo mėginių nespecifinių agliutininų buvimą. Serumas, dėl kurio gaunamas šis rezultatas gali būti absorbuotas naudojant kontrolines ląsteles, apibūdinant kaip nespecifinę absorbciją.  **NENUSTATOMAS** rezultatas gali parodyti abejotiną reakciją su tyrimo ląstelėmis. Rezultatas gali rodyti žemą antikūnų lygį esant pradiniam pirminiam sifiliui. | **MEDŽIAGOS**  **PATEIKTOS RINKINYJE MEDŽIAGOS**  •Tyrimo ląstelės; konservuoti paukščių eritrocitai, padengti T.pallidum antigenu.  •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, vertikalioje 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 nepraėjo 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. * Ilgalaikiam saugojimui serumai turėtų būti laikomi -20°C temperatūroje. Venkite bet kokio užterštumo seilėmis. Tai sukels teigiamus klaidinančius rezultatus.   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 ląsteles, 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 neįtakojo (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. Houng 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. | **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 perkelkite 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.  **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** |