

IMMUTREP® TPHA **Ref** OD221/ OD071/ OD081

Odczyn hemaglutynacji biernej do serologicznej diagnostyki kłty. Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ. Do diagnostyki "in vitro".

WPROWADZENIE I PRZEZNACZENIE

Kłta jest chorobą przenoszoną drogą kontaktów seksualnych. Mikroorganizmem wywołującym chorobę jest pateczka *Treponema pallidum*. Dotychczas nie udało się uzyskać hodowli krętka bladego na podłożach bakteriologicznych lub w hodowlach tkankowych.

Infekcję wykrywa się poprzez identyfikację specyficznych dla *T.pallidum* przeciwciał w surowicy lub płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF) chorego. Przeciwciała są wykrywane w 3-4 tygodniu od zakażenia i pozostają na wykrywalnym poziomie długi czas po wyleczeniu.

Wyróżniamy dwa rodzaje przeciwciał:

1. przeciwciała wchodzące w reakcję z antygenami nieswoistymi wykrywane przy użyciu testów VDRL lub RPR,
2. przeciwciała wchodzące w reakcję z antygenami swoistymi, tzn. antygenami krętkowymi.

Przeciwciała skierowane przeciwko antygenom nieswoistym są obecne w trakcie aktywnej toczącej się choroby i zanikają po wyleczeniu pacjenta. Przeciwciała skierowane przeciwko antygenom swoistym utrzymują się przez długi czas po wyleczeniu.

Zaleca się wykonywanie testów serologicznych nieswoistych i swoistych, ponieważ metody nieswoiste mogą dawać odczyn biologicznie mylne.

IMMUTREP TPHA jest swoistym odczynem hemaglutynacji biernej do wykrywania przeciwciał przeciwko *T.pallidum* w surowicy krwi lub płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF).

Do użytku w laboratorium.

ZASADA TESTU

IMMUTREP TPHA zawiera zawieszony antygen *T.pallidum* opłaszczony utrwalonymi erytrocytami płasmi, rozcieńczalnik oraz surowice kontrolne. Po zmieszaniu rozcieńczonych próbek badanych – pozytywnych, z uczulonymi erytrocytami następuje reakcja aglutynacji. Na powierzchni nad dnem probówki lub kubeczka mikropytki widoczny jest charakterystyczny aglutynat.

Test jest kalibrowany względem referencyjnej surowicy dla testów do serodiagnostyki zakażeń kłty – Ref 3-1980 ± jedno dwukrotne rozcieńczenie w celu ustalenia poziomu czułości.

SKŁAD ZESTAWU

Ref **Ref** **Ref**
OD081 **OD071** **OD221**



Test	Cells	8,5ml	2 x 8,5ml	2 x 33ml
-------------	--------------	-------	-----------	----------

Zawiesina antygeny *T. Pallidum* opłaszczonych utrwalonymi erytrocytami płasmi (okolo 0.36% w/v) w buforze. Odczynnik o stężeniu roboczym.

Control	Cells	8,5ml	2 x 8,5ml	2 x 33ml
----------------	--------------	-------	-----------	----------

Zawiesina utrwalonych erytrocytów płasmi (okolo 0.36% w/v) w buforze. Odczynnik o stężeniu roboczym.

DIL	20ml	2 x 20ml	3 x 57ml
------------	------	----------	----------

Rozcieńczalnik. Wyselekcjonowana surowica królicza (okolo 0.4%) zawieszona w buforze. Odczynnik o stężeniu roboczym.

Control	+	1ml	1ml	9ml
----------------	----------	-----	-----	-----

Kontrola pozytywna. Surowica zawierająca przeciwciała przeciwko *T.pallidum* o wstępnym rozcieńczeniu (1/20) zawieszona w buforze. Odczynnik o stężeniu roboczym.

Control	-	1ml	1ml	9ml
----------------	----------	-----	-----	-----

Kontrola negatywna. Surowica pozbawiona przeciwciał przeciwko *T.pallidum* o wstępnym rozcieńczeniu (1/20) zawieszona w buforze. Odczynnik o stężeniu roboczym.

KROPLOMIERZE	2	2	0
INSTRUKCJA	1	1	1

MATERIAŁY WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA, NIE ZAŁĄCZONE DO ZESTAWU

Zaleca się wykonanie oznaczenia na mikropytkach z kubeczkami typu U (okrągłodenne, Dynex M24A). Mikrokompiromierz o objętości dozującej 25µl lub pipety: 10, 25, 75, 100 i 190 µl.

Uwaga: kropłomierz o objętości dozującej 75µl nie jest złączony do zestawu na 850 testów.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw **IMMUTREP TPHA** zawiera materiał ludzki. Wszystkie składniki zawierające materiał biologiczny przebadano w kierunku obecności HCV, HIV 1 i HIV 2 oraz w kierunku obecności antygeny powierzchniowego WZW typ B (HBsAg) – wynik negatywny.

Przeprowadzone badania nie dają całkowitego bezpieczeństwa, że składniki testu pochodzące z materiału ludzkiego są wolne od czynników zakaźnych. Dlatego zaleca się zachowanie środków ostrożności przy wykonywaniu oznaczenia. Wszystkie odczynniki i materiał badany należy traktować jako potencjalny materiał zakaźny. Nie spożywać.

Zestaw **IMMUTREP TPHA** nie zawiera substancji niebezpiecznych sklasyfikowanych przez aktualne, brytyjskie regulacje dotyczące substancji chemicznych. Jednakże zaleca się aby wszystkie odczynniki traktować jako potencjalny materiał niebezpieczny. Wszystkie zalecenia muszą być zgodne z lokalnymi rozporządzeniami.

Odczynniki **IMMUTREP TPHA** zawierają 0,095% azydek sodowy jako konserwant, który może być trujący jeśli zostanie połknięty. Azydek sodowy może wchodzić w reakcje z miedzią lub ołowiem tworząc wybuchowe sole. Zaleca się neutralizację przy użyciu dużej ilości wody.

PRZECHOWYWANIE

Odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2°C - 8°C.

Test będzie spełniał standardy jakości podane w specyfikacji do końca daty ważności, która jest podana na zestawie i poszczególnych składnikach. Data ważności to ostatni dzień miesiąca podany na butelczce i etykiecie zestawu. Nie używać odczynników przeterminowanych.

Nie poddawać odczynników działaniu zbyt wysokiej temperatury. Unikać wystawiania na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW – zamrożenie powoduje nieodwracalny rozkład.

PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

Pobrać próbkę krwi żyłnej, odstawić do wykrzepnięcia i oddzielenia surowicy. Odwirować wykrzepioną próbkę krwi i odciągnąć surowicę. Zaleca się używać świeżej surowicy.

Pobrać próbkę płynu mózgowo-rdzeniowego (CSF) od pacjenta.

Nie używać do badania próbek zhemolizowanych, mętnych lub lipemicznych, powyższe może fałszować wyniki.

Próbki mogą być przechowywane do 48 godzin w temperaturze 2°C - 8°C. W przypadku dłuższego przechowywania, próbkę zamrozić w temp. -20°C (możliwość przechowywania do 1 roku). Rozmrożoną próbkę dokładnie wymieszać przed wykonaniem oznaczenia.

Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania próbek – powoduje to uzyskanie fałszywych wyników.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przed użyciem wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C) i delikatnie wymieszać w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny. Unikać spienienia.

Kropłomierze załączone do zestawu należy użyć do dozowania zawiesiny komórek testowych i komórek kontrolnych. Kropłomierze dozuja krople o objętości 75 µl i powinny być użyte do odpowiednich zawiesin zgodnie z następującym oznaczeniem:

Czerwony kropłomierz – Zawiesina Komórek Testowych
 Biały kropłomierz – Zawiesina Komórek Kontrolnych.

OGRAZNIENIA TESTU

Do wykonania oznaczenia należy użyć wyłącznie próbkę surowicy lub płynu mózgowo-rdzeniowego (CSF).

Nie ma serologicznego testu hemaglutynacji różnicującego zakażenia wywołane przez T.pallidum od innych zakażeń wywołanych przez inne patogenne krętki, np. T. pertenuis i T. carateum.

Nie zaobserwowano innych czynników wpływających na wynik oznaczenia, jednakże zaleca się potwierdzić wyniki pozytywne innym testem np. FTA-Abs i uzupełnić wywiadem lekarskim.

Zadna modyfikacja procedury nie jest dozwolona.

Wyniki o niskim mianie lub o oczekiwanych wysokich mianach należy powtórzyć. Diagnoza nie może być oparta wyłącznie o jedno badanie kliniczne. Interpretacja uzyskanych wyników powinna być przeprowadzona w oparciu o wywiad lekarski.

Wynik testu może być negatywny we wczesno objawowym okresie kłopoty lub w kilie utajonej późnej. W celu zinterpretowania wyniku zaleca się wykonanie pełnego profilu badań w kierunku kłopoty, tj. testu VDRL lub RPR, które pozwalają na wykrycie wczesnego stadium kłopoty.

Powyższe testy są oferowane przez firmę OMEGA: IMMUTREP VDRL, IMMUTREP CARBON ANTIGEN i IMMUTREP RPR.

WYKONANIE BADAŃIA

Przed użyciem próbki badane i odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej i wymieszać w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny. Próbki nie muszą być inkubowane.

TEST PRZESIEWOWY

Do każdego badania należy użyć 4 kolejne kubeczki mikroptyłki.

1. Odpipetować rozcieńczalnik wg schematu:
 - 25 μ l do rządu 1, 3 i 4 oraz 100 μ l do rządu 2.
 2. Dodać 25 μ l próbki badanej do kubeczka w 1 rzędzie.
 3. Wymieszać i przenieść 25 μ l z rządu 1 do rządu 2.
 4. Wymieszać i przenieść 25 μ l z rządu 2 do rządu 3.
 5. Wymieszać i odrzucić 25 μ l z rządu 3.
 6. Przenieść 25 μ l z rządu 2 do rządu 4.
 7. Wymieszać i odrzucić 25 μ l z rządu 4.
3. Dodać 75 μ l dobrze wymieszanej zawiesiny komórek kontrolnych do rządu 3.
 4. Dodać 75 μ l dobrze wymieszanej zawiesiny komórek testowych do rządu 4. Delikatnie wymieszać. W powyższy sposób uzyskuje się rozcieńczenia 1/80 w kubeczku 3 i 4.
5. Przykryć mikroptyłkę i inkubować 45-60 minut w temperaturze pokojowej (alternatywa – inkubacja przez całą noc).
 6. Po zakończeniu inkubacji odczytać wyniki.

Uwaga: surowice kontrolne załączone do zestawu są już wstępnie rozcieńczone i należy je dodać bezpośrednio z buteleczek do kubeczków w rzędzie 3 i 4 (nie rozcieńczać).

WYKONANIE ALTERNATYWNE TESTU PRZESIEWOWEGO

1. Odpipetować 190 μ l rozcieńczalnika do kubeczka w rzędzie 1
 2. Dodać 10 μ l próbki do rządu 1 i wymieszać.
 3. Odrzucić 150 μ l z rządu 1.
 4. Przenieść 25 μ l z rządu 1 do rządu 2.
 5. Dodać 75 μ l dobrze wymieszanej zawiesiny komórek testowych do rządu 1.
 6. Dodać 75 μ l dobrze wymieszanej zawiesiny komórek kontrolnych do rządu 2. Delikatnie wymieszać.
 7. W powyższy sposób uzyskuje się rozcieńczenia 1/80 w rzędzie 1 i 2.
6. Przykryć mikroptyłkę i inkubować 45-60 minut w temperaturze pokojowej (alternatywa – inkubacja przez całą noc).
 7. Po zakończeniu inkubacji odczytać wyniki.

METODA IŁOŚCIOWA

Jeżeli test ilościowy ma być wprowadzony jako rutynowe badanie dla próbek pozytywnych, wówczas można zmodyfikować test przesiewowy dla zawiesiny komórek kontrolnych, tzn. badanie można przeprowadzić z użyciem jednego końcowego rozcieńczenia komórek kontrolnych.

Wówczas większość próbek badanych da wyniki negatywne lub jednoznacznie pozytywne, a zawiesina komórek kontrolnych może być użyta w metodzie ilościowej zgodnie z podaną poniżej procedurą.

1. Przygotować rozcieńczenia na mikroptyłce wg podanego poniżej schematu:
 - Dla każdej próbki badanej i surowicy kontrolnej odpipetować po 25 μ l rozcieńczalnika do kolejnych kubeczków w kolumnie (paska). Dla surowicy kontrolnej pipetowanie rozpocząć od rządu 3.
 - Przenieść 25 μ l rozcieńczonej surowicy z kubeczka nr 2 (test przesiewowy) do kubeczka nr 1 pierwszego rzędu (test ilościowy).
 - Wymieszać i odrzucić 25 μ l.
 - Przenieść 25 μ l rozcieńczonej surowicy z kubeczka nr 2 (test przesiewowy) do kubeczka nr 2 pierwszego rzędu (test ilościowy). W ten sam sposób wykonać kolejne rozcieńczenia dochodząc aż do kubeczka nr 8 (w ten sam sposób przygotować rozcieńczenia dla surowicy kontrolnej zaczynając od kubeczka nr 3)
2. Dodać 75 μ l zawiesiny komórek kontrolnych do kubeczka nr 1.
3. Dodać 75 μ l zawiesiny komórek testowych do kubeczków od 2 do nr 8.
4. Delikatnie wymieszać. W powyższy sposób uzyskuje się rozcieńczenia 1/80 w rzędzie 1 i 2.
5. Przykryć mikroptyłkę i inkubować 45-60 minut w temperaturze pokojowej (alternatywa – inkubacja całonocna).

Uwaga: surowice kontrolne załączone do zestawu są już wstępnie rozcieńczone i należy je dodać bezpośrednio z buteleczek do kubeczków 1, 2 i 3, gdzie rozcieńczenia należy rozpocząć od kubeczka 3 (nie wykonywać rozcieńczeń w kubeczku 1 i 2).

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Surowice kontrolne załączone do zestawu lub próbki o znanym mianie powinny być nastawiane przy każdej serii badań. Kontrola negatywna powinna dać wynik negatywny po 45 minutach. Kontrola pozytywna powinna dać wynik pozytywny po 45 minutach. Jeżeli wyniki kontroli lub znanych próbek badanych nie dają oczekiwanych wyników test należy uznać za nieważny.

Test przesiewowy

Aglutynacja – komórki tworzą równomierną warstwę nad dnem kubeczka. Brak aglutynacji – komórki tworzą zbitą warstwę na środku dna kubeczka. Słaba aglutynacja – komórki tworzą charakterystyczny wzór pierścienia.

Aglutynacja z komórkami testowymi i brak aglutynacji z zawieszoną komórek kontrolnych wskazuje na obecność specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko T.pallidum. Brak aglutynacji wskazuje, że poziom przeciwciał jest poniżej wykrywalności metody. Nie używać komórek kontrolnych jako wzorów do interpretacji wyników negatywnych, ponieważ komórki kontrolne tworzą bardziej zbitą warstwę umiejscowioną na środku dna kubeczka.

Aglutynacja z zawieszoną komórek kontrolnych jak również z zawieszoną komórek testowych wskazuje na obecność specyficznych przeciwciał. Test należy uznać za nieważny, a badanie należy powtórzyć.

W tym celu surowice badane należy rozcieńczyć 1/4 zawieszoną komórek kontrolnych i pozostawić na 45-60 minut. Następnie próbkę odwirować (1000 r.p.m./5 min.) i rozcieńczyć supernatant 1/5 przy użyciu rozcieńczalnika. Wykonać badanie natychmiast, bez dodatkowych rozcieńczeń używając zawiesiny komórek testowych i kontrolnych. Zalecane jest również potwierdzenie wyniku testem FTA-Abs

Metoda ilościowa

Patrz test przesiewowy. Ostatnie rozcieńczenie, w którym wystąpiła aglutynacja określa miano TPHA.

W teście ilościowym końcowe rozcieńczenie kontroli pozytywnej wynosi 1/2560. Rozcieńczenie wyższe/w niższe w teście ilościowym wynosi 1/80.

Nie stwierdzono wpływu innych czynników na wynik oznaczenia wykonanego testem IMMUTREP TPHA do poziomu miana 1/164000.

WYKRYWANIE I USUWANIE BŁĘDÓW

Test hemaglutynacji biernej jest wrażliwy na ciepło, bezpośrednie działanie światła słonecznego i wytrząsanie. Unikać powyższych w trakcie wykonywania oznaczenia.

Unikać zanieczyszczenia próbek badanych i odczynników słinną, może to powodować uzyskanie błędnych wyników

Uwaga: surowice kontrolne załączone do zestawu są już wstępnie rozcieńczone.

Po użyciu każdego odczynnika natychmiast zamknąć buteleczkę odpowiednią nakrętką.

Odczynniki dozować bezpośrednio na dno kubeczka mikroptyłki.

Przed rozpoczęciem badania wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C). Delikatnie wymieszać.

Test przeznaczony jest do użycia przez laboranta z minimum doświadczenia analitycznego.

Nie używać odczynników rozłożonych lub zanieczyszczonych. Nie używać odczynników z różnych zestawów.

OCENA WYNIKÓW

Badania przeprowadzono w europejskich placówkach referencyjnych. Próbki pozyskano z Klinik Położniczych, Ginekologicznych i Nefrologicznych oraz z Laboratoriów podstawowej opieki medycznej.

	Próbki pozytywne	Próbki negatywne	Ogółem
Wynik pozytywny	406	6	412
Wynik negatywny	3	669	672
	409	675	1084

Powyższe badania przedstawiają:

Čułość = 98.5%

Specyficzność = 99.6

Odwzajemność IMMUTREP TPHA wynosi 100% (+/- jedno dwukrotne rozcieńczenie).

PIŚMIENNICTWO

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. Johnson, 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 5 Revised January 2012.

© Omega Diagnostics Ltd 2012. POLISH



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