



MIKROTRAVIMO PLOKŠTELĖS HEMAGLIUTINACIJOS RINKINYS
NAUDOJIMO INSTRUKCIJOS

„TPHA“ mikrotitravimo plokštelės rinkinys: kokybiniam *Treponema pallidum* nustatymui.

SANTRAUKA

Sifilis yra venerinė liga, kurią sukelia mikroorganizmas spirocheta *Treponema pallidum*. Kadangi šio mikroorganizmo negalima išauginti dirbtinėse terpėse, sifilio diagnostika grindžiama klinikinių duomenų koreliavimu su serologinių testų, skirtų aptikti specifiniams antikūnams, rezultatais. Sifiliui aptikti taikomi du skirtingi metodai. TPHA testai, skirti aptikti antikūnams *Treponema pallidum*, ir su treponemomis nesusiję serologiniai testai, skirti užsikrėtusių asmenų organizme aptikti į antikūnus panašiai medžiagai, vadinamai reagu.

NUMATYTOJI PASKIRTIS

Reagentas yra latekso testo reagentas, skirtas naudoti kokybiniam ir pusiau kiekybiniam testui paciento serume ar plazmoje siekiant aptikti antikūnus *T. pallidum*, testą atliekant šiose naudojimo instrukcijose rekomenduojamais metodais.

PRINCIPAS

TPHA (*Treponema pallidum* hemagliutinacijos testas) yra netiesioginės hemagliutinacijos testas, skirtas kokybiniam ir pusiau kiekybiniam testui žmogaus serume aptikti specifinius antikūnus *T. pallidum*. Stabilizuoti paukščių eritrocitai jautrinti *T. pallidum* antigenų tirpalu, reaguodami su antikūnais *T. pallidum* agliutinauoja sudarydami būdingos struktūros agliutinacijos nuosėdas. Agliutinacijos (sulipimo) nebuvimas reiškia, kad antikūnų nėra (žr. **Ribojimai**).

RINKINIO APRAŠYMAS

„Lorne“ TPHA rinkinys skirtas aptikti antikūnams *T. pallidum*. Testo ląstelės yra konservuoti paukščių eritrocitai, padengti patogeninių *T. pallidum* (Nichol padermės) antigenų komponentais. Visos nespecifinės reakcijos aptinkamos naudojant kontrolines ląsteles paukščių eritrocitus, kurie *T. pallidum* antigenais nepadengti. Nespecifinės reakcijos taip pat gali būti absorbuojamos naudojant kontrolines ląsteles. Antikūnai nepatogeninėms treponemoms absorbuojami ląstelių suspensijoje naudojant Reiterio padermės treponemų ekstraktą. Reagentų sudėtyje nėra CMR (kancerogeninių, mutageninių ar toksiškų reprodukcijai) medžiagų ar endokrininę sistemą ardančių medžiagų, kurios galėtų jautrinti naudotoją ar sukelti jam alerginių reakcijų. Reagentas tiekiamas tinkamai praskiestas naudoti taikant toliau nurodytus rekomenduojamus metodus, jų skiesti ar papildyti nereikia. Gaminio serijos numeris ir tinkamumo naudoti pabaigos data nurodyta **buteliuko etiketėje**.

LAIKYMAS

Visi rinkinio komponentai yra stabilūs iki ant etiketės nurodytos tinkamumo naudoti datos, jei laikomi sandariai uždaryti 2–8 °C temperatūroje ir naudojant apsaugoti nuo teršalų. Neušaldyti: reagentus užšaldžius, gali pakisti funkcinės testo ypatybės. Buteliukus laikykite vertikaliaje padėtyje. Laikant horizontalioje padėtyje gali susidaryti ląstelių sankaupų. Pasikeitus padėčiai, švelniai sumaišykite, kad susidariusios sankaupos išsisklaidytų. Reagentų irimas: sankaupų, dalelių ir drumstumo atsiradimas.

BANDINIAI

Šviežias serumas ar plazma. Laikant 2–8 °C temperatūroje stabilūs 8 paras arba 3 mėnesius laikant –20 °C temperatūroje. Mėginius, kuriuose yra fibrino, prieš tiriant reikia centrifuguoti. Nenaudokite mėginių, kuriuose matoma didelė hemolizė ar lipemija.

ATSARGUMO PRIEMONĖS

1. Šis rinkinys skirtas tik diagnostikai *in vitro*.
2. Pasibaigus tinkamumo naudoti laikui, rinkinio nenaudokite (žr. **buteliuko ir dėžutės etiketes**).
3. Tvarkant reagentus reikia vilkėti apsauginius drabužius, pavyzdžiui, mūvėti vienkartinės pirštines ir dėvėti laboratorinį apsiaustą.

4. Reagentai buvo apdoroti siekiant sumažinti biologinę taršą, tačiau tiekiami nesterilūs. Atidarius buteliuką jo turinys tinkamas naudoti iki tinkamumo naudoti datos.
5. Jokie testai negali užtikrinti, kad iš žmogaus ar gyvūninės kilmės medžiagų pagamintuose produktuose nėra infekcinių ligų sukėlėjų. Naudojant ir šalinant kiekvieną buteliuką bei jo turinį reikia būti atsargiems.

RINKINIO REAGENTŲ ŠALINIMAS IR IŠSLIEJUSIŲ MEDŽIAGŲ TVARKYMAS

Informacijos, kaip šalinti reagentus ir nukenksminti vietą, kurioje išsiliejo medžiagos, pateikiama **Medžiagos saugos duomenų lapuose**, o jie pateikiami paprašius.

KONTROLĖ IR PATARIMAI

1. Kartu su kiekviena testų partija rekomenduojama atlikti TPHA teigiamos ir neigiamos kontrolės testus. Jeigu tiriant kontrolinius mėginius laukiamų testo rezultatų negaunama, testų rezultatai laikomi nevertinamais.
2. Prieš naudojant visiems reagentams reikia leisti sušilti iki 18–25 °C temperatūros.
3. Neužterškite reagentų serumu ar seilėmis, nes dėl to tiriant mėginius galimi klaidingai teigiami rezultatai.
4. Negalima sukeisti skirtingų partijų rinkinių komponentų.
5. Rinkinį naudoti ir rezultatus vertinti turi tinkamai išmokyti ir kvalifikuoti darbuotojai, laikydami šalies, kurioje rinkinys naudojamas, reikalavimų, o naudotojas privalo nustatyti, ar rinkinys tinkamas naudoti kitais metodais.

TIEKIAMI RINKINIO KOMPONENTAI

- 1) R1: testo ląstelės (geltonas kamštelis, 1 x 7,5 ml): stabilizuoti paukščių eritrocitai, jautrinti *T. pallidum* (Nichols padermės) antigenais, konservantas, pH 7,2.
- 2) R2: kontrolinės ląstelės (žalias kamštelis, 1 x 7,5 ml): stabilizuota paukščių eritrocitų suspensija, konservantas, pH 7,2.
- 3) R3: TPHA skiediklis (baltas kamštelis, 2 x 10 ml): fiziologinis tirpalas fosfatiniame buferyje, pH 7,2, *T. pallidum* (Reiter) ekstraktas, konservantas.
- 4) Kontrolė (raudonas kamštelis, 1 x 1 ml): žmogaus imuninis serumas, praskiestas 1:20, konservantas.
- 5) Kontrolė (mėlynas kamštelis, 1 x 1 ml): gyvūnų serumas, konservantas.

REIKALINGOS, BET NETIEKIAMOS MEDŽIAGOS IR REAGENTAI

- a) Tikslios pipetės.
- b) U formos šulinėlių mikrotitravimo plokštelės.

KOKYBINIS METODAS

1. Reagentams ir mėginiui leiskite sušilti iki patalpos temperatūros.
2. Švelniai, bet kruopščiai prieš pat naudodami supurtykite testo ir kontrolinių ląstelių buteliukus.
3. Skiedikliu (10 µl serumo + 190 µl skiediklio (R3)) santykiu 1:20 praskieskite mėginį.
4. Į gretimas mikrotitravimo plokštelės duobeles pipete sulašinkite:

	Testo duobelė	Kontrolės duobelė
Mėginys 1:20 arba kontrolė*	25 µl	25 µl
Kontrolinės ląstelės	--	75 µl
Testo ląstelės	75 µl	--

- *Kiekvienam tiriamam teigiamos ar neigiamos kontrolės ar tiriamam paciento bandiniui reikia 1 testo duobelės ir 1 kontrolinės duobelės.
5. Kruopščiai išmaišykite mikrotitravimo plokštelę, kol gausite homogeniškus ląstelių (mėginio) bandinius.

- Mikrotravimo plokštelę uždenkite ir 45–60 min. laikykite patalpos temperatūroje. Mikrotravimo plokštelę saugokite nuo vibracijos, karščio ir tiesioginių saulės spindulių.
- Makroskopiškai įvertinkite ląstelių agliutinacijos struktūrą.

PUSIAU KIEKYBINIS METODAS

- Vienam mėginiui mikrotravimo plokštelėje reikia 8 duobelių, paženklinūtų nuo A iki H.
- Į duobes nuo B iki H įskaitytinai įlašinkite 25 µl skiediklio.
- Į A ir B duobes įlašinkite 25 µl mėginio, praskiesto santykiu 1:20, kaip aprašyta pirmiau skyriuje **Kokybinis metodas**.
- Iš B duobelės paimkite 25 µl praskiesto mėginio ir į duobes nuo B iki H paruoškite dvigubus skiedinius, iš H duobelės 25 µl praskiesto mėginio pašalinkite.
- Į duobes nuo A iki H įskaitytinai pridėkite 75 µl testo ląstelių.
- Švelniai supurtykite mikrotravimo plokštelę ir kruopščiai sumaišykite turinį.
- Mikrotravimo plokštelę uždenkite ir 45–60 min. laikykite patalpos temperatūroje. Mikrotravimo plokštelę saugokite nuo vibracijos, karščio ir tiesioginių saulės spindulių.
- Makroskopiškai įvertinkite ląstelių agliutinacijos struktūrą.

REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

Rezultatus vertinkite palygindami testo ląstelių ir kontrolinių ląstelių agliutinacijos struktūrą. Vertinama balais vadovaujantis toliau išvardytais kriterijais:

Hemagliutinacijos laipsnis	Vertinimas	Rezultatas
Lygus ląstelių sluoksnis, dengiantis visą duobelės dugną, kartais su užsiritusiais kraštais	4+	Reaktyvus
Lygus ląstelių sluoksnis, dengiantis dalį duobelės dugno	3+	Reaktyvus
Lygus ląstelių sluoksnis, apjuostas raudono žiedo	2+	Reaktyvus
Lygus ląstelių sluoksnis, dengiantis mažesnę plotą ir apjuostas mažesnio raudono žiedo	1+	Reaktyvus
Ląstelių sankaupa su maža skylute centre	±	Ribinis
Akivaizdi kompaktiška ląstelių sankaupa kartais su labai maža skylute centre.	-	Neigiamas

REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

- Neigiama kontrolė su testo ląstelėmis ir kontrolės ląstelėmis turi nereaguoti.
- Teigiama kontrolė turi sukelti atitinkamos struktūros agliutinaciją tik su testo ląstelėmis.
- Bet kokia agliutinacija su kontrolinėmis ląstelėmis rodo nespecifinių antikūnų buvimą, todėl rezultatų vertinti negalima.
- Mėginius, kurių agliutinacija buvo panaši į ribinės struktūros agliutinaciją, reikia iširti pakartotinai; gavus tokį pat rezultatą jis turi būti vertinamas kaip neigiamas.
- Reaktyviuosius mėginius reikia titruoti vadovaujantis pirmiau pateiktu pusiau kiekybinio metodo aprašymu. Serumo titras apibūdinamas didžiausiu praskiedimu, su kuriuo gautas teigiamas rezultatas.
- Diagnozės nustatyti nederėtų remiantis vieno testo rezultatais, klinikiškus ir laboratorinius duomenis reikėtų vertinti kartu.

APRIBOJIMAI

- Šiuo rinkiniu sifilio negalima atskirti nuo kitų patogeninių treponemų sukeltų infekcijų, pvz., frambezijos, todėl visada reikia atsižvelgti į klinikiškus įrodymus. Visus teigiamus rezultatus rekomenduojama patvirtinti alternatyviuoju metodu, pvz., FTA-ABS.
- „Lorne“ TPHA sifilio rinkinys yra labai specifiškas, tačiau tiriant mononukleozę, raupsais, boreliozę, autoimuninėmis ligomis sergančių ir nuo narkotikų priklausomų asmenų mėginius gauta klaidingai teigiamų rezultatų.
- TPHA testas nenaudingas vertinant gydymo efektyvumą, nes kartais kliniškai pasveikus išlieka tam tikras antikūnų kiekis (galintis lemti teigiamą testo rezultatą).
- Klaidingai teigiami ar klaidingai neigiami rezultatai gali būti gauti, jei:
 - testo medžiagos yra užterštos,
 - tiriamosios medžiagos laikomos netinkamai ar neįlašintas reagentas,

- nesilaikoma rekomenduojamų metodų.

SPECIALIOSIOS TESTO CHARAKTERISTIKOS

- Rinkinys buvo apibūdinamas atliekant skyriuje **Rekomenduojami metodai** minimas procedūras.
- Siekiant užtikrinti tinkamą reaktyvumą prieš išleidžiant kiekvieną „Lorne“ TPHA sifilio rinkinio seriją tiriama **rekomenduojamais metodais**.
- Bilirubinas (≤ 20 mg/dl), hemoglobinas (≤ 10 g/l), lipidai (≤ 10 g/l) ir reumatoidiniai veiksniai (≤ 300 IU/ml) trikdžių nesukelia. Kitos medžiagos gali trukdyti¹.
- Analizinis jautris: 0,1 TV/ml, tiriant laikantis 1-ojo žmogaus sifilitinės plazmos IgG ir IgM tarptautinio standarto, Nacionalinio biologinių standartų ir kontrolės instituto (INIBSC) kodas 05/132.
- Prozono efektas:** iki titro $\geq 1/163840$ prozono efektas neužregistruotas.
- Diagnostinis jautris:** 100 %
- Diagnostinis specifiskumas:** 100 %

ATSAKOMYBĖS RIBOJIMAS

- Tais atvejais, jei testas atliekamas taikant kitus metodus, nei nurodyta skyriuje **Rekomenduojami metodai**, už reagentų veikimą atsako naudotojas.
- Prieš taikant nustatytas laboratorines procedūras reikia validuoti visus nuokrypius

LITERATŪRA

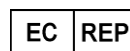
- David S.Jacobs et al. Laboratory Test Handbook, 3rd edition, Lexi-Comp Inc, 1994.

TIEKIAMŲ REAGENTŲ DYDŽIAI

Rinkinio dydis	Katalogo numeris
Rinkinys skirtas 100 testų	043100A



„Lorne Laboratories Limited“
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate
Danehill
Lower Earley
Berkshire, RG6 4UT
Jungtinė Karalystė
Tel. +44 (0) 118 921 2264
Faks. +44 (0) 118 986 4518
El. paštas info@lornelabs.com



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Fl.,
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta