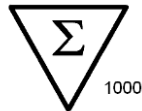




MICROSYPH™ TPHA1000

IVD

REF **FTPHA1000**



Len pre profesionálne použitie



Axis-Shield Diagnostics Ltd
The Technology Park, Dundee DD2 1XA, United Kingdom.
Tel: +44 (0) 1382 422000, Fax: +44 (0) 1382 422088.
E-mail: shield@uk.axis-shield.com
Web: www.axis-shield.com

MICROSYPH™ TPHA1000 je rýchly kvantitatívny rozbor na detekciu špecifických protilátok na *Treponema pallidum* v ľudskom sére, alebo v plazme (buď dvojitý draslík EDTA, citran sodný, alebo lítium heparín), nepriamou hamaglutináciou. Súprava je navrhnutá, aby sa používala ako počiatočný skriningový test.

ÚVOD

Syfilis je venerické ochorenie, ktoré spôsobuje špirálovitý mikroorganizmus *Treponema pallidum*. Pretože tento organizmus nie je možné kultivovať *in vitro*, diagnóza syfilisu závisí na korelácii klinických údajov so špecifickou protilátkou, ktorú preukážu sérologické testy. Sérologické skriningové testy na syfilis, ktoré ak antigény používajú cardiolipin a lecitín sú, čo sa týka urobenia jednoduché, ale často sa vyskytujú biologicky falošné pozitívne (BFP - biological false positive) reakcie, pretože tieto testy používajú antigény, ktoré sú non-treponemálne¹. Testy TPI a FTA-ABS používajú ako antigén patogénické *T. pallidum*, ale tieto testy predstavujú pre rutinnú sérodiagnostiku nejaké ťažkosti. TPI test vyžaduje žijúci patogénický *T. pallidum* a test FTA-ABS si vyžaduje fluorescenčný mikroskop. Pri oboch testoch sa vyžaduje vysoká úroveň odbornosti.

Kvantitatívne rozbor TPHA boli preukázané, ako pohodlné a špecifické testy pri diagnostike treponemálnej infekcie, ktoré majú presnosť podobnú ako test TPI⁶ a citlivosť porovnateľnú s testom FTA-ABS⁷. Potrebuje minimálne laboratórne vybavenie a na vykonanie je veľmi jednoduchý. Môže sa použiť v spojení so systémami automatickej manipulácie s tekutinami, aby sa v zaneprázdnených laboratóriách zvýšil výkon.

PRINCÍP KVANTITATÍVNEHO ROZBORU

Test MICROSYPH™ TPHA1000 detekuje ľudské protilátky (séra/plazmy) na *T. pallidum* metódou nepriamej hemaglutinácie (IHA). Uchované vtáče erytrocyty sa obalia atigénnymi komponentmi patogénneho *T. pallidum* (Nicholsonov kmeň)²⁻⁵. Tieto testovacie bunky sa za prítomnosti špecifických protilátok prilepia na *T. pallidum* a na mikro doštičkách sa zobrazia charakteristické vzory.

Protilátky na nepatogénne treponémy sa absorbujú extraktom z Reiterových treponémov, ktorý je obsiahnutý v bunkovej suspenzii. Výsledky testu sa získajú do 60 minút a vzory zlepenia buniek sú ľahko čitateľné a stabilné.

Aby sa uľahčil nutný krok riedenia, do riedidla sa pridala modrá farba. Týmto sa po pridaní vzorky zmení farba.

KOMPONENTY SÚPRAVY

TEST CELLS	2 x 40 mL	Uchované vtáčie erytrocyty obalené sonicovaným antigénom <i>T. pallidum</i> v bufri. <input type="checkbox"/> Testovacie bunky sa pred použitím musia opätovne starostlivo suspendovať. <input type="checkbox"/> Keď sa testovacie bunky skladujú, usadia sa. <input type="checkbox"/> Je dôležité, aby boli usadené bunky počas skladovania pri 2-8° zakryté bufrom.	
DIL	1 x 250 mL	Bufér, ktorý obsahuje modrú farbu. Obsahuje 0,1% azidu sodíka (NaN ₃) ako ochranu. <input type="checkbox"/> Pripravené na použitie.	
CONTROL +	1 x 0,5 mL	Defibrinované ľudskej syfilitickú plazma, ktoré obsahuje protilátky na <i>T. pallidum</i> . Ľudská plazma je na povrchový antigén hepatitídy B, HCV, HIV a na protilátky HIV nereaktívne, keď sa testoval kvantitatívnymi rozbormi vyjasnenými FDA. <input type="checkbox"/> Pred použitím zriedte.	
CONTROL -	1 x 0,5 mL	Použitie ľudske sérum je na povrchový antigén hepatitídy B, HCV, HIV a na protilátky HIV nereaktívne, keď sa testoval kvantitatívnymi rozbormi vyjasnenými FDA. Obsahuje 0,1% azidu sodíka (NaN ₃) ako ochranu. <input type="checkbox"/> Pred použitím zriedte.	

SKLADOVANIE ČINIDIEL

Činidlá v každej súprave boli priradené tak, aby vyrobili patričnú reakciu a činidlá sa nesmú zameniť s činidlami z iných sérií.

Súprava by sa mala stále skladovať **vo vertikálnej polohe** pri teplote 2-8°C. Činidlá nepoužívajte po dátume životnosti. Činidlá by sa mali vyhodiť, keď sa kontaminujú, alebo keď nepreukazujú správnu aktivitu s reaktívnymi, alebo nereaktívnymi kontrolnými vzorkami.

Súprava sa otvorila a opätovne použila pri piatich príležitostiach v priebehu 52 týždňov bez akéhokoľvek nepriaznivého účinku na výkon.

VZORKA A SKLADOVANIE

Môžu sa použiť vzorky séra, alebo plazmy. Skladujte pri teplote 2-8°C, ak sa pred uskladnením ako prezervačná látka pridá 0,1% azid. Pri dlhodobom skladovaní by sa vzorky mali skladovať pri teplote -20°C. Pred kvalitatívnou analýzou by sa odstreďovaním mali odstrániť všetky viditeľné hmotné častice.

RIEDENIE VZORKY

Vzorky, reaktívna vzorka, nereaktívna vzorka sa musia v riedidle riediť v pomere 1 ku 20. Riedidlo obsahuje modrú farbu, ktorá viditeľne mení farbu z modrej na bledo zelenú/žltú, keď sa pridá vzorka.

Pre spektrografické potvrdenie pridania vzorky riedte vzorky podľa krokov 1-2 Protokolu kvantitatívnej analýzy. Pred tým, ako budete pokračovať krokom 3, si na čítačke doštičiek nasnímajte mikro doštičku pri 450 nm pomocou 650 nm, ako referenčnej vlnovej dĺžky, ak je k dispozícii. Ak je optická hustota (O.D.) menej ako 0,2, malo by byť podozrenie na nedostatočný objem a mal by sa pripraviť čerstvý roztok.

Všimnite si prosím, že reaktívne a nereaktívne kontrolné vzorky môžu mať údaj optickej hustoty O.D. menší ako 0,2, kvôli ich zloženiu, teda sa musí dať zvlášť veľký pozor, aby sa zabezpečilo, že sa kontrolná vzorka pridá.

Roztoky by sa mali používať len v deň prípravy.

VAROVANIA A PREVENTÍVNE A BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA

Len na použitie pri diagnostike in vitro.

1. Striktne dodržujte pokyny z tejto brožúrky, najmä čo sa týka podmienok manipulácie a skladovania.
2. Striktne sa vyhnite kontaminovaniu ktoréhokoľvek z činidiel, alebo vzoriek roztokov slinami, pretože to spôsobí popletenie vzorov, ktoré bude podobné ako pozitívne výsledky so vzorkami, ktoré by mohli byť negatívne.
3. Kontrolné vzorky obsahujú ľudské sérum alebo plazmu testované kvantitatívnymi rozbormi vyjasnenými FDA na povrchový antigén hepatitídy B, antigén HCV, HIV antigén a na protilátky HIV a nález bude nereaktívny/negatívny. Pretože žiadny známy test neponúka úplnú záruku, že infekčné činidlá nie sú prítomné, kontrolné vzorky by sa mali považovať za potenciálne infekčné a malo by sa s nimi zaobchádzať s rovnakými preventívnymi a bezpečnostnými opatreniami ako pri každom inom biologicky rizikovitom materiáli. 5. vydanie publikácie Ministerstva zdravotníctva USA ohľadne biologickej bezpečnosti v mikrobiologických a biomedicínskych laboratóriách - US Department of Human Health Services "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 5th Edition, Washington, DC, ktorú januára 2007¹⁴ vydal Tlačový úrad vlády USA - US Government Printing office, January 2007,¹⁴ opisuje, že s týmito materiálmi by sa malo zaobchádzať v súlade s dobrou laboratórnou praxou.
4. Nepipetujte ústami.
5. Nefajčite, nejedzte, nepite, ani nepoužívajte kozmetiku v priestoroch, kde sa manipuluje so súpravami a so vzorkami.
6. Akékoľvek kožné choroby, porezania, odreniny a iné kožné lézie by sa mali vhodne chrániť.
7. **Roztok a nereaktívna vzorka obsahuje 0,1% azidu sodíka.**

Roztok	EUH032	Pri kontakte s kyselinami uvoľňuje veľmi toxický plyn.
Negatívna (nereaktívna) kontrola		

Hoci je koncentrácia prítomného azidu nízka, aby sa zabránilo hromadeniu výbušných olovených alebo medených solí, tieto materiály by sa nemali likvidovať cez výlevky s kovovými sifónmi, ani cez odpadové potrubia. Po použití by sa všetky odtoky mali prepláchnuť vodou.

8. **Bezpečnostné materiálové háčky pre všetky komponenty, ktoré táto súprava obsahuje sú k dispozícii na požiadanie u spoločnosti Axis-Shield Diagnostics Ltd.**

PRÍPRAVA

Materiály/Vybavenie ktoré sa požadujú, ale ktoré neboli dodané

1. Presné a riadne udržiavané pipety na dodávanie 10, 25, 75 a 190 mikrolitrov.
2. Tuhé mikro doštičky so šachtami v tvare "U".
3. Systém čítania mikro doštičiek a/alebo automatické procesory (voliteľný). Všetky prístroje a interpretačný softvér sa pred použitím musí uviesť do platnosti, musí sa udržiavať a kalibrovať musí sa s ním robiť v súlade s pokynmi výrobcu.

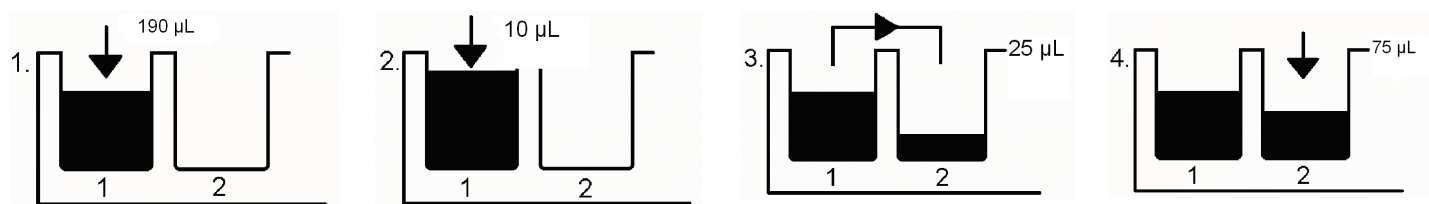
Dodané materiály

FTPHA1000 obsahuje množstvo činidiel, ktoré postačuje na urobenie 1000 testov ručne. Počet získaných testov pomocou automatických systémov bude závisieť od vlastností systému.

PROTOKOL KVANTITATÍVNEHO ROZBORU

1. Každý test si vyžaduje 2 šachty mikro doštičky. Utrite mikro doštičku čistou vlhkou handričkou, aby ste odstránili statický náboj. Do šachty 1 dajte 190 µL roztoku.

- Do šachty 1 dajte 10 μL vzorky. Pomocou pipety zmiešajte obsah šachty 1. Upozornenie: Na reaktívne a nereaktívne kontrolné vzorky sú potrebné dve ďalšie sady šácht. S kontrolnými vzorkami by sa malo zaobchádzať presne tak isto ako so vzorkami.
- Preneste 25 μL do šachty 2.
- Pridajte 75 μL plne opätovne suspendovaných testovacích buniek do šácht, ktoré obsahujú 25 μL zriedenej vzorky, alebo kontrolnej vzorky.



- Zmiešajte obsah doštičky poklepaním na všetky štyri strany doštičky.
- Inkubujte pri izbovej teplote minimálne 60 minút.
Upozornenie: Doštičku držte mimo tepla, priameho slnečného svetla a mimo akýchkoľvek zdrojov vibrácií.
- Odčítajte výsledky. Ak používate čítačku, prečítajte si doštičku najskôr vizuálne, pretože čítačka môže doštičku premiešať, keď sa z prístroja vyhodí.

ODČÍTANIE VÝSLEDKOV

Vizuálne

Pozitívny výsledok

Silne pozitívny výsledok sa objaví ako hladká podložka buniek na dne šachty, niekedy so zahnutými okrajmi. Pri vzorkách, ktoré reagujú menej silne bude táto podložka menšia a môže byť obklopená prstencom buniek.

Negatívny výsledok

Negatívny výsledok je indikovaný kompaktným tlačidlom buniek s veľmi malou dierkou v strede, alebo bez nej.

Stredný výsledok

Stredný výsledok sa javí ako tlačidlo buniek, ktorý má v strede malú dierku, ktorá má vzhľad dobre definovaného hustého prstenca s celkom čistým pozadím okolo tohto prstenca.

Skolabovaný výsledok

Niektoré veľmi silne pozitívne vzorky, keď sa testujú pri riedení 1/80, môžu dať skolabované vzory. Tieto vzory sa podobajú strednému výsledku, ale hustý prstenec môže mať nerovnomerný vzhľad.

Spektrofotometricky

Výsledky získané spektrofotometricky sa tiež musia kontrolovať manuálne.

KONTROLA KVALITY

Nereaktívna kontrolná vzorka by v teste nemala spôsobiť aglutináciu (zlepenie), zatiaľ čo reaktívna kontrolná vzorka by v teste mohla aglutináciu spôsobiť. Ak to tak nie je, kvalitatívny rozbor sa stáva neplatným a výsledky vzorky pacienta by sa nemali oznámiť. Ak test opakujete, pripravte čerstvý roztok každej vzorky a každej kontrolnej vzorky.

INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Každá vzorka, ktorá v teste dá pozitívny výsledok by sa v teste mala považovať za reaktívnu. Ak miestne postupy nestanovujú ináč, takéto vzorky by sa mali opätovne opakovane pretestovať s použitím pôvodnej vzorky. Vzorky, ktoré sú reaktívne v najmenej jednom z opakovaných testov sa v kvantitatívnej analýze MICROSYPH™ TPHA1000 opakovane považujú za reaktívne. Takéto vzorky by sa mali ďalej vyšetrovať a výsledky z kvantitatívnej analýzy by sa mali zväžiť s nejakými inými klinickými informáciami a/alebo kvantitatívnou analýzou.

Negatívny výsledok indikuje neprítomnosť protilátok na *T. pallidum*. V niektorých veľmi včasných štádiách syfilisu je možné získať negatívny výsledok (pozrite si **Obmedzenie využitia**).

Stredné výsledky môžu indikovať nízku hladinu protilátky u včasného syfilisu, starého, liečeného syfilisu, alebo frambézie. V takýchto prípadoch by sa mala vzorka opätovne pretestovať. Ak to nie je možné, mala by sa čo najskôr odobrať čerstvá vzorka a test by sa mal zopakovať s tým, že sa do úvahy vezme pacientov klinický stav.

OBMEDZENIA VYUŽITIA

1. Súprava MICROSYPH™ TPHA1000 neobsahuje kontrolné bunky. Pozitívny výsledok teda môže byť kvôli nešpecifickej reakcii vzorky s bunkami. Aby sa táto možnosť vylúčila, každá reaktívna vzorka v teste by sa mala opätovne pretestovať pomocou súpravy MICROSYPH™ TPHA200 (FTPHA200).
Na potvrdenie pozitívneho výsledku by sa mal použiť test FTA-ABS, pretože umožňuje diferenciáciu medzi protilátkami IgG a včasnými IgM. Test FTA-ABS je tiež užitočný pri veľmi včasnom syfilise, kde môže byť hemaglutinačný test negatívny.
Na terapeutickú kontrolu je vhodné použiť kvantitatívny test, ako napríklad test RPR. Toto činidlo je k dispozícii od spoločnosti Axis-Shield Diagnostics Ltd.
2. Hoci je test MICROSYPH™ TPHA1000 veľmi špecifický, je známe, že sa vyskytli falošne pozitívne výsledky u pacientov, ktorí trpia malomocenstvom, infekčnou mononukleózou a poruchami spojivových tkanív.
3. Sérologické testy, vrátane MICROSYPH™ TPHA1000, nedokážu rozlíšiť medzi syfilisom a inými formami patogenických treponemálnych infekcií⁸, napr. frambézie⁷. Mal by sa použiť klinický dôkaz, aby sa určilo o ktorý stav sa jedná.
4. Protilátky syfilisu detekované v teste MICROSYPH™ TPHA1000 po úspešnej liečbe pretrvávajú. Teda, pozitívny test môže indikovať minulé, alebo súčasnú infekciu^{6,7,9,10}.
5. Nasledovná infekcia s protilátkami *T. pallidum*, (aj anti-lipoidálnymi, aj anti-treponemálnymi) sa nemusí objaviť až do 1 až 4 týždňov po tom, ako sa vytvorí charakteristická syfilitická lézia (venerický, tvrdý vred). Teda, pri včasnom, primárnom syfilise môžu pri niektorých vzorkách testy, ako napríklad MICROSYPH™ TPHA1000, dať negatívny výsledok^{11,12,13}. Pri pozdných latentných/liečených infekciách syfilisu môžu hladiny protilátok klesnúť pod detekčný limit kvalitatívnej skúšky MICROSYPH™ TPHA1000 a teda môžu dať negatívne výsledky. V takýchto prípadoch by sa mala použiť alternatívne testovacie postupy, napr. mikroskopická identifikácia *T. pallidum*.
6. Výsledky získané systémami čítania doštičiek sa musia kontrolovať manuálne. V závislosti na parametroch čítania sa niektoré stredné, alebo skolabované vzory môžu chybné odčítať ako hraničné, alebo negatívne.
7. Tento test sa má použiť len so vzorkami individuálneho (nezhromaždeného) séra, alebo plazmy.
8. Použitie hemolyzovaných vzoriek, neúplne zrazeného séra, vzoriek plazmy, ktoré obsahujú fibrín, alebo vzoriek s kontamináciou mikróbmami môže spôsobiť nárast chybných výsledkov.

VÝKONNOSTNÉ CHARAKTERISTIKY

Presnosť

1000 darcovských vzoriek (500 sérových a 500 plazmových) bolo podrobených kvantitatívnej analýze vo firme s jednou šaržou činidiel a ďalších 1000 darcovských vzoriek (500 sérových a 500 plazmových) bolo podrobených kvantitatívnej analýze s druhou šaržou činidiel, výsledky sú prezentované dole.

Počet vzoriek	Šarža činidla	Počet vzoriek pozitívnych, alebo stredných		Presnosť
		Počiatočné	Opakované	
500 Sérových	1	0	0	100%
500 Plazmových	1	2	0	100%
500 Sérových	2	0	0	100%
500 Plazmových	2	0	0	100%

Presnosť s potenciálne krížovo-reaktívnymi vzorkami

71 potenciálne krížovo-reaktívnych vzoriek sa podrobilo kvantitatívnej analýze vo firme s jednou šaržou činidiel a ďalších 72 vzoriek sa podrobilo kvantitatívnej analýze vo firme s druhou šaržou činidiel, výsledky sú prezentované dole.

Počet vzoriek	Šarža činidla	Počet vzoriek pozitívnych, alebo stredných	Presnosť
71 (pozrite si poznámku 1)	1	0	100%
72 (pozrite si poznámku 2)	2	0	100%

Poznámka 1: 18 pozitívnych vzoriek na protilátku reumatickej artritídy (Rheumatoid Factor), 9 pozitívnych na ochorenie Lyme, 5 pozitívnych na anti-Cardiolipin, 16 pozitívnych prenatálnych vzoriek, 12 HCV pozitívnych, 6 HIV pozitívnych a 5 HBV pozitívnych vzoriek

Poznámka 2: 18 pozitívnych vzoriek na protilátku reumatickej artritídy (Rheumatoid Factor), 9 pozitívnych na ochorenie Lyme, 5 pozitívnych na anti-Cardiolipin, 16 pozitívnych prenatálnych vzoriek, 12 HCV pozitívnych, 6 HIV pozitívnych a 5 HBV pozitívnych vzoriek

Citlivosť

137 vzoriek, ktoré boli pozitívne použitím kvantitatívnych analýz ELIS sa podrobilo kvantitatívnej analýze vo firme s dvomi šaržami činidiel, výsledky sú prezentované dole.

Počet vzoriek	Činidlo Šarža	Počet negatívnych vzoriek	Citlivosť
137	1	3	97,8%
137	2	2	98,5%

ŠTANDARDIZÁCIA

Ukázalo sa, že test MICROSYPH™ TPHA1000 dá 50% aglutinačnú reakciu s WHO 3-1980 referenčnou prípravou titračného roztoku medzi 1/2560 až 1/10240 pomocou troch šarží činidiel a s piatimi laborantmi.

REFERENCIE

1. **Garner, M.F. et al** (1973). The *Treponema pallidum* haemagglutination (TPHA) test in biological false positive and leprosy sera. *J. Clin. Path.*, **26**, 258.
2. **Rathlev, T.** (1965). Haemagglutination tests utilising antigens from pathogenic and apathogenic *Treponema pallidum*. W.H.O./VDT/RES/77.65.
3. **Rathlev, T.** (1967). Haemagglutination test utilising pathogenic *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis. *Brit. J. Vener. Dis.*, **43**, 181.
4. **Tomizawa, T. et al.** (1966). Hemagglutination tests for diagnosis of syphilis. A preliminary report. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **19**, 305.
5. **Tomizawa, T. et al.** (1969). Usefulness of the hemagglutination test using *Treponema pallidum* antigen (TPHA) for the serodiagnosis of syphilis. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* **22**, 341.
6. **Sequeira, P.J.L. et al** (1973). Treponemal haemagglutination test. *Brit. J. Vener. Dis.*, **49**, 242.
7. **Johnston, N.A.** (1972). *Treponema pallidum* haemagglutination test for syphilis. Evaluation of a modified micro-method. *Brit. J. Vener. Dis.*, **48**, 474.
8. **Cox, P.M. et al.** (1969). Automated, quantitative microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies. *Appl Microbiol.*, **18**, 485.
9. **Uete, T. et al** (1971). Clinical evaluation of the *T. pallidum* haemagglutination test. *Brit. J. Vener. Dis.*, **47**, 73.
10. **Young, H. et al** (1974). *Treponema pallidum* haemagglutination test as a screening procedure for the diagnosis of syphilis. *Brit. J. Vener. Dis.* **50**, 341. *Appl. Microbiol.*, **24**, 26.
11. **Coffrey, E.M. et al** (1972). Evaluation of the qualitative and automated quantitative microhemagglutination assay for antibodies to *Treponema pallidum*. *Appl. Microbiol.* **24**, 26.
12. **Dyckman, J.D. et al** (1980). Reactivity of microhemagglutination, fluorescent treponemal antibody absorption, and venereal disease research laboratory tests in primary syphilis. *J. Clin. Micro.*, **12**, 629.
13. **Larsen, S.A. et al** (1995). Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin. Micro. Rev.*, **8**, 1. *Clin. Micro. Rev.*, **8**, 1.
14. US Department of Human Health Services "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 5th Edition, Washington, DC: US Government Printing office, January 2007.

SYMBOLY



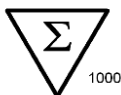
Pre *in vitro* diagnostické medicínske zariadenie



Katalógové číslo



Šarža



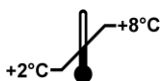
Postačuje na 1000 testov



Pozor, pozrite si sprievodnú dokumentáciu



Použite s



Skladujte pri teplote 2-8 °C



Pozitívna (reaktívna) kontrolná vzorka



Negatívna (nereaktívna) kontrolná vzorka



Testovacie bunky



Roztok



Globální číslo obchodní položky



Výrobca



Axis-Shield Diagnostics Ltd

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, United Kingdom.

Tel: +44 (0) 1382 422000, Fax: +44 (0) 1382 422088.

E-mail: shield@uk.axis-shield.com

Website: www.axis-shield.com