

MIKROTITER LEMEZ HEMAGGLUTINÁCIÓS KÉSZLET
HASZNÁLATI ÚTMUTATÓ

TPHA Mikrotiter lemez készlet: A *Treponema pallidum* kvalitatív meghatározására

ÖSSZEFOGLALÁS

A szifilisz egy úton terjedő betegség, amit a *Treponema pallidum* spirochaeta mikroorganizmus okoz. Ezt a mikroorganizmust nem lehet mesterséges tápközegben tenyészteni, így a szifilisz diagnózisa a klinikai adatok, valamint szerológiai tesztek által kimutatott specifikus antitestek egymáshoz való viszonyától függ. A szifilisz kimutatására két különböző technikát alkalmaznak. A TPHA tesztek a *Treponema pallidum* elleni antitesteket mutatják ki, a nem *Treponema*-specifikus szerológiai tesztek pedig egy reagin nevű, antitestszerű anyagot mutatnak ki a fertőzött személyeknél.

FELHASZNÁLÁSI TERÜLET

A reagens egy olyan latex tesztreagens, amelynek rendeltetése a *T. pallidum* elleni antitestek jelenlétének vagy hiányának kvalitatív és szemikvantitatív meghatározása a betegek vérszérumból vagy -plazmájából, a jelen használati útmutatóban ismertetett, ajánlott technikákkal történő vizsgálat mellett.

ALAPELV

A TPHA (*Treponema pallidum* hemagglutináció) közvetett hemagglutinációs teszt a humán szérumban lévő, specifikus *T. pallidum* elleni antitestek kvalitatív és szemikvantitatív kimutatására. Az antigén *T. pallidum* oldattal szenzitizált, stabilizált, madarakból származó eritrociták a *T. pallidum* antitestek jelenlétében kicsapódnak, és jellegzetes mintázatot mutatnak. Az agglutináció hiánya általában az antitestek hiányát jelzi (lásd a **Korlátok** című részt).

A KÉSZLET LEÍRÁSA

A Lorne TPHA készlet a *T. pallidum* elleni antitesteket mutatja ki. A teszt sejtei a patogén *T. pallidum* (Nichol-féle törzs) antigénkomponenseivel bevont, tartósított, madarakból származó eritrociták. A nem specifikus reakciókat a kontrollsejtek segítségével mutatják ki; ezek *T. pallidum* antigénbevonattal nem rendelkező, madarakból származó eritrociták. A nem specifikus reakciók a kontrollsejtek használatával is kiszűrhetők. A nem patogén *Treponemák* elleni antitesteket a Reiter-féle *Treponema* extraktummal lehet abszorbeálni a sejtszuspenzióban. A reagens nem tartalmaz CMR (rákkeltő, mutagén vagy reprodukciót károsító) anyagokat, endokrin rendszert károsító anyagokat, illetve olyan anyagokat, amelyek a felhasználónál szenzibilizációt vagy allergiás reakciót okozhatnak. A reagens az ajánlott technikákkal való használathoz optimális hígításban biztosítottak, hígítást vagy kiegészítést nem igényelnek. A tétel referenciaszámát és lejárat dátumát lásd az **üveg címkéin**.

TÁROLÁS

Nem fagyasztható. A reagensüvegeket a kézhezvételüket követően 2–8 °C-on kell tárolni. A megadott hőmérséklet-tartományon kívüli, hosszabb ideig történő tárolás felgyorsíthatja a reagens reakcióképességének elvesztését. Az üvegeket álló helyzetben kell tárolni. Vízszintes helyzetben az R1 és R2 reagensekben sejtaggregátumok alakulhatnak ki. Ha ez történik, keverje fel óvatosan, de alaposan az üvegek tartalmát, hogy az aggregátumok megszűnjenek.

MINTÁK

Friss vérszérum vagy -plazma. 2–8 °C-on 8 napig, illetve –20 °C-on legfeljebb 3 napig stabil.
A fibrint tartalmazó mintákat tesztelés előtt centrifugálni kell. Ne használjon erősen hemolízises vagy lipémiás mintákat.

ÓVINTÉZKEDÉSEK

1. A készlet kizárólag *in vitro* diagnosztikai felhasználásra szolgál.
2. Ne használja a készletet a lejárat dátumot követően (lásd az **üveg és a doboz címkéit**).
3. A reagens kezeléskor védőruházatot, például eldobható kesztyűt és laboratóriumi köpenyt kell viselni.

4. A biológiai terhelés csökkentése érdekében a készlet reagensait feldolgozták, de azok nem sterilen biztosítottak. Az üveg felnyitása után a tartalomnak a lejárat dátumig működőképesnek kell maradnia.
5. Egyetlen ismert vizsgálat sem tudja garantálni, hogy az emberi vagy állati eredetű termékek fertőző ágensektől mentesek. Az üvegek és azok tartalmának használatakor és ártalmatlanításakor óvatosan kell eljárni.

A KÉSZLET REAGENSEINEK ÁRTALMATLANÍTÁSA ÉS A KIÖMLÖTT ANYAGOK KEZELÉSE

A készlet reagensinek ártalmatlanításával és a kiömléssel érintett terület szennyeződésmegszüntetésevel kapcsolatos információkat lásd a kérésre rendelkezésre álló **anyagbiztonsági adatlapokban**.

KONTROLLK ÉS TANÁCSOK

1. Javasolt az egyes vizsgálati tételekkel párhuzamosan egy TPHA pozitív és egy negatív kontroll vizsgálatát. A vizsgálatokat érvénytelennek kell tekinteni, ha a kontrollk nem a várt eredményeket mutatják.
2. Minden reagenst hagyni kell, hogy felhasználás előtt elérje a 18–25 °C hőmérsékletet.
3. Felhasználás előtt keverje össze óvatosan, de alaposan az üvegek tartalmát.
4. Kerülje a reagens vagy a szérum nyállal való beszennyezését, mert ez a mintákban hamis pozitív eredményeket okoz.
5. Ne cserélje meg a komponenseket a különböző készletek között.
6. A készlet használatát és az eredmények értelmezését megfelelően képzett és képesített személyzetnek kell végeznie annak az országnak a követelményeivel összhangban, ahol a készletet használják, és a felhasználónak kell meghatároznia a készlet más technikákban való felhasználásra való alkalmasságát.

A KÉSZLETTEL BIZTOSÍTOTT KOMPONENSEK

- 1) R1: Tesztsejtek (sárga kupak, 1x7,5 ml): *T. pallidum* (Nichols) antigénnel szenzitizált, stabilizált, madarakból származó eritrociták, tartósítószer, pH 7,2.
- 2) R2: Kontrollsejtek (zöld kupak, 1x7,5 ml): Stabilizált, madarakból származó eritrocita sejtszuspenzió, tartósítószer, pH 7,2.
- 3) R3: TPHA hígítóoldat (fehér kupak, 2x10 ml): Foszfát-pufferrel sóoldat, pH 7,2, *T. pallidum* (Reiter) extraktum, tartósítószer.
- 4) Pozitív kontroll (piros kupak, 1x1 ml): Immun humán szérum, 1:20 előhígítással, tartósítószer.
- 5) Negatív kontroll (kék kupak, 1x1 ml): Állati szérum, tartósítószer.

SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK ÉS FELSZERELÉSEK

- a) Pontos pipetták.
- b) „U” alakú mélyedésekkel rendelkező mikrotiter lemezek.

KVALITATÍV TECHNIKA

1. Hagyja, hogy a reagens és a minta elérjék a szobahőmérsékletet.
2. Felhasználás előtt rázza össze óvatosan, de alaposan a tesztsejtes és a kontrollsejtes üvegek tartalmát.
3. Hígítsa a mintát 1:20-ra a hígítóoldat felhasználásával (10 µl szérum + 190 µl hígítóoldat [R3]).
4. Pipettázza az alábbiakat a mikrotiter lemez szomszédos mélyedéseibe:

	Teszt mélyedés	Kontroll mélyedés
1:20 hígítású minta; illetve kontroll*	25 µl	25 µl
Kontrollsejtek	–	75 µl
Tesztsejtek	75 µl	–

*Minden egyes pozitív kontrollhoz vagy negatív kontrollhoz vagy betegmintához egyenként 1 teszt mélyedés és 1 kontroll mélyedés szükséges.

5. Keverje össze alaposan a mikrotiter lemez tartalmát, amíg homogén sejt/minta nem keletkezik.
6. Takarja le a mikrotiter lemezt, és inkubálja szobahőmérsékleten 45–60 percig. Óvja a mikrotiter lemezt a vibrációktól, hőtől és közvetlen napfénytől.
7. Vizsgálja meg a sejtek makroszkópos agglutinációs mintázatát.

SEMIVANTITATÍV TECHNIKA

1. Minden minta esetében 8 mélyedés szükséges a mikrotiter lemezen, ezek jelölése A–H.
2. Tegyen 25 µl hígítóoldatot a B–H mélyedésekbe.
3. Vigyen 25 µl 1:20 arányban hígított mintát (lásd fentebb a **Kvalitatív technika** című részt) az A és a B mélyedésbe.
4. Vegyen ki 25 µl hígított mintát a B mélyedésből, és végezzen kétszeres hígításokat a B mélyedéstől a H mélyedésig, majd dobjon ki 25 µl hígított mintát a H mélyedésből.
5. Adjon 75 µl tesztsejtet az A–H mélyedésekhez.
6. Rázza óvatosan a mikrotiter lemezt, hogy alaposan összekeveredjen a tartalma.
7. Takarja le a mikrotiter lemezt, és inkubálja szobahőmérsékleten 45–60 percig. Óvja a mikrotiter lemezt a vibrációktól, hőtől és közvetlen napfénytől.
8. Vizsgálja meg a sejtek makroszkópos agglutinációs mintázatát.

AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

Olvassa le az eredményeket úgy, hogy összehasonlítsa a tesztsejtek és a kontrollsejtek által adott agglutinációs mintázatokat. A leolvasott eredményeket az alábbi kritériumok szerint kell pontozni és leletezni:

Hemagglutináció foka	Leolvasott eredmény	Eredmény
Sima sejtcsőnyeg fedi a mélyedés teljes alját esetenként behajló szélekkel	4+	Reaktív
Sima sejtcsőnyeg fedi a mélyedés aljának egy részét	3+	Reaktív
Sima sejtcsőnyeg, amit egy piros körvonal határol	2+	Reaktív
Sima sejtcsőnyeg kisebb területen, kisebb piros körvonallal	1+	Reaktív
Sejtfolt, kicsi lyukkal a közepén	±	Határeset
Határozottan kompakt sejtfolt, néha nagyon kicsi lyukkal a közepén	–	Negatív

AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

1. A negatív kontrollban nem lehet semmilyen agglutinációs mintázat sem a tesztsejtek, sem a kontrollsejtek alkalmazása mellett.
2. A pozitív kontroll csak a tesztsejtekénél mutathat agglutinációs mintázatokat.
3. A kontrollsejtek esetében látható bármilyen agglutinációs mintázat nem specifikus antitestek jelenlétét mutatja, és nem értelmezhető.
4. A mintázati határesetet mutató mintákat újra kell vizsgálni, és ha ismét ilyen mintázat látható, akkor negatívként kell leletezni.
5. A reaktív mintákat titrálni kell a semikvantitatív technikában szereplő, fenti leírás szerint. A szérumszám a meghatározás szerint az a legnagyobb hígítás, ami reaktív eredményt mutat.
6. A klinikai diagnózist nem szabad egyetlen teszt eredménye alapján felállítani, hanem együttesen kell értelmezni a klinikai és a laboratóriumi adatokat.

KORLÁTOK

1. Ez a készlet nem képes elkülöníteni a szifilisz és más patogén *Treponemák* által okozott fertőzéseket, például a frambóziát (yaws), így mindig figyelembe kell venni a klinikai bizonyítékokat is. Javasolt minden pozitív eredmény más módszerrel, például FTA-ABS technikával is megerősíteni.
2. A Lorne TPHA szifilisz készlet rendkívül specifikus, de hamis pozitív eredményeket írtak le mononukleózisban, leprában,

borreliózisban és autoimmun betegségben szenvedő, valamint gyógyszerfüggő betegek mintái esetében.

3. A TPHA teszt nem alkalmas a kezelés hatásosságának meghatározására, mivel az antitestszint időnként megmarad (és pozitív teszt eredményt ad) a betegség klinikai gyógyulása után is.
4. Hamis pozitív vagy hamis negatív eredmények lehetnek láthatók a következők miatt:
 - A vizsgálati anyagok szennyeződése
 - A vizsgálati anyagok nem megfelelő tárolása vagy a reagens kihagyása
 - Az ajánlott technikáktól való eltérés

SPECIÁLIS TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

1. A készlet jellemzőit az **ajánlott technikákat** ismertető részben közölt eljárások szerint határozták meg.
2. Forgalomba hozatal előtt a Lorne TPHA szifilisz készlet minden tételét megvizsgálják az **ajánlott technikák** alkalmazásával, hogy biztosítsák a megfelelő reaktivitást.
3. A bilirubin (≤ 20 mg/dl), hemoglobin (≤ 10 g/l), lipidek (≤ 10 g/l) és reumatoid faktorok (≤ 300 NE/ml) nem okoznak interferenciát. Előfordulhat, hogy más anyagok interferenciát okoznak.⁶
4. **Analitikai érzékenység:** 0,1 NE/ml, a „1st International Standard for human syphilitic plasma IgG and IgM” című dokumentum (NIBSC kód: 05/132) szerint vizsgálva.
5. **Prozóna effektus:** Nem figyeltek meg prozóna effektust $\geq 1/163.840$ titerig.
6. **Diagnosztikai érzékenység:** 100%.
7. **Diagnosztikai specifitás:** 100%.

NYILATKOZAT

1. A felhasználó felelős a reagensek teljesítményéért, ha azokat az **ajánlott technikákat** ismertető részben említettekől eltérő technikákkal használják.
2. Az esetleges eltéréseket a használat előtt megalapozott laboratóriumi eljárásokkal validálni kell.

IRODALOMJEGYZÉK

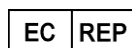
1. David S.Jacobs et al. Laboratory Test Handbook, 3rd edition, Lexi-Comp Inc, 1994.

RENDELKEZÉSRE ÁLLÓ KÉSZLETMÉRETEK

Készletméret	Katalógusszám
100 teszt/készlet	043100A



Lorne Laboratories Limited
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate
Danehill
Lower Earley
Berkshire, RG6 4UT
Egyesült Királyság
Telefon: +44 (0) 118 921 2264
Fax: +44 (0) 118 986 4518
E-mail: info@lornelabs.com



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Flr.,
Tower Street, Swatara, BKR 4013, Málta