

Częstochowa, dn.01.02.2016r.

Zamawiający:

Wojewódzki Szpital Specjalistyczny
im. Najświętszej Maryi Panny
ul. Bialska 104/118,
42-200 Częstochowa

WSZYSCY WYKONAWCY

dot. przetargu nieograniczonego

DOSTAWA TESTÓW AGLUTYNACYJNYCH, LATEKSOWYCH DO IDENTYFIKACJI SZCZEPÓW S.AUREUS, S.PNEUMONIAE, GRUP SEROLOGICZNYCH PACIORKOWCÓW BETA – HEMOLIZUJĄCYCH ORAZ AG WYKRYWANYCH BEZPOŚREDNIO W PMR I SUROWICY KRWI ORAZ DZIERŻAWA WIRÓWEK LABORATORYJNYCH DLA POTRZEB ZAKŁADU DIAGNOSTYKI LABORATORYJNEJ PRZY UL. BIALSKIEJ I PCK.
DAZ.26.011.2016

Ldz. 248 /16

WYJAŚNIENIA TREŚCI SIWZ

W związku z art. 38 ust. 1 ustawy z dnia 29 stycznia 2004 r. Prawo zamówień publicznych (tekst jednolity Dz. U. z 2015 r. poz. 2164), Zamawiający udziela wyjaśnień treści specyfikacji istotnych warunków zamówienia /dalej: SIWZ/.

Pytanie 1 Część 1 - Testy aglutynacyjne, lateksowe do identyfikacji szczepów S.aureus, S.pneumoniae, grup serologicznych paciorkowców beta-hemolizujących oraz Ag wykrywanych bezpośrednio w PMR i surowicy krwi dla Zakładu Mikrobiologii Klinicznej na okres 24 miesięcy, poz. 1

Czy Zamawiający dopuści możliwość zaoferowania testu aglutynacyjnego lateksowego do identyfikacji szczepów S.aureus- wykrycie czynnika clumping factor, białko A, grupowo specyficzny antygen powierzchniowy opakowanie a 100 testów z odpowiednim przeliczeniem ilości opakowań według zapotrzebowania Zamawiającego?

Odpowiedź: Tak, dopuszczamy.

Pytanie 2 Część 1 - Testy aglutynacyjne, lateksowe do identyfikacji szczepów S.aureus, S.pneumoniae, grup serologicznych paciorkowców beta-hemolizujących oraz Ag wykrywanych bezpośrednio w PMR i surowicy krwi dla Zakładu Mikrobiologii Klinicznej na okres 24 miesięcy, poz. 2

Czy Zamawiający dopuści możliwość zaoferowania testu lateksowego do identyfikacji Ag. N.meningitidis/E.coli K1,H.influenzae B,S.pneumoniae,S gr.B,N.meningitidis A,C,Y/W 135 bezp. w PMR i surowicy a 30 testów z odpowiednim przeliczeniem ilości opakowań według zapotrzebowania Zamawiającego?

Odpowiedź: Tak, dopuszczamy.

Pytanie 3 Część 1 - Testy aglutynacyjne, lateksowe do identyfikacji szczepów S.aureus, S.pneumoniae, grup serologicznych paciorkowców beta-hemolizujących oraz Ag wykrywanych bezpośrednio w PMR i surowicy krwi dla Zakładu Mikrobiologii Klinicznej na okres 24 miesięcy, poz. 4

Czy Zamawiający dopuści możliwość zaoferowania testu aglutynacyjnego lateksowego do ident. szczepów S. pneumoniae z hodowli a 30 testów z odpowiednim przeliczeniem ilości opakowań według zapotrzebowania Zamawiającego?

Odpowiedź: Tak, dopuszczamy.

Dotyczy projektu umowy, stanowiącego załącznik nr 7 do SIWZ.

Pytanie 4 dot. projektu umowy zał. nr 7:

Czy Zamawiający wyrazi zgodę na dodanie poniższego zapisu w § 2 :

„Zamawiający zastrzega sobie prawo do częściowej realizacji umowy, jednak niezrealizowana wartość umowy nie może być większa niż 15% wartości umowy”.

Zgodnie z opinią UZP instytucja prawa zakłada, że zamawiający każdorazowo określa minimalny poziom zamówienia, który zostanie na pewno zrealizowany, co pozwala wykonawcom na rzetelne i właściwe dokonanie wyceny oferty, wskazując jednocześnie dodatkowy zakres, którego realizacja jest uzależniona od wskazanych w kontrakcie okoliczności i stanowi uprawnienie zamawiającego, z którego może, ale nie musi on skorzystać. W orzeczeniu Krajowej Izby Odwoławczej z dnia 11 stycznia 2008 r. (sygn. akt KIO/UZP 22/07) Izba wskazała, że niedopuszczalną praktyką jest określenie przez zamawiającego jedynie górnej granicy swojego zobowiązania, bez wskazania nawet minimalnej ilości, czy wartości, którą na pewno wyda na potrzeby realizacji przedmiotu zamówienia. „Taki sposób określenia przedmiotu zamówienia nie spełnia wymogów art. 29 ust 2 ustawy Pzp, który nakazuje, aby przedmiot zamówienia był opisany w sposób wyczerpujący i konkretny”, izba uznała ponadto w tym przypadku, że „zamawiający zastosował praktykę handlową, która pozostawia wykonawcę w niepewności, co do zakresu, jaki uda mu się zrealizować w ramach umowy, oraz uniemożliwia kalkulację ceny umownej. W efekcie na wykonawcę zostaje przerzucone całe ryzyko gospodarcze kontraktu, co z kolei stoi w sprzeczności z zasadą równości stron umowy”. Instytucja prawa opcji pozwala zatem na precyzyjne określenie poziomu zamówienia, który zostanie przez zamawiającego zrealizowany, co pozwala wykonawcom na prawidłowe dokonanie wyceny oferty (por. wyrok KIO z dnia 23 lipca 2010 r., sygn. akt KIO/UZP 1447/10, wyrok KIO z dnia, sygn. akt KIO/UZP 2376/10).

Dodatkowo, chcielibyśmy zwrócić uwagę Zamawiającego na fakt, iż powyższa konstrukcja kwestionowanego zapisu stoi w rażącej dysproporcji względem zapisu § 6 ust. 1 pkt. 2, w którym Zamawiający określił wysokość kary umownej, liczonej od wartości niezrealizowanej wartości umowy brutto. Jeżeli Zamawiający zakłada zmniejszenie konsumpcji przedmiotu zamówienia, pozbawiając jednocześnie Wykonawców „wynagrodzenia uzupełniającego” lub „innych roszczeń”, to wydaje się być zasadnym wprowadzenie równowagi dla drugiej strony kontraktu zarówno poprzez modyfikację § 1 jak i § 6 ust. 1 pkt. 2 przedmiotowej umowy.

Odpowiedź: Zamawiający nie wyraża zgody.

Pytanie 5 dot. projektu umowy załącznik nr 7:

W nawiązaniu do zapisów SIWZ, sugerujących konieczność uwzględnienia w cenie oferty wszystkich kosztów związanych z realizacją zamówienia, zwracamy się z prośbą o podanie prognozowanej ilości zamówień, składanych przez Zamawiającego w trakcie realizacji umowy w sprawie zamówienia publicznego.

Powyższe stanowi niezbędne informacje, konieczne do właściwego przygotowania oferty przetargowej w zakresie dokonania właściwej wyceny asortymentu w koszt którego Wykonawcy powinni w kalkulować koszt wykonywanych dostaw.

Dodatkowo wnosimy o wprowadzenie do projektu umowy zapisu o następującym brzmieniu:

„Zamawiający oświadcza, że w trakcie realizacji umowy przewiduje realizację maksymalnie dostaw miesięcznie, co daje liczbę dostaw przez pełen okres obowiązywania niniejszej umowy. W przypadku złożenia większej ilości zamówień od ilości prognozowanych w okresie miesięcznym, Zamawiający wyraża zgodę na realizację zamówienia w terminie dostosowanym do prognoz.”

Odpowiedź: Zamawiający, podając ilości w formularzu asortymentowo – cenowym wyliczył je na podstawie faktycznego zużycia w okresie ostatnich 24 miesięcy. Ilości zamawiane w trakcie trwania umowy są składane na bieżące potrzeby, bez robienia zapasów. Nie ma więc możliwości podania konkretnej liczby dostaw przez pełen okres niniejszej umowy.

Pytanie 6 dot. projektu umowy załącznik nr 7:

Wnosimy o wykreślenie ze wzoru umowy § 8 ust. 4 mówiącego o nie wstrzymywaniu dostaw w razie zaległości płatniczych Zamawiającego do 30 dni.

Zapis ten sprzeczny jest z art. 353 ze znaczkami 1 oraz art. 552 kodeksu cywilnego. Zamawiający dokonał ograniczenia praw Wykonawcy przynależnych mu w przypadku nie wykonania zobowiązani Zamawiającego.

Odpowiedź: Zamawiający nie wyraża zgody.

Pytanie 7 – dotyczy wzoru umowy § 8 ust 7:

Czy Zamawiający dopuszcza możliwość wyłączenia zakazu cesji wierzytelności oraz ustanawia ich przedmiotem poręczenia przez Wykonawcę bez nakładania kary umownej ?

W tym miejscu należy wskazać , że ograniczenie możliwości dokonania cesji wierzytelności z tytułu wynagrodzenia na rzecz instytucji finansowych może w znacznym zakresie utrudnić finansowanie realizacji zamówienia, co spowoduje konieczność zwiększenia wartości oferty Wykonawcy.

Odpowiedź: Zamawiający nie wyraża zgody.

Pytanie 8 – dotyczy wzoru umowy § 8 ust 7:

Czy Zamawiający wyrazi zgodę na usunięcie tego postanowienia, ewentualnie na uzupełnienie o następujące sformułowanie: „przy czym Zamawiający nie może odmówić zgody na cesję wierzytelności bez uzasadnionej przyczyny”? Zwracamy uwagę, że dokonując dostawy i odraczając termin płatności wykonawca w pewnym zakresie kredytuje Zamawiającego. W Przypadku nie zrealizowania przez Zamawiającego jego zobowiązań w zakresie zapłaty wykonawca powinien mieć prawo do odzyskania należnego mu wynagrodzenia m.in. przez przeniesienie wierzytelności na osobę trzecią. Wskazane postanowienie ogranicza w praktyce prawa Wykonawcy do dochodzenia swoich należności wyłącznie na drodze sądowej.

Odpowiedź: Zamawiający nie wyraża zgody.

Pytanie 9 - dotyczy: Część nr 1

Czy Zamawiający wyrazi zgodę na zaoferowanie z pozycji nr 1 testu [REDAKTOR] (według załączonej metodyki – załącznik nr 1) zawierającego w opakowaniu 100 testów i zaoferowanie łącznie 90 takich opakowań?

Odpowiedź: Dopuszczamy.

Pytanie 10 - dotyczy: Część nr 1

Czy Zamawiający wyrazi zgodę na zaoferowanie z pozycji nr 1 testu [REDAKTOR] (według załączonej metodyki – załącznik nr 1) zawierającego w opakowaniu 500 testów i zaoferowanie łącznie 18 takich opakowań?

Odpowiedź: Dopuszczamy.

Pytanie 11 - dotyczy: Część nr 1

Czy Zamawiający wyrazi zgodę na zaoferowanie z pozycji nr 2 testu [REDAKTOR] (według załączonej metodyki – załącznik nr 2) zawierającego w opakowaniu 30 testów i zaoferowanie łącznie 3 takich opakowań?

Odpowiedź: Dopuszczamy, z zachowaniem ilości oznaczeń podanych w formularzu asortymentowo – cenowym.

Pytanie 12 - dotyczy: Część nr 1

Czy Zamawiający wyrazi zgodę na zaoferowanie z pozycji nr 2 testu [REDAKTOR] (według załączonej metodyki – załącznik nr 2) zawierającego w opakowaniu 30 testów i zaoferowanie łącznie 4 takich opakowań?

Odpowiedź: Dopuszczamy, z zachowaniem ilości oznaczeń podanych w formularzu asortymentowo-cenowym.

Zadane pytania nr 13-16 dotyczą pozycji nr 4.

Pytanie 13 - dotyczy: Część nr 1

Czy Zamawiający wyrazi zgodę na zaferowanie z pozycji nr 3 testu [REDAKTOR] *Streptococcus pneumoniae* Test (według załączonej metodyki – załącznik nr 3) zawierającego w opakowaniu 12 testów i zaferowanie łącznie 16 takich opakowań?

Odpowiedź: Dopuszczamy, z zachowaniem ilości oznaczeń podanych w formularzu asortymentowo-cenowym.

Pytanie 14 - dotyczy: Część nr 1

Czy Zamawiający wyrazi zgodę na zaferowanie z pozycji nr 3 testu [REDAKTOR] *Streptococcus pneumoniae* Test (według załączonej metodyki – załącznik nr 3) zawierającego w opakowaniu 12 testów i zaferowanie łącznie 17 takich opakowań?

Odpowiedź: Dopuszczamy, z zachowaniem ilości oznaczeń podanych w formularzu asortymentowo-cenowym.

Pytanie 15 - dotyczy: Część nr 1

Czy Zamawiający wyrazi zgodę na zaferowanie z pozycji nr 3 testu [REDAKTOR] *Streptococcus pneumoniae* Test (według załączonej metodyki – załącznik nr 3) zawierającego w opakowaniu 22 testów i zaferowanie łącznie 9 takich opakowań?

Odpowiedź: Dopuszczamy, z zachowaniem ilości oznaczeń podanych w formularzu asortymentowo-cenowym.

Pytanie 16 - dotyczy: Część nr 1

Czy Zamawiający wyrazi zgodę na zaferowanie z pozycji nr 3 testu [REDAKTOR] *Streptococcus pneumoniae* Test (według załączonej metodyki – załącznik nr 3) zawierającego w opakowaniu 22 testów i zaferowanie łącznie 10 takich opakowań?

Odpowiedź: Dopuszczamy, z zachowaniem ilości oznaczeń podanych w formularzu asortymentowo-cenowym.

W oparciu o art. 38 ust. 2 ustawy PZP niniejsze wyjaśnienia stanowiące integralną część SIWZ, udostępnia się Wszystkim Zainteresowanym przedmiotowym postępowaniem, zamieszczając je na stronie internetowej Zamawiającego tj. www.szpitalparkitka.com.pl.

Konieczne jest bezwzględne ujęcie wskazanych zmian w składanych ofertach.

Informujemy, że dotychczas nie przekazano SIWZ zgodnie z art. 42 ust. 2 ustawy Prawo zamówień publicznych. Stosownie do art. 38 ust.2 uPzp wyjaśnienia treści SIWZ Zamawiający przesyła tylko tym Wykonawcom, którym przekazał SIWZ na ich wniosek. Pozostali Wykonawcy winni zapoznać się z treścią wyjaśnień do SIWZ zamieszczoną na stronie internetowej Zamawiającego www.szpitalparkitka.com.pl.

Zamawiający zachowuje wyznaczony na dzień 04.02.2016 r. termin składania i otwarcia ofert.

ZATWIERDZIŁ:

DYREKTOR

**Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego
im. Najświętszej Maryi Panny w Częstochowie**

Ilek.med. Barbara Magnuszewska-Pankiewicz

Załączniki:

1) Metodyki – zał. nr1,2,3.

Załącznik nr 1

PRZEZNACZENIE TESTU

jest szybkim testem lateksowym do potwierdzenia identyfikacji prawdopodobnych kolonii *Staphylococcus aureus* z podłożu wzrostowych do wstępnej izolacji, działającym na zasadzie aglutynacji szkiełkowej.

ZASADA TESTU

Cząsteczki lateksowe są pokryte fibrynogenem (do którego wiąże się koagulaza) i IgG (które wiążą się z białkiem A). Po zmieszaniu z zawiesiną *S. aureus* cząsteczki lateksowe błyskawicznie reagują tworząc zauważalne agregaty. Żadna zauważalna aglutynacja nie zachodzi w nieobecności posiadających koagulazę/białko A gronkowców.

ZAWARTOŚĆ OPAKOWANIA

Odczynnik odczynnik lateksowy na gronkowce:

5 ml

5 x 5 ml

Cząsteczki lateksowe pokryte ludzkim fibrynogenem i IgG konserwowane 0,099% roztworem azydku sodowego (niebieska nakrętka).

Kontrola (+)

kontrola dodatnia:

1 ml

2 x 1 ml

Inaktywowany preparat *S. aureus* konserwowany 0,099% roztworem azydku sodowego (czarna nakrętka).

Instrukcja użycia

Jednorazowe kartoniki aglutynacyjne

Jednorazowe pałeczki do mieszania

DODATKOWE MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIE WCHODZĄCE W SKŁAD ZESTAWU

- czy bakteriologiczne

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Środki bezpieczeństwa:

1. Odczynniki dostarczone w tym zestawie przeznaczone są tylko do diagnostyki *in vitro*.
2. Azydek sodowy, który służy do konserwowania odczynników w zestawie, może reagować z ołowianą lub miedzianą instalacją kanalizacyjną, tworząc potencjalnie wybuchowe azydki metali. Utylizować zalewając dużą objętością wody, aby zapobiec osadzeniu się azydków.
3. IgG i fibrynogen użyte do uczulenia cząsteczek lateksu otrzymano z ludzkiej plazmy, która po przebadaniu okazała się ujemna na obecność przeciwciał przeciw HIV-1, HIV-2 i HbsAg. Pomimo tego powinno się odczynnik traktować jak materiał potencjalnie zakaźny.
4. Należy podjąć odpowiednie środki ostrożności podczas pracy i utylizacji potencjalnych patogenów. Dekontaminację materiału zakaźnego powinno się przeprowadzać przy pomocy podchlorynu sodowego w końcowym stężeniu 3% przez 30 min. Ścieki płynne zawierające kwasy należy neutralizować przed wylaniem.
5. Kontrola dodatnia została inaktywowana w czasie procesu wytwarzania. Jednak powinna być traktowana jak materiał potencjalnie zakaźny.

Środki proceduralne:

1. powinien być używany zgodnie z dołączoną instrukcją.
2. Pozwolić wszystkim odczynnikom na osiągnięcie temperatury pokojowej przed użyciem.
3. Nie rozcieńczać żadnego odczynnika z zestawu.
4. Nie mieszać odczynników z różnych partii i zestawów.
5. Nie zamrażać żadnych odczynników.
6. Uważać, żeby zakraplacz z odczynnikiem lateksowym nie dotknął kontroli dodatniej lub próbek bakteriologicznych.
7. Zachować ostrożność podczas zapisywania wyników aglutynacji. Reakcje, które są zbyt silne lub „włókniste” mogą nie być prawdziwą aglutynacją.
8. Przed użyciem upewnić się, że karta jest czysta i sucha.

PRZECHOWYWANIE I TERMIN WAŻNOŚCI

powinien być przechowywany w temp. 2 - 8°C, kiedy nie jest używany. Zestawu nie należy używać po upływie daty ważności wydrukowanej na naklejce na kartonie.

MATERIAŁ DO BADANIA

Wybrać 1 - 2 izolowane kolonie rosnące przez 18 - 24 godz. w temp. 35 - 37°C na podłożu do izolacji wstępnej, takim jak agar z 5% krwi. Morfologia badanych drobnoustrojów powinna przypominać morfologię *S. aureus*. Powinno się badać pojedyncze czyste kolonie, aby zminimalizować możliwość błędnych wyników. Jeżeli to konieczne, rozizolować szczep na nowej płytce agarowej. Bakterie z kolonii o atypowej morfologii sprawdzić pod względem barwienia metodą Grama, aby zwiększyć prawdopodobieństwo, że wybrano do badania gronkowce.

SPOSÓB WYKONANIA

Kontrola jakości:

1. Kontrola dodatnia: dodać jedną kroplę kontroli dodatniej do kółka na karcie testowej. Wymieszać lateks przez delikatne odwracanie buteleczki i dodać 1 kroplę do tego samego kółka na karcie reakcyjnej; zamieszać pałeczką. **Nie pozwolić, żeby zakraplacz dotknął do kontroli dodatniej.** Delikatnie obracać

kartę. Po 2 minutach powinna uwidocznic się aglutynacja, wskazująca na wynik dodatni. Jeżeli nie widać aglutynacji, powinno się użyć nowy zestaw.

2. Kontrola ujemna: wymieszać lateks [REDACTED] przez delikatne odwracanie buteleczki i dodać 1 kroplę do kółka na karcie reakcyjnej. Pobrać jedną świeżą (18-24 godz.) kolonię znanego gronkowca koagulazo-ujemnego, np. *Staphylococcus epidermidis* i zawiesić ją w kropli odczynnika lateksowego na karcie. Delikatnie obracać kartę przez 2 minuty. Nie powinna zajść żadna aglutynacja.

Procedura badawcza:

1. Wymieszać lateks [REDACTED] przez delikatne odwracanie buteleczki i dodać 1 kroplę do kółka na czystej, suchej karcie reakcyjnej.
2. Pobrać jałową czą jedną kolonię badanego szczepu i zawiesić w kropli odczynnika lateksowego na karcie. Rozprowadzić na powierzchni kółka pałeczką do mieszania.
3. Delikatnie obracać kartę przez 2 minuty i obserwować, czy pojawia się aglutynacja.
4. Po odczycie wrzucić zużyte karty i pałeczki do roztworu odpowiedniego środka dezynfekcyjnego.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Aglutynacja po 2 minutach jest wynikiem dodatnim i wskazuje na obecność *S. aureus*. Brak aglutynacji wskazuje na nieobecność *S. aureus* i innych szczepów gronkowców koagulazo-dodatnich, posiadających białko A.

OGRANICZENIA TESTU

1. Wyniki należy interpretować w połączeniu ze wszystkimi dostępnymi informacjami laboratoryjnymi i klinicznymi.
2. Badać tylko czyste, pojedyncze kolonie, ponieważ mieszane kolonie mogą dawać błędne wyniki.
3. Hodowle starsze od 30-godzinnych mogą dawać autoaglutynację.
4. Podłoża o wysokiej zawartości soli, takie jak Mannitol Salt Agar, hamują wytwarzanie białka A, co może prowadzić do fałszywie ujemnych wyników.
5. Szorstkie szczepy gronkowców mogą dawać fałszywie dodatnie reakcje. Szczepy te spotyka się rzadko i można je odróżnić od gładkich szczepów po morfologii kolonii. Obecność szczepu szorstkiego można potwierdzić przez zawieszenie kolonii w soli fizjologicznej i sprawdzenie, czy zawiesina jest gładka, czy nie.
6. Włóknista reakcja na karcie może nie być prawdziwą reakcją dodatnią. Wymagane są dalsze testy biochemiczne.
7. Pewne drożdżaki mogą dawać fałszywie dodatnie wyniki.
8. Wszystkie koagulazo-dodatnie gronkowce reagują z [REDACTED] i dlatego *S. aureus* nie można w ten sposób odróżnić od *S. intermedius* i *S. hyicus*. Jednak te dwa ostatnie gatunki rzadko izoluje się z materiałów od ludzi. Częściej izoluje się je od zwierząt lub są saprofitami.
9. [REDACTED] jest przeznaczony do identyfikacji wstępnej *S. aureus*. Identyfikację kolonii dających wyniki dodatnie powinno się potwierdzić testami biochemicznymi.

CHARAKTERYSTYKA PORÓWNAWCZA

Porównano [REDACTED] z dobrze znanym dostępnym w handlu lateksowym testem aglutynacyjnym dla *S. aureus*. Badano przy pomocy obu testów 121 szczepów *S. aureus* i innych ściśle spokrewnionych szczepów gronkowcowych oraz 56 potencjalnie reagujących krzyżowo bakterii.

		[REDACTED]		Ogółem
		(+)	(-)	
Komercyjny test lateksowy	(+)	63*	0	63
	(-)	0	114	114
Ogółem		63	114	177

Czułość: $63/63 = 100\%$

Swoistość: $114/114 = 100\%$

Zgodność: $177/177 = 100\%$

*Spośród 63 szczepów z tej grupy, 9 reagowało krzyżowo z obu testami. Były to szczepy *C. diversus* (1), *A. baumannii* (2), *P. stuartii* (1), *B. cereus* (2), *K. oxytoca* (1), paciorkowce (2).

Jednak wszystkie wyżej wymienione szczepy albo nie rosły, albo miały bardzo nietypową morfologię, kiedy hodowano je na podłożach wybiórczych dla gronkowców. W przypadku *B. cereus* aglutynacja była nietypowa (włóknista).

ODTWARZALNOŚĆ

Odtwarzalność w obrębie serii ustalono badając czułość i swoistość testów z jednej serii dla rozcieńczeń seryjnych antygenów szczepów referencyjnych i antygeny kontrolnego z zestawu oraz dla panelu materiałów bakteryjnych. Różni operatorzy wykonywali testy przy 3 różnych okazjach. Końcowe rozcieńczenia otrzymane dla antygenów szczepów referencyjnych i kontroli dodatniej oraz wyniki jakościowe dla panelu badanego były identyczne dla wszystkich trzech oznaczeń.

Odtwarzalność dla różnych serii badano oznaczając czułość i swoistość 3 serii produktu dla seryjnych rozcieńczeń antygenów szczepów referencyjnych i kontroli dodatniej oraz dla panelu materiałów bakteryjnych. Nie zaobserwowano rozbieżności pod względem końcowego miana dla 3 serii, a wyniki jakościowe dla panelu szczepów były zgodne w 100%.

Załącznik nr 2

PRZEZNACZENIE

zawiera zestaw testów lateksowych do jakościowego wykrywania antygenów streptokoków grupy B, *Haemophilus influenzae* typu b, *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus), *Neisseria meningitidis* (meningococcus) typów A, B, C, Y lub W135 i *Escherichia coli* K1 obecnych w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR). Test może być również używany do badania innych płynów ustrojowych lub supernatantów z posiewu krwi w kierunku większości wymienionych antygenów, oraz hodowli w kierunku *N. meningitidis* grupy B lub *E. coli* K1 (patrz tabela 1).

PODSUMOWANIE

Zapalenie opon mózgowych (meningitis) ma wiele potencjalnych przyczyn, zarówno infekcyjnych jak i nieinfekcyjnych. Nieodpowiednio leczone bakteryjne zapalenie opon mózgowych może być przyczyną śmierci. Wczesna identyfikacja czynnika infekcyjnego może mieć duże znaczenie w ustaleniu odpowiedniej terapii. Wiele szczepów bakterii może brać udział w zapaleniu opon mózgowych. Streptokoki grupy B i *E. coli* K1 są dwoma najczęstszymi czynnikami powodującymi sepsę u noworodków, podczas gdy u starszych pacjentów najczęściej izolowane są *H. influenzae* typu b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* A, B, C, Y i W135. Te organizmy posiadają specyficzne polisacharydowe antygeny powierzchniowe, których pewna ilość przenika do pożywek hodowlanych, płynów ustrojowych takich jak PMR, surowicy lub moczu. Antygeny te mogą być wykrywane przy pomocy czułych metod immunologicznych takich jak immunoelektroforeza i aglutynacja lateksowa.

ZASADA TESTU

Odczynniki testu zawierają cząstki lateksu opłaszczone przeciwciałami przeciwko antygenom bakteryjnym. Cząstki lateksu aglutynują w obecności homologicznego antygeny. Odczynniki dla *Streptococcus* i *H. influenzae* są specyficzne odpowiednio do grupy B i typu b, odczynnik dla *S. pneumoniae* jest uczulony przeciwciałami oczyszczonymi z wielowalentnej surowicy, a poliwalentny odczynnik dla *N. meningitidis* reaguje z antygenami grup A, C, Y i W135. Antygen meningokoków z grupy B jest trudniejszy do wykrycia i jest strukturalnie i immunologicznie związany z antygenem *E. coli* K1, obydwa antygeny reagują z odczynnikiem dla *N. meningitidis* grupy B.

ODCZYNNIKI

SKŁAD ZESTAWU

30 oznaczeń	
1. Lateks Testowy	1 butelka (różowa zakrętka)
2. Lateks Testowy <i>H. influenzae</i> b	1 butelka (jasno niebieska zakrętka)
3. Lateks Testowy <i>S. pneumoniae</i>	1 butelka (żółta zakrętka)
4. Lateks Testowy <i>N. meningitidis</i>	1 butelka (szara zakrętka)
5. Lateks Testowy <i>N. meningitidis</i> B/ <i>E. coli</i> K1	1 butelka (brązowa zakrętka)
6. Lateks Kontrolny	5 butelek (ciemno niebieskie zakrętki)
7. Poliwalentna kontrola dodatnia	2 butelki (czerwona zakrętka)
8. Kontrola ujemna	1 buteleczka (biała zakrętka)
8. Jednorazowe karty reakcyjne	1 paczka
9. Jednorazowe pałeczki	2 paczki
10. Jednorazowe zakraplacze	1 pojemnik
11. Instrukcja	1

OPIS ODCZYNNIKÓW, PRZYGOTOWANIE I ZALECANE WARUNKI PRZECHOWYWANIA

Patrz również **Ostrzeżenia i środki ostrożności**.

Przed otwarciem wszystkie odczynniki powinny być przechowywane w temperaturze 2-8°C. Tak przechowywane odczynniki zachowują aktywność do daty ważności umieszczonej na etykiecie.

1. **Lateksy Testowe.** 0,5% zawiesina cząstek lateksu w buforze zawierającym 0,05% i/lub 0,1% azydku sodowego jako konserwant. Cząstki lateksu są opłaszczone odpowiednimi przeciwciałami pochodzenia króliczego oprócz reagentu *N. meningitidis* B/*E. coli* K1, który jest opłaszczony mysimi przeciwciałami monoklonalnym.

2. **Lateksy kontrolne.** 0,5% zawiesina cząstek lateksu w buforze zawierającym 0,05% i/lub 0,1% azydku sodowego jako konserwant. Cząstki lateksu są opłaszczone króliczym białkiem oprócz odczynnika dla *N. meningitidis* B/*E. coli* K1, który jest opłaszczony mysimi monoklonalnymi przeciwciałami przeciwko *Bordetella bronchiseptica*.

Zawiesiny lateksowe są dostarczone w postaci gotowej do użycia. Powinny być przechowywane w pozycji pionowej w temperaturze 2-8°C. Po długim okresie przechowywania mogą pojawić się skupienia cząstek lateksu w butelce. W takim przypadku należy wstrząsać energicznie butelkę z odczynnikiem przez kilka sekund. **NIE ZAMRAŻAĆ.**

3. **Poliwalentna kontrola dodatnia.** Liofilizowane ekstrakty bakteryjne zawierające antygeny z reprezentatywnych szczepów dla każdego badanego gatunku. Zawiera 1,0% tiomersal przed uwodnieniem, a po uwodnieniu 0,02%. Uwodnić przy użyciu 3,6ml sterylnej wody destylowanej. Po dodaniu wody pozostawić butelkę na kilka minut, następnie wymieszać.

Po rekonstytucji przechowywać w temperaturze 2-8°C przez maksymalnie 6 miesięcy.

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Test wyłącznie do diagnostyki in vitro.

Test wyłącznie do profesjonalnego użytku.

Należy zwrócić uwagę na informacje na temat niebezpiecznych składników zawarte w kartach bezpieczeństwa i na etykietach.

OCHRONA ZDROWIA I BEZPIECZEŃSTWO

1. Poliwalentna kontrola dodatnia zawiera 1,0% tiomersal, który w Dyrektywie EEC został określony jako toksyczny (T). Z odczynnikami związane są następujące zwroty ryzyka (R) i bezpieczeństwa (S):
R23/24/25 działa toksycznie przez drogi oddechowe, w kontakcie ze skórą i po połknięciu
R33 niebezpieczeństwo kumulacji w organizmie
S1/2 przechowywać pod zamknięciem i chronić przed dziećmi
S36/37/39 nosić odpowiednią odzież ochronną, odpowiednie rękawice ochronne i okulary lub ochronę twarzy
S45 w przypadku awarii lub jeżeli źle się poczujesz, niezwłocznie zasięgnij porady lekarza, jeżeli to możliwe pokaż etykietę
2. Testowe i kontrolne lateksy dla streptokoków grupy B, *H. influenzae* typu b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* ACY W135 zawierają azydek sodowy w stężeniu 0,1%. Jest on sklasyfikowany wg Dyrektywy EEC jako szkodliwy (Xn). Z odczynnikami związane są następujące zwroty ryzyka (R) i bezpieczeństwa (S):
R22 działa szkodliwie po połknięciu
R32 w kontakcie z kwasami uwalniania bardzo toksyczne gazy
S2 chronić przed dziećmi
S13 nie przechowywać razem z żywnością, napojami i paszami dla zwierząt
S36 nosić odpowiednią odzież ochronną
S46 w razie połknięcia, niezwłocznie zasięgnij porady lekarza, pokaż opakowanie lub etykietę

Azydki mogą reagować z miedzią i ołowiem tworząc wybuchowe związki. Ilości odczynnika użyte w tym teście są małe. Pomimo to przy usuwaniu odczynników zawierających azydek należy splukać je dużą ilością wody.

3. Wszystkie materiały pochodzenia ludzkiego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne. Zaleca się postępowanie zgodne z dobrą praktyką laboratoryjną.
4. W przypadku stosowania radioaktywnych materiałów do hodowli należy przestrzegać następujących zasad:
 - a. radioaktywne materiały powinny być przechowywane w przeznaczonym do tego pomieszczeniu
 - b. praca z materiałami radioaktywnymi musi odbywać się w przeznaczonym do tego pomieszczeniu
 - c. nie pipetować ustami
 - d. nie jeść, nie pić, nie palić w miejscu pracy
 - e. po pracy dokładnie umyć ręce
 - f. należy przestrzegać lokalnych przepisów
5. Materiały nie jednorazowe powinny być wysterylizowane po użyciu. Zalecaną metodą jest autoklawowanie przez 15 minut w 121°C. Materiały jednorazowe powinny zostać autoklawowane lub spalone. Rozlane płyny, które są potencjalnie zakaźne powinny zostać usunięte absorbującym ręcznikiem, a powierzchnie zdezynfekowane antybakteryjnym środkiem lub alkoholem 70%. Nie używać podchlorynu sodowego. Materiały użyte do usuwania rozlanych płynów łącznie z rękawiczkami powinny zostać usunięte jak inne materiały zakaźne.
6. Nie pipetować ustami. W czasie wykonywania oznaczenia należy stosować odzież ochronną, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne. Umyć ręce po pracy z zestawem.
7. Postępowanie zgodne z dobrą praktyką laboratoryjną, standardami higieny i dostarczonymi z testem informacjami sprawia, że składniki zestawu nie stanowią zagrożenia dla zdrowia.

ANALITYCZNE ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Nie używać reagentów po upływie terminu ważności.
2. Przed użyciem doprowadzić odczynniki do temperatury pokojowej (18-30°C). Odczynnik lateksowy, w którym pojawiają się skupiska i grudy nie powinien być używany gdyż oznacza to, że odczynnik był zamrożony.
3. Należy unikać zanieczyszczenia mikrobiologicznego gdyż może to ograniczyć okres trwałości lub spowodować błędne wyniki.
4. Ważne jest, aby w czasie nakrapiania odczynnika trzymać butelki pionowo. Umożliwia to dozowanie właściwych objętości.
5. Nie należy używać odczynników pochodzących z zestawów o różnych numerach serii.
6. Nie dotykać pól reakcyjnych na kartach.
7. W oznaczeniach można używać mechanicznej wstrząsarki o następujących parametrach:
 - a. płaska wstrząsarka o obrotach 100-150rpm, średnica ruchu 3,0-3,4cm. Kartonik reakcyjny po zdjęciu z wstrząsarki powinien być krótko poruszany ruchami kołyszącymi przed odczytem.
 - b. orbitalna wstrząsarka pracująca przy obrotach 25rpm i kącie 9-10,5° lub 18rpm i kącie 16-17,5°.

POBIERANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK

- a. **Próbki z płynów ustrojowych** (PMR, surowica, mocz) powinny być badane jak najszybciej po pobraniu. Jeżeli próbka nie może być przetestowana natychmiast po pobraniu można ją przechowywać w 2-8°C przez noc lub dłużej w temperaturze -15 do -20°C. Jeżeli konieczne są jakiegokolwiek bakteriologiczne oznaczenia z próbki, powinny być wykonane przed testem lateksowym, aby uniknąć zanieczyszczenia próbki.
- b. **Hodowle krwi** mogą być badane po 18-24 godzinach inkubacji w 37°C lub wcześniej, jeżeli pojawi się wzrost bakterii.
- c. **Hodowle płytkowe** (*N. meningitidis* B/E, *coli* K1). Kolonie rosnące na wzbogaconym podłożu (agar krwawy, czekoladowy) mogą być badane po całonocnej inkubacji w 37°C. Razem z testem lateksowym należy wykonać barwienie Grama

PROCEDURA

MATERIAŁY DOSTARCZONE

Patrz skład zestawu.

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

- Łaźnia wodna
- Wirówka lub filtry membranowe (0,45µm)
- Wytrząsarka (opcjonalnie)

PRZYGOTOWANIE PRÓBEK KLINICZNYCH

- Próbki z płynów ustrojowych** muszą być ogrzane przed testem, aby zminimalizować niespecyficzne reakcje. Zaleca się następujące procedury:
 - 1) Dla PMR i moczu należy ogrzewać próbkę 5 minut w łaźni z wrzącą wodą. Ochłodzić próbkę do temperatury pokojowej (18-30°C) i odwirować lub przefiltrować przez filtr 0,45µm. Dla uzyskania maksymalnej czułości, próbki moczu można 25-krotnie zagęścić przy użyciu koncentratora [REDAKTOR] (Amicon). Odwirować lub przefiltrować jak powyżej.
 - 2) Dla surowicy należy dodać 3 objętości 0,1M EDTA o pH 7,4 na 1 objętość surowicy, podgrzewać przez 5 minut w łaźni z wrzącą wodą. Ochłodzić próbkę do temperatury pokojowej (18-30°C) i odwirować lub przefiltrować.
- Hodowle krwi.** 1-2ml próbki należy odwirować, aby oddzielić czerwone krwinki. Np. przy 1000g przez 5-10 minut. Supernatant należy użyć do testu.
- Hodowle płytkowe** (*N. meningitidis* B/E. *coli* K1). Test wykonywać bezpośrednio z hodowli.

PROCEDURA TESTU

Przed wykonaniem testu zapoznać się z Analitycznymi Środkami Ostrożności.

Próbki z płynów ustrojowych, supernatanty z hodowli krwi.

Uwaga: Najpierw należy wykonać reakcję z **Lateksami Testowymi (Test Latex)** a jeżeli wynik dla któregoś z lateksów testowych jest dodatni, wykonać reakcję badanego materiału z odpowiednim Lateksem Kontrolnym (Control Latex).

Etap 1	Przygotować próbkę jak opisano.	
Etap 2	Wstrząsnąć odczynniki lateksowe.	
Etap 3	Umieścić po jednej kropli każdego Lateksu Testowego na osobnych polach reakcyjnych (oznaczonych tym samym kolorem co zakrętki buteleczek). W trakcie dozowania butelki trzymać pionowo.	1 kropla
Etap 4	Używając jednorazowego zakraplacza odmierzyć jedną kroplę (około 40µl) materiału badanego i nałożyć obok każdej kropli lateksu	1 kropla
Etap 5	Zmieszać krople pałeczką i rozprowadzić na całej powierzchni pola reakcyjnego. Dla każdego pola używać osobnej pałeczki.	
Etap 6	Poruszać kartonikiem ruchami kolistymi. Sprawdzić czy pojawia się aglutynacja. Odczyt wykonać w ciągu 3 minut, wizualnie z odległości około 25-35cm. Nie używać szkieł powiększających. Można stosować mechaniczną wytrząsarkę. Otrzymane wyniki powinny być wyraźnie widoczne w normalnych warunkach oświetleniowych. W przypadku pojawienia się aglutynacji w którymś z pól wykonać kontrolę reakcji niespecyficznych za pomocą odpowiedniego Lateksu Kontrolnego (Control Latex) .	3 minuty
Etap 7	Kontrola reakcji niespecyficznych:	
Etap 8	- Na wolne pole na kartoniku testowym (oznaczone na granatowo) umieścić jedną kroplę Lateksu Kontrolnego (Control Latex) odpowiadającemu Lateksowi Testowemu dającemu aglutynację . W trakcie dozowania butelkę trzymać pionowo. -Za pomocą jednorazowego zakraplacza nanieść jedną kroplę (około 40µl) materiału badanego obok Lateksu Kontrolnego. -Zmieszać krople pałeczką i rozprowadzić na całej powierzchni pola reakcyjnego. -Poruszać kartonikiem ruchami kolistymi. Sprawdzić czy pojawia się aglutynacja. Odczyt wykonać w ciągu 3 minut, wizualnie z odległości około 25-35cm. - Pojawiająca się aglutynacja świadczy o reakcjach niespecyficznych – wynik jest niemożliwy do interpretacji.	
Etap 9	Usunąć zużyte karty.	

Hodowle płytkowe

(Tylko *N. meningitidis* B/*E. coli* K1)

Etap 1	Wstrząsnąć odczynniki lateksowe.	
Etap 2	Dla każdej badanej hodowli umieścić po jednej kropli każdego Lateksu Testowego na osobnych polach reakcyjnych.	1 kropla
Etap 3	Płaską stroną pałeczki przenieść materiał z płytki z hodowlą na pole reakcyjne. Odpowiednią ilością do testu jest ilość odpowiadająca jednej dużej kolonii.	Próbka
Etap 4	Rozetrzeć próbkę delikatnie w kropli odczynnika. Nie uszkodzić powierzchni karty. Doprowadzić do powstania emulsji. Rozprowadzić na całej powierzchni pola reakcyjnego. Używając osobnej pałeczki powtórzyć czynność dla Lateksu Kontrolnego.	
Etap 5	Poruszać kartonik ruchami kolistymi. Sprawdzić czy pojawia się aglutynacja. Odczyt wykonać w ciągu 20 sekund, wizualnie z odległości około 25-35cm. Nie używać szkieł powiększających. Można stosować mechaniczną wytrząsarke. Otrzymane wyniki powinny być wyraźnie widoczne w normalnych warunkach oświetleniowych.	
Etap 6		
Etap 7	Usunąć zużyte kartoniki.	20 sekund

WYNIKI

ODCZYT WYNIKÓW

Aglutynacja w ciągu 3 minut mieszania lateksu z próbką świadczy o **wyniku dodatnim** (dla badania próbki kolonii 20 sekund) – Rys. 1.

Szybkość i wygląd aglutynacji zależy od siły antygenu. Aglutynacja może mieć wygląd od dużych skupisk pojawiających się po kilku sekundach mieszania do małych pojawiających się raczej powoli. W przypadku badania hodowli większość reakcji dodatnich jest prawie natychmiastowa.

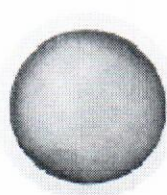
W przypadku **reakcji ujemnej** nie pojawia się aglutynacja, a mleczny wygląd mieszaniny pozostaje niezmienny w czasie testu (Rys. 2). Jakkolwiek śladowe granulki mogą być widoczne w obrazie wyniku ujemnego. W przypadku badania kolonii niektóre szczepy mogą powodować „żyłkowate” skupiska lateksu na mlecznym tle, taka reakcja powinna być interpretowana jako ujemna.

UWAGA: cząstki lateksu użyte w lateksie testowym i kontrolnym do *N. meningitidis* B/*E. coli* K1 są inne od użytych do pozostałych odczynników.

Rys. 1



Rys. 2



KONTROLA JAKOŚCI

Zaleca się wykonywanie następujących procedur kontrolnych z każdym nowo dostarczonym zestawem jak również dla każdej serii oznaczeń. Każde odstępstwo od spodziewanych wyników wskazujące na problem z odczynnikami, musi być wyjaśnione przed użyciem testu do badania próbek klinicznych.

Sprawdzanie wizualne

Zawiesziny lateksu po nałożeniu na kartonik testowy powinny być zawsze skontrolowane pod kątem aglutynacji. Jeżeli widoczna jest aglutynacja lateksu przed nałożeniem próbki badanej, zawieszina nie może być używana.

W czasie przechowywania nieliczne agregacje lub strąty mogą pojawić się na górze buteleczki. Jeżeli zostanie to zauważone buteleczka powinna być wytrząsana aż do całkowitego rozpuszczenia cząsteczek.

Kontrola dodatnia: Działanie Lateksów Testowych może być sprawdzone przez dodanie poliwalentnej **Kontroli Dodatniej (Positive Control)** do pola testowego, w którym nie zaobserwowano aglutynacji Lateksu Testowego z badaną próbką w ciągu trzech minut mieszania. Wyraźna aglutynacja powinna wystąpić w przypadku wszystkich lateksów.

Etap 1	Używając jednorazowego zakraplacza nakropić jedną kroplę Kontroli Dodatniej na pole testowe na którym nie zaobserwowano aglutynacji Lateksu Testowego z badaną próbką. Wymieszać odczynnik pałeczką i usunąć bezpiecznie pałeczkę.	1 kropla
Etap 2	Poruszać kartonik ruchami kolistymi przez 3 minuty. Po tym czasie powinna być obserwowana wyraźna aglutynacja.	3 minuty
Etap 3		
Etap 4	Usunąć bezpiecznie zużyte kartoniki	

Kontrola ujemna:

Jeżeli uzyskano przynajmniej jeden wynik ujemny w czasie pracy z testem dla Lateksu Testowego i Lateksu Kontrolnego (lub dla samego Lateksu Testowego w przypadku gdy nie wykonywano próby z Lateksem Kontrolnym) nie wymagana jest dodatkowa kontrola ujemna.

Jeżeli próbka badana daje aglutynację z Lateksem Testowym i brak aglutynacji z Lateksem Kontrolnym powinna być wykonana kontrola z odczynnikiem **Kontroli Ujemnej (Negative Control)** lub z niezaszczepionym podłożem do hodowli krwi zgodnie z poniższą procedurą.

Etap 1	Umieścić jedną kroplę Lateksu Testowego (Test Latex) na jednym polu kartonika testowego.	1 kropla
Etap 2	Pobrać 1 kroplę Kontroli Ujemnej (Negative Kontrol) lub niezaszczepionego podłoża do hodowli krwi i umieścić obok kropli Lateksu Testowego.	1 kropla
Etap 3	Zmieszać krople pałeczką i rozprowadzić na całej powierzchni pola reakcyjnego. Dla każdego pola używać osobnej pałeczki.	3 minuty
Etap 4	Poruszać kartą ruchami kolistymi. Sprawdzić czy pojawia się aglutynacja. Odczyt wykonać w ciągu 3 minut. Po tym czasie nie powinna być widoczna aglutynacja.	
Etap 5	Usunąć bezpiecznie zużyte kartoniki	

Przy badaniach płynów ustrojowych należy używać Kontrolę Ujemną (Negative Control) dostarczoną razem z testem.

Dla próbek hodowli krwi jako kontrola ujemna może być stosowane niezaszczepione podłoże do hodowli krwi pochodzące z tego samego źródła.

Uwagi:

1. Wcześniej oznaczone próbki ujemne i dodatnie, zamrożone i przechowywane w temperaturze -15 do -25°C lub niższej, mogą być stosowane jako dodatnie i ujemne kontrole. Kontrola dodatnia może być stosowana w miejsce próbki badanej.
2. Przy identyfikacji wyrosłych kolonii (tylko **N. meningitidis B/E coli K₁**) kontrolę odczynników można przeprowadzić za pomocą świeżej, całonocnej hodowli szczepu referencyjnego postępując zgodnie z procedurą opisaną w Wykonaniu Testu.

Odpowiednie szczepy referencyjne to :

ATCC 13090 – *N. meningitidis* grupa B (reakcja dodatnia)

ATCC 23503 – *E. coli* typ K1 (reakcja dodatnia)

ATCC 13077 – *N. meningitidis* grupa A (reakcja ujemna)

ATCC 13090 and ATCC 23503 powinny wykazać aglutynację z Lateksem Testowym oraz brak aglutynacji z Lateksem Kontrolnym,

ATCC 13077 powinno wykazywać brak aglutynacji zarówno z Lateksem Kontrolnym jak i Testowym.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Wynik dodatni

Wyraźna aglutynacja w reakcji z **jednym Lateksem Testowym** oraz **brak aglutynacji z pozostałymi Lateksami Testowymi (Test Latex) i Lateksami Kontrolnymi (Control Latex)** świadczy o obecności danego antygeny bakteryjnego w próbce.

Generalną zasadą jest, że dodatni wynik w reakcji próbki od noworodka z lateksem *N. meningitidis B/E. coli K1* świadczy o infekcji *E. coli K1*, u starszych pacjentów bardziej prawdopodobny jest meningococcus grupy B.

Wynik ujemny

Ujemna reakcja ze wszystkimi odczynnikami lateksowymi wskazuje na brak antygeny bakteryjnego na poziomie możliwym do wykrycia w próbce – nie wyklucza to możliwości infekcji spowodowanej przez te mikroorganizmy. Jeżeli symptomy utrzymują się konieczne jest wykonanie testu na alternatywnej próbce lub test po zagęszczeniu moczu. Brak aglutynacji w reakcji z lateksem *N. meningitidis* B/*E. coli* K1 wskazuje, że nie jest prawdopodobne iż jest to *N. meningitidis* B lub *E. coli* K1.

Wynik niemożliwy do interpretacji

Agglutynacja w reakcji z więcej niż jednym Lateksem Testowym (Test Latex) lub aglutynacja z Lateksem Testowym (Test Latex) i odpowiednim Lateksem Kontrolnym (Control Latex) świadczy o niespecyficznym reakcji. W większości przypadków niespecyficzne reakcje można wyeliminować przez ogrzewanie i doprowadzenie do klarowności próbki (patrz Przygotowanie próbek klinicznych). Jeżeli niespecyficzna reakcja pojawi się w reakcji supernatantu z hodowli krwi należy podgrzać próbkę we wrzącej wodzie przez 5 minut schłodzić do temperatury pokojowej (18-30°C), odwirować i powtórzyć test.

UWAGA: test wykonywany bezpośrednio na próbkach klinicznych jest przeznaczony do przesiewowej diagnostyki i nie zastępuje hodowli i identyfikacji. Wyniki testu muszą być powiązane z innymi informacjami takimi jak: objawy, wyniki innych testów, obraz kliniczny itp.

OGRANICZENIA PROCEDURY

1. Dla próbek płynów ustrojowych od noworodków (tylko grupa B streptokoków) fałszywie ujemne wyniki mogą wystąpić gdy poziom antygenów w próbce jest poniżej czułości testu. Ujemne wyniki testu muszą być potwierdzone wynikami hodowli na bulionach selektywnych. Wyniki dodatnie wskazują na obecność antygenów Streptokoków grupy B – wynik nie musi wskazywać na obecność żywych mikroorganizmów
2. Dla próbek płynów ustrojowych od małych dzieci (tylko grupa B streptokoków) stosowanie testu nie może zastąpić hodowli mikroorganizmów. Wykonanie testów w celu diagnozowania chorób wywoływanych paciorkowcami z grupy B na próbkach moczu od małych dzieci nie jest potwierdzone.
3. Zakażenia wywołane przez paciorkowce grupy B występują głównie u noworodków. Dodatnie wyniki otrzymane z próbek płynów ustrojowych od pacjentów starszych niż 6 miesięcy powinny być interpretowane z dużą ostrożnością. Dodatnie wyniki otrzymane z hodowli krwi od pacjentów w każdym wieku mogą mieć duże znaczenie.
4. Wynik dodatni jest uzależniony od obecności antygeny bakteryjnego w próbce na poziomie wykrywalnym.
5. Dostępne są tylko ograniczone informacje na temat wykrywania w moczu lub surowicy antygeny *N. meningitidis* B/*E. coli* K1 (Tabela 6). Brak jest klinicznych informacji na temat wykrywania w moczu antygeny *N. meningitidis* ACY W135 (Tabela 5). Jakkolwiek stwierdzano ten antygen w próbkach moczu.
6. Stwierdzono kilka przypadków występowania niespokrewnionych bakterii posiadających wspólne antygeny. Dlatego nie należy wykluczać możliwości krzyżowych reakcji w teście lateksowym.

OCZEKIWANE WYNIKI

Próbki zawierające wykrywalne poziomy antygeny: streptokoków grupy B, *H. influenzae* typu b, antygeny otoczkowego *S. pneumoniae*, antygenów *N. meningitidis* A, C, Y, W135, lub antygenów *N. meningitidis* B / *E. coli* K1 będą dawały aglutynacje z odpowiednim Lateksem Testowym.

CHARAKTERYSTYKA

1. Próbki z płynów ustrojowych

W 15 ośrodkach prowadzono badania z próbkami z płynów ustrojowych (świeżymi i zamrażanymi) i supernatantami z hodowli krwi. Przechowywane próbki nie były poddawane ogrzewaniu jak opisano w Przygotowaniu próbek. Nie stwierdzono znaczącej utraty antygeny po procedurze ogrzewania.

Czułość

Czułość testu określono na podstawie badań dodatnich próbek.

Tabele 2 do 6 ukazują liczbę próbek badanych na poszczególnych lateksach i liczbę dodatnich wyników. Czulości dla poszczególnych lateksów w badaniu PMR były następujące: 67% (12/18) dla [REDACTED], 97% (87/90) dla [REDACTED], 88% (45/51) dla [REDACTED], 71% (29/41) dla [REDACTED] i 65% (11/17) dla [REDACTED].

Specyficzność

Specyficzność każdego z pięciu odczynników lateksowych była sprawdzana na płynach ustrojowych (świeżych i mrożonych) oraz próbkach hodowli krwi od pacjentów z bakteryjnym lub aseptycznym zapaleniem opon mózgowych i o innym, nieznanym pochodzeniu.

Wyizolowano z próbek : *H. influenzae* b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* z grupy A, B, C, Y, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, alpha-hemolityczne streptococcus, beta-hemolityczne streptococcus grupa A, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas*, *Streptococcus sanguis*, *Toxoplasma gondii* oraz bakterie z grupy coli.

Specyficzność wszystkich pięciu odczynników testu [REDACTED] w badaniach próbek PMR określono na większą od 98% (57/58). Szczegółowe dane zawarte są w tabelach 2-6.

2. Hodowle płytkowe (*N. meningitidis* B/*E. coli* K1).

N. meningitidis i *E. coli* hodowano na wzbogaconym podłożu. Wszystkie *N. meningitidis* grupy B i *E. coli* K1 zostały prawidłowo zidentyfikowane. Nie wystąpiły krzyżowe reakcje z innymi grupami *N. meningitidis* ani innymi antygenami *E. coli* (Tabela 7). Stosunkowo dużo hodowli *E. coli* z innymi antygenami dawało niespecyficzne reakcje (Tabela 7).

Tabela 1.
Próbki badane na poszczególnych odczynnikach testu

Próbka	<i>Strep B</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i>
PMR	+	+	+	+	+
Surowica	+	+	+	+	+*
Mocz	+	+	+	+*	+*
Hodowla krwi	+	+	+	+	+
Plwocina	-	-	+	-	-
Kolonie bakterii	-	-	-	-	+

Klucz:

+ dostępne informacje

+* informacje ograniczone

- brak danych

Tabela 2.
Wyniki badań klinicznych na teście

Próbka	Czułość ^a		Specyficzność ^b	
	Liczba badanych	Liczba dodatnich	Liczba badanych	Liczba dodatnich
PMR	18	12	58	1 ^c
Surowica	19	13	7	0
Mocz	20	17	22	1 ^d
Hodowla krwi	9	9	369	4 ^e

^a izolowane/wykryte beta hemolizujące streptokoki grupy B (diagnoza kliniczna lub inne testy)

^b bakterie inne niż *Strep B*/brak wzrostu

^c izolowana *E. coli*

^d izolowany *P. mirabilis*

^e izolowane: *Staphylococcus epidermidis*; beta hemolizujące streptokoki grupy A; *E. coli* + *Enterococcus*; *Staphylococcus epidermidis* + *Enterococcus*

Tabela 3.
Wyniki badań klinicznych na teście

Próbka	Czułość		Specyficzność	
	Liczba badanych	Liczba dodatnich	Liczba badanych	Liczba dodatnich
PMR	90	87	375 ^a	2 ^b
Surowica	21	20	21	0
Mocz	10	10	236	0
Hodowla krwi	54	54	1566 ^c	5 ^d

^a jedna dodatkowa próbka PMR dała nie specyficzną reakcję

^b jedna próbka aseptyczna; *E. coli* wyizolowana z innej próbki

^c dwa dodatkowe supernatanty z hodowli dały nie specyficzne reakcje

^d jedna próbka aseptyczna; z innych izolowano: *S. aureus*; *E. coli* + *S. album*; *K. oxytoca*; alfa nie hemolizujący *Streptococcus*

Tabela 4.
Wyniki badań klinicznych na teście

Próbka	Czułość ^a		Specyficzność ^b	
	Liczba badanych	Liczba dodatnich	Liczba badanych	Liczba dodatnich
PMR	51	45	483 ^a	2 ^b
Surowica	6	6	13	0
Mocz	105	46	320 ^c	0
Plwocina	30	28	22	4 ^d
Hodowla krwi	113	109	1512	7 ^e

^a jedna dodatkowa próbka PMR dała nie specyficzną reakcję

^b *Enterobacter aerogenes*; bakterie coli

^c trzy dodatkowe próbki moczu dały nie specyficzne reakcje

^d dwa z infekcją chlamydia, a dwa z innymi wirusami oddechowymi

^e z czterech próbek izolowane: *Pseudomonas*; *Streptococcus sanguis*, *Staphylococcus epidermidis* + *Enterococcus*; *Streptococcus viridans*

Tabela 5.
Wyniki badań klinicznych na teście

Próbka	Czułość		Specyficzność	
	Liczba badanych	Liczba dodatnich	Liczba badanych	Liczba dodatnich

PMR	41 ^a	29	423	2 ^b
Surowica	5	3	36	0
Mocz	0	-	229 ^c	0
Hodowla krwi	7	7	1615	2 ^d

^a zawiera 8 grup A, 25 grup C i I grupę Y (pozostałe nie pogrupowane)

^b *K. aerogenes*; *E. coli*

^c pięć dodatkowych próbek moczu dało nie specyficzne reakcje

^d *Streptococcus sanguis*; *Staphylococcus epidermidis* + *Enterococcus*

Tabela 6.
Wyniki badań klinicznych na teście [REDACTED]

Próbka	Czułość		Specyficzność	
	Liczba badanych	Liczba dodatnich	Liczba badanych	Liczba dodatnich
PMR:				
<i>N. meningitidis</i> B	11	7	128	0
<i>E. coli</i> K1 ^a	6	4	128	0
Surowica:				
<i>N. meningitidis</i> B	2	1	3	0
Mocz:				
<i>N. meningitidis</i> B	2	1	7	0
Hodowla krwi:				
<i>N. meningitidis</i> B	7	5	461	3 ^b

^a próbki zamrożone do przechowywania. Wszystkie inne próbki świeże.

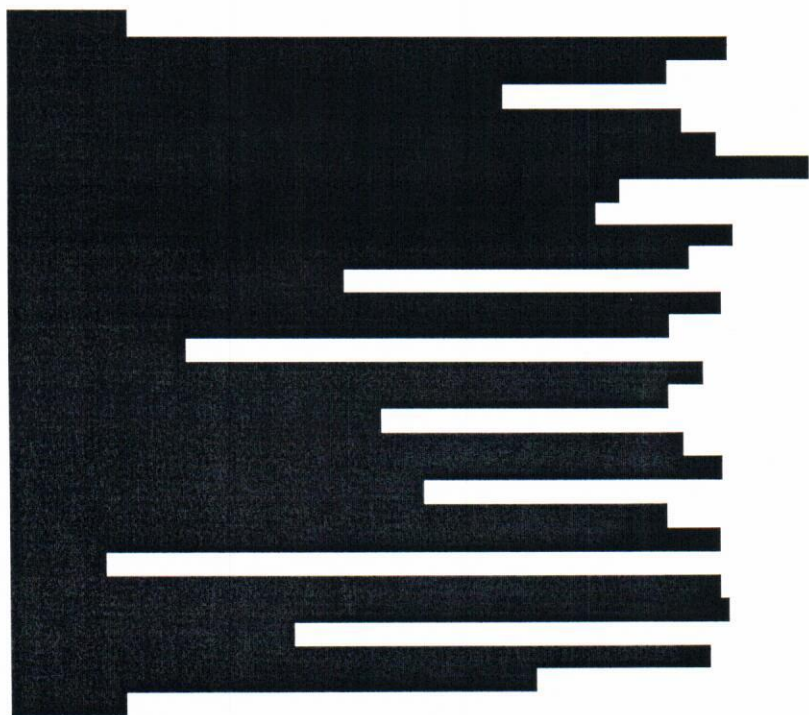
^b tlenowe i beztlenowe (beta hemolizujące *Strep. A*) u tego samego pacjenta; koagulazo ujemny *Staphylococcus*.




Tabela 7.
Identyfikacja hodowli testem [REDACTED]

Hodowla ^a	+	-
<i>N. meningitidis</i> grupa A	0	16
<i>N. meningitidis</i> grupa B	10	0
<i>N. meningitidis</i> grupa C	0	18
<i>N. meningitidis</i> grupa 29E	0	8
<i>N. meningitidis</i> grupa W135	0	7
<i>N. meningitidis</i> grupa X	0	4
<i>N. meningitidis</i> grupa Y	0	5
<i>N. meningitidis</i> grupa Z	0	3
<i>E. coli</i> K1	7	0
<i>E. coli</i> inne antygeny	0	13 ^b

^a hodowle zidentyfikowane przez aglutynację szkiełkową

^b dodatkowe 10 hodowli dało nie specyficzne reakcje



REF	[REDACTED]
IVD	[REDACTED]
	[REDACTED]
	[REDACTED]
LOT	[REDACTED]
	[REDACTED]

CE

[REDACTED]

Załącznik nr 3

[REDACTED]

Test do wykrywania antygenu *S. pneumoniae* w moczu i płynie mózgowo-rdzeniowym

PRZEZNACZENIE

Test [REDACTED] *Streptococcus pneumoniae* jest szybkim immunochromatograficznym (ITC) testem in vitro do wykrywania antygenu *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) w moczu u pacjentów z zapaleniem płuc i w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z zapaleniem opon mózgowych. Test przeznaczony jest, w połączeniu z hodowlą lub innymi metodami, jako pomoc w diagnostyce zarówno pneumokokowego zapalenia płuc oraz pneumokokowego zapalenia opon mózgowych.

OPIS

S. pneumoniae jest główną przyczyną ogólnie nabytego zapalenia płuc i może być najważniejszym czynnikiem ogólnie nabytego zapalenia płuc o nieznannej etiologii. Pneumokokowe zapalenie płuc ma wskaźnik śmiertelności do 30% w zależności od bakteriemii, wieku oraz zasadniczej choroby. Niewłaściwie zdiagnozowane i leczone infekcje *S. pneumoniae* mogą prowadzić do bakteriemii, zapalenia opon mózgowych, zapalenia osierdzia, ropniaków, płamicy piorunującej, zapalenia wsierdzia i zapalenia stawów.

Pneumokokowe zapalenia opon mózgowych, stan, który często prowadzi do trwałego uszkodzenia mózgu lub śmierci, może występować jako powikłanie po innej pneumokokowej infekcji lub może powstawać spontanicznie bez poprzedzających chorób. Dotyka osób w każdym wieku, lecz jest najbardziej powszechne u dzieci w wieku poniżej 5 lat, nastolatków i ludzi w młodym wieku oraz osób starszych. Postęp choroby od łagodnych objawów do śpiączki może wystąpić w ciągu kilku godzin, czyniąc szybką diagnozę i leczenie antybiotykowe decydującym. Dwadzieścia do trzydziestu procent wszystkich pacjentów z pneumokokowym zapaleniem opon mózgowych umiera, często pomimo trwającego kilka dni właściwego leczenia antybiotykami. Śmiertelność jest nawet wyższa wśród bardzo młodych i bardzo starych pacjentów.

Test [REDACTED] *Streptococcus pneumoniae* zapewnia prostą i szybką metodę do diagnostyki pneumokokowego zapalenia płuc z użyciem próbki moczu, pobieranej, przechowywanej i transportowanej w tradycyjny sposób. Zapewnia także natychmiastową i dokładną diagnostykę pneumokokowego zapalenia opon mózgowych w badaniach płynu mózgowo-rdzeniowego.

ZASADY PROCEDURY TESTOWEJ

Test [REDACTED] *Streptococcus pneumoniae* jest membranowym testem immunochromatograficznym do wykrywania rozpuszczalnych antygenów pneumokokowych w ludzkim moczu i płynie mózgowo-rdzeniowym.

Królicze przeciwciała przeciwko *S. pneumoniae*, linia wynikowa, naniesione są na nitrocelulozową membranę. Kontrolne przeciwciała naniesione są na tę samą membranę jako druga linia. Zarówno królicze przeciwciała przeciwko *S. pneumoniae* jak i przeciwciała obojętne skoniugowane są z barwnymi cząsteczkami, które w stanie suchym naniesione są na obojętną, włóknistą podkładkę. Połączenie membrany z podkładką zawierającą skoniugowane przeciwciała tworzy płytkę testową. Test jest w postaci książeczki, membrana z przeciwciałami znajduje się po przeciwnej stronie zgięcia niż miejsce do umieszczania wymazówki z próbką.

Wykonując test (), wymazówkę zanurza się w próbce (moczu lub płynie mózgowo-rdzeniowym), a następnie umieszcza w płytce testowej. Odczynnik A, roztwór buforu, dodaje się za pomocą buteleczki z zakraplaczem. Następnie test jest zamykany wraz z wymazówką tak, aby nastąpił kontakt próbki z membraną testu. Antygeny pneumokokowe obecne w próbce wiążą się ze skoniugowanymi przeciwciałami przeciwko *S. pneumoniae*. Powstałe kompleksy antygen-koniugat wychwytywane są przez unieruchomione przeciwciała przeciwko *S. pneumoniae*, tworząc linię wynikową. Unieruchomione przeciwciała kontrolne wiążą obojętne skoniugowane przeciwciała, tworząc linię kontrolną.

Wyniki testu interpretuje się na podstawie obecności lub braku różowo-fioletowych linii. Dodatni wynik testu, odczytany w ciągu 15 minut zależy od ilości antygeny w próbce, daje pojawienie się dwóch linii w polu wynikowym i kontrolnym. Ujemny wynik testu, odczytany w ciągu 15 minut, daje pojawienie się tylko linii w polu kontrolnym, co wskazuje, że antygen *S. pneumoniae* jest nieobecny w próbce. Brak linii w polu kontrolnym, bez względu na obecność linii w polu wynikowym, świadczy o błędzie w teście.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY

Materiały zawarte w zestawie testowym

Odwołać się do ilustracji zamieszczonej na wkładce do ulotki.

1. Składane płytki testowe: Membrana z naniesionymi specyficznymi króliczymi przeciwciałami wobec antygeny *S. pneumoniae* oraz z kontrolnymi przeciwciałami połączona jest ze skoniugowanymi z barwnymi cząsteczkami przeciwciałami przeciwko antygenom *S. pneumoniae* i przeciwciałami obojętnymi umieszczonymi na podkładce w składanej płytce testowej.
2. Odczynnik A: bufor cytrynianowo/fosforanowy z siarczanem sodowo laurylowym oraz z [] oraz azydkiem sodu.
3. Wymazówki testowe: przeznaczone do stosowania z testem [] Nie stosować innych wymazówek.
4. Wymazówka z kontrolą dodatnią: Unieczynnione antygeny *S. pneumoniae* naniesione w formie suchej na wymazówkę.
5. Wymazówka z kontrolą ujemną: *S. pneumoniae* – ujemne wymazówki.

Materiały nie zawarte w zestawie testowym

Zegarek, minutnik lub stoper, standardowe pojemniki na próbki moczu, lub próbki transportowe do PMR.

Aksesoria

Wymazówki Kontrolne [] – opakowanie zawiera 5 dodatnich i 5 ujemnych wymazówek kontrolnych.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Wymazówki z kontrolą dodatnią wymagają sześć (6) kropeł odczynnika A. Próbkę badaną wymagają trzy (3) krople odczynnika A.

1. WYNIK NIEWAŻNY, sygnalizowany przez brak linii kontrolnej, może występować w przypadku dodania do płytki testowej niewystarczającej objętości odczynnika A. Aby nanieść prawidłową objętość należy trzymać buteleczkę pionowo, 1,5-2,5 cm nad otworem na wymazówkę i powoli nanieść trzy krople.
2. Tylko do diagnostyki *in vitro*.
3. Płytkę testową jest zamknięta w foliowej saszetce. Jeżeli saszetka jest uszkodzona lub otwarta, testu nie należy używać. Test należy wyjąć z opakowania bezpośrednio przed użyciem. Nie należy dotykać miejsca reakcyjnego.
4. Nie należy używać testu po terminie ważności.
5. Nie należy mieszać składników z różnych zestawów.
6. Zestaw zawiera specjalne wymazówki do stosowania z []. Nie należy używać innych wymazówek.
7. Roztwory stosowane do przygotowania wymazówek kontrolnych inaktywować w standardowy sposób. Badaną próbkę, kontrolę oraz płytki testowe po badaniu, należy traktować jak materiał zakaźny. Należy postępować tak jak z materiałem zakaźnym.
8. Nie ma potrzeby sterylności pobierania moczu przeznaczonego do badania testem []®. Dlatego też, próbki moczu używane do tego testu mogą nie być odpowiednie dla metody hodowlanej.
9. Zanurzenie wymazówki [] w próbce płynu mózgowo-rdzeniowego powoduje, że próbka przestaje być sterylna i może nie być odpowiednia do metody hodowlanej. W przypadku wykonywania posiewu najpierw wykonać posiew, a następnie test.

PRZECHOWYWANIE I TRWAŁOŚĆ

Zestaw należy przechowywać w temperaturze (2-30°C). Zestaw [] Test oraz odczynniki pozostają trwale do daty ważności umieszczonej na opakowaniu. Nie należy stosować testu po terminie ważności.

POBIERANIE PRÓBK

Wszystkie próbki doprowadzić przed wykonaniem testu [] do temperatury pokojowej (15-30°C). Bezpośrednio przed wykonaniem testu wymieszać próbkę delikatnymi ruchami. Mocz (do diagnostyki zapalenia płuc)

Pobrać próbkę moczu do standardowego pojemnika. Przechowywać w temperaturze pokojowej (15-30°C) w przypadku wykonania badania w ciągu 24 godzin od pobrania. Alternatywnie, przechowywać w temperaturze 2-8°C, lub zamrożoną, do 14 dni przed wykonaniem testu. Jako konserwant może być użyty kwas borowy. Jeśli jest to niezbędne transportować próbki moczu w zalakowanych pojemnikach w temperaturze 2-8°C lub zamrożone.

PMR (do diagnostyki zapalenia opon mózgowych)

Pobrać płyn mózgowo-rdzeniowy w standardowy sposób i przechowywać w temperaturze pokojowej (15-30°C) do 24 godzin przed wykonaniem testu. Alternatywnie, przechowywać w temperaturze 2-8°C, lub zamrożony (-20°C) do 1 tygodnia przed wykonaniem testu .

KONTROLA JAKOŚCI

Codzienna kontrola jakości:

Test [REDAKTOWANE] zawiera wbudowaną kontrolę dodatnią i ujemną. Producent rekomenduje jako minimum, dokumentowanie każdego dnia, wyników wewnętrznych kontroli dla pierwszej badanej próbki.

Wewnętrzna kontrola dodatnia

Kontrolę dodatnią pracy testu stanowi różowa do fioletowej linia w polu „Control”. Linia będzie widoczna, jeżeli próbka prawidłowo przemieści się siłami kapilarnymi wzdłuż membrany.

Wewnętrzna kontrola ujemna

Ujemną kontrolą jest zmiana zabarwienia tła w polu wynikowym. Tło w okienku powinno mieć kolor od jasno różowego do białego w przeciągu 15 minut, i nie powinno być brane pod uwagę przy odczytywaniu wyniku testu.

Zewnętrzna kontrola dodatnia i ujemna

Dobra praktyka laboratoryjna zaleca wykonanie kontroli dodatniej i ujemnej w celu sprawdzenia odczynników i prawidłowości wykonywanych procedur. Zestaw [REDAKTOWANE] zawiera wymazówki kontroli dodatniej i ujemnej. Wymazówki te służą do monitorowania całego badania/testu. Należy przeprowadzić badanie za pomocą tych wymazówek z każdą nowo otrzymaną dostawą. Dodatkowo, kontrole mogą być wykonywane zgodnie z wymaganiami regulacji lokalnych i/lub rządowych, wymaganiami jednostek akredytujących i/lub standardami Twojego laboratorium kontroli jakości.

W przypadku nieprawidłowych wyników kontroli, nie wydawać wyników pacjentów. Sprawdzić procedurę i powtórzyć wykonanie kontroli lub skontaktować się z producentem.

PROCEDURA DLA WYMAZÓWEK KONTROLNYCH [REDAKTOWANE]

Uwaga: Stosować 6 kropli Odczynnika A do wymazówek kontrolnych.

1. Wyjąć płytkę testową z saszetki bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia. Ułożyć płytkę na płaskiej powierzchni.
2. Na prawej wewnętrznej ściance testu znajdują się dwa otwory. Wsunąć wymazówkę w dolny otwór i zdecydowanym ruchem przesunąć ją tak, aby wacik wymazówki był całkowicie widoczny w górnym otworze. Nie wyjmować wymazówki.
3. Buteleczkę z Odczynnikiem A trzymać pionowo około 1,5 - 2,5 cm nad testem. Powoli nakropić sześć (6) kropli odczynnika A na dolny otwór.
4. Natychmiast zdjąć pasek z krawędzi prawej ścianki płytki testowej i dokładnie zamknąć test. Wynik odczytać po 15 minutach od zamknięcia testu. Wyniki odczytywane po dłuższym czasie niż 15 min. mogą być nieprawidłowe. Jednakże, linia wynikowa dla kontroli dodatniej może być widoczna po mniej niż 15 minutach.

PROCEDURA TESTOWA [REDAKTOWANE]

Próbki moczu, próbki PMR, płynne kontrole

Stosować próbki moczu w badaniach pneumokokowego zapalenia płuc i próbki PMR w badaniach pneumokokowego zapalenia opon mózgowych.

Uwaga: Stosować 3 krople Odczynnika A w badaniach próbek płynnych.

Odwolaj się do ilustracji zamieszczonej na wkładce do ulotki.

1. Doprowadzić próbki i/lub płyny kontrolne do temperatury pokojowej (15-30°C), następnie wymieszać próbkę delikatnymi ruchami. Wyjąć płytkę testową z saszetki bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia. Ułożyć płytkę na płaskiej powierzchni.
2. Umieścić wymazówkę w badanej próbce tak, aby wacik był całkowicie zanurzony. Jeśli wymazówka kapie docisnąć wymazówkę do ścianek pojemnika z próbką w celu usunięcia nadmiaru próbki.
3. Na prawej wewnętrznej ściance testu znajdują się dwa otwory. Wsunąć wymazówkę w dolny otwór i zdecydowanym ruchem przesunąć ją tak, aby wacik wymazówki był całkowicie widoczny w górnym otworze. Nie wyjmować wymazówki.
4. Buteleczkę z Odczynnikiem A trzymać pionowo około 1,5 - 2,5 cm nad testem. Powoli nakropić trzy (3) krople odczynnika A na dolny otwór.
5. Natychmiast zdjąć pasek z krawędzi prawej ścianki płytki testowej i dokładnie zamknąć test. Wynik odczytać po 15 minutach od zamknięcia testu. Wyniki odczytywane po czasie dłuższym niż 15 min. mogą być nieprawidłowe. Jednakże, niektórzy pacjenci dodatni mogą dawać widoczną linię w miejscu wyniku po mniej niż 15 minutach.

Uwaga: dla wygody, patyczek wymazówki wystający z testu może być odłamany po zamknięciu testu. Podczas tej czynności unikać wysunięcia wymazówki z otworu.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Próbka ujemna daje pojedynczą różowo-fioletową linię kontrolną w górnej połowie okienka, co wskazuje na wstępny wynik ujemny. Linia kontrolna wskazuje, że proces wykrywania przebiegł prawidłowo, ale nie wykryto antygeny *S. pneumoniae*.

Próbka dodatnia daje dwie różowo-fioletowe linie, co świadczy o wykryciu antygeny. Próbki z małą ilością antygenów, mogą dawać słabo widoczną linię. Każda widoczna linia jest wynikiem dodatnim. Jeżeli nie jest widoczna

żadna linia lub widoczna jest tylko linia w miejscu wynikowym, test jest nieprawidłowy. Test powinien być powtórzony.

ZAPISYWANIE WYNIKÓW

Wynik Polecany zapis
 Mocz dodatni Dodatni dla pneumokokowego zapalenia płuc
 Mocz ujemny Wstępnie ujemny dla pneumokokowego zapalenia płuc, sugerujący brak, ostatnio lub obecnie, pneumokokowej infekcji. Infekcja wywołana przez *S. pneumoniae* nie może być wykluczona, ponieważ antygen może występować w moczu w ilości poniżej poziomu wykrywalności testu.

Dodatni PMR Dodatni dla pneumokokowego zapalenia opon mózgowych.
 Ujemny PMR Wstępnie ujemny dla pneumokokowego zapalenia opon mózgowych. Infekcja wywołana przez *S. pneumoniae* nie może być wykluczona ponieważ antygen może występować w PMR w ilości poniżej poziomu wykrywalności testu.

OGRANICZENIA

Test [redacted] był walidowany tylko przy zastosowaniu próbek moczu i płynu mózgowo-rdzeniowego. Inne próbki (np. plazma, lub inne płyny ustrojowe) mogące zawierać antygeny *S. pneumoniae* nie zostały zbadane.

Wynik ujemny testu [redacted] nie może wykluczyć infekcji wywołanej przez *S. pneumoniae*. Dlatego też, w celu właściwej diagnostyki metoda hodowlana, serologiczna oraz wykrywanie antygenów powinny być połączone z obserwacją objawów klinicznych.

Test [redacted] nie był sprawdzany na próbkach od pacjentów przyjmujących antybiotyki dłużej niż 24 godziny lub z ostatnio zakończonym leczeniem antybiotykiem.

Szczepionka przeciw *Streptococcus pneumoniae* może powodować fałszywie dodatnie wyniki w moczu w teście [redacted] w ciągu 48 godzin od zaszczepienia. Wpływ szczepienia nie był sprawdzany na osobach z pneumokokowym zapaleniem opon mózgowych. Stąd, poleca się, aby test [redacted] nie był wykonywany w ciągu 5 dni po zaszczepieniu szczepionką przeciw *Streptococcus pneumoniae*.

Prawidłowość pracy testu nie była sprawdzana na moczu małych dzieci. Wyniki na PMR małych dzieci są ustalone (zobacz Badania Sprawdzające – PMR)

BADANIA SPRAWDZAJĄCE - MOCZ

Czułość analityczna

Zmienność serowarów

Czterdzieści cztery izolaty, reprezentujące 23 serowary *S. pneumoniae* odpowiedzialne za prawie 90% poważnych przypadków infekcji pneumokokowych w Stanach Zjednoczonych i całym świecie, było hodowanych i wykrywanych testem [redacted] na poziomie 10^5 komórek/ml.

Granica wykrywalności testu

Granica wykrywalności dla Testu [redacted] określona jako rozcieńczenie dodatniej próbki moczu dające wynik dodatni w teście [redacted] w około 95% przypadków, określono stosując wielokrotne rozcieńczenie dodatniej próbki moczu i badanie jej za pomocą testu [redacted]

Pięciu (5) różnych analityków wykonywało po 20-40 testów z każdego rozcieńczenia, co dało 100 – 200 oznaczeń z rozcieńczenia. Uzyskane wyniki wykazały, że granica wykrywalności testu [redacted] wynosi: rozcieńczenie 1:250 próbki moczu pacjenta.

Rozcieńczenie	Wynik dodatni uzyskany testem	Procent wykrytych
1:200	100/100	100%
1:250	95/100	95%
1:300	160/200	80%
1:400	44/100	44%
1:600	8/100	8%

CZUŁOŚĆ I SPECYFICZNOŚĆ KLINICZNA (Badania retrospektywne)

Jako część badań retrospektywnych, pobrano próbki moczu od 35 pacjentów z dodatnią hodowlą *S. pneumoniae* z krwi i 338 próbek moczu od pacjentów *S. pneumoniae*- ujemnych (razem 373 pacjentów) i przebadano je testem [redacted]. Wyniki uzyskane za pomocą testu opracowano standardowymi metodami. Czułość wyniosła 86%, specyficzność 94%, a całkowita dokładność 93%. Dziewięćdziesięć pięć procentowy (95%) przedział ufności podany jest poniżej.

		Hodowla krwi	
		+	-
[redacted]	+	30	21
Wynik	-	5	317

Czułość = 86% (71%-94%)

Specyficzność = 94% (91% -95%)

Dokładność = 93% (90% - 95%)

CZUŁOŚĆ I SPECYFICZNOŚĆ KLINICZNA (Badania prospektywne)

W siedmiu niezależnych ośrodkach test ██████████ zastosowano do badania próbek moczu uzyskanych od 215 pacjentów hospitalizowanych oraz od pacjentów z lecznictwa otwartego, z objawami ze strony dolnego układu oddechowego lub sepsą oraz od pacjentów, u których z innych względów podejrzewano pneumokokowe zapalenie płuc. Pacjenci byli potwierdzani jako dodatni z pneumokokowym zapaleniem płuc przy użyciu hodowli krwi.

██████████ Test wykonywano odpowiednio na pacjentach hospitalizowanych jak i z lecznictwa otwartego. Dziewięćdziesiąt pięć procentowy (95%) przedział ufności podany jest poniżej.

Pacjenci z lecznictwa otwartego

		Hodowla krwi	
		+	-
Wynik	+	19	25
	-	2	90

Czułość = 90% (70% - 97%)

Specyficzność = 78% (70% - 85%)

Dokładność = 80% (72% - 86%)

Pacjenci hospitalizowani

		Hodowla krwi	
		+	-
Wynik	+	9	20
	-	1	49

Czułość = 90% (60% - 98%)

Specyficzność = 71% (59% - 80%)

Dokładność = 73% (62% - 82%)

REAKCJE KRZYŻOWE

Badanie moczu

Dwieście siedemdziesiąt (270) różnych mikroorganizmów izolowano od 338 ujemnych pacjentów, sprawdzanych w części badań retrospektywnych. 165 mikroorganizmów pochodziło od pacjentów wykazujących objawy infekcji dróg moczowych. 15 (9%) z nich wykazało wyniki dodatnie. Z tego: 2/2 *Enterobacter cloacae*, 1/2 *Staphylococcus aureus*, 1/1 *Streptococcus* (nie A, B), 1/1 *Streptococcus* (nie D), 1/17 *Streptococcus* (Grupa D), 1/3 *Providencia stuartii*, 5/78 *Escherichia coli* oraz 3 niezidentyfikowane organizmy. 59 mikroorganizmów izolowano od pacjentów z zapaleniem płuc, 3 (5%) z nich wykazało wynik dodatni w tym 1/3 *Mycobacterium kansasii* oraz 2/15 *Mycobacterium tuberculosis*. Jeden z 41 (2%) izolowanych mikroorganizmów od pacjentów z bakteriecią, *Proteus mirabilis*, był dodatni. Nie zachodziły reakcje krzyżowe z 5 izolatami z ropni. Wreszcie, 4/100 próbek moczu pobranych od pacjentów z nierozpoznaną infekcją dawało wynik dodatni.

Ze względu na retrospektywny charakter przeprowadzonych badań, możliwa była do zbadania tylko ograniczona liczba pacjentów z każdego rodzaju infekcji oraz nie była znana kompletna historia choroby każdego z nich. Jednakże, nie było możliwe wykluczenie ko-infekcji *S. pneumoniae*. W badaniach z czystymi hodowlami (dane poniżej) wymienione mikroorganizmy nie wykazywały reakcji krzyżowych w oznaczeniach testem ██████████

Badanie czystych kultur

W celu oznaczenia specyficzności analitycznej testu ██████████, zebrano panel 144 czynników potencjalnie wywołujących reakcje krzyżowe, włącznie z mikroorganizmami związanymi z zapaleniem płuc i tymi, które prawdopodobnie mogą być izolowane jako naturalna flora bytująca w układzie moczowym lub będąca wynikiem infekcji. Wszystkie były przebadane za pomocą testu ██████████ dla gęstości zawiesiny od 10^6 to 10^9 jtk/ml. ██████████ Test nie daje reakcji krzyżowych z 143 spośród 144 organizmów. Jeden mikroorganizm dający reakcje krzyżową, *Streptococcus mitis*, jest przypuszczalnie czynnikiem dającym reakcję krzyżową ponieważ posiada antygen wobec którego skierowany jest ██████████ Test. *Streptococcus mitis* związany jest z zapaleniem wsierdza, a nie zapaleniem płuc, i jego obecność nie jest spodziewana w próbkach od pacjentów badanych testem ██████████. Przebadano następujące mikroorganizmy uzyskując wyniki ujemne-w przypadku gdy przetestowano więcej niż jeden szczep, ich liczba umieszczona jest w nawiasach.

Acinetobacter sp. (4)

Adenovirus* (2&3 mieszane)

Alcaligenes faecalis

Bacillus subtilis

*Blastomyces dermatitidis**

Bordetella pertussis

Branhamella catarrhalis

Candida albicans (3)

Candida stellatoidea

*Coccidioides immitis**

Corynebacterium sp. (3)

Enterobacter cloacae (4)

Enterococcus avium u

Enterococcus durans u

Enterococcus faecalis u (6)
Escherichia coli (8)
Escherichia hermannii (2)
Flavobacterium sp. (2)
Gardnerella vaginalis
Haemophilus influenzae (10)
 (typy a-f oraz nietypowane)
Haemophilus parainfluenzae
*Histoplasma capsulatum** (2)
Klebsiella oxytoca (2)
Klebsiella pneumoniae (3)
Lactobacillus sp. (5)
Legionella pneumophila
Listeria monocytogenes
Micrococcus luteus (2)
Moraxella osloensis
Morganella morganii
Mycobacterium kansasii
Mycobacterium tuberculosis
Mycoplasma sp.* (3)
Neisseria cinerea
Neisseria gonorrhoeae (3)
Neisseria lactamica
Neisseria meningitidis
Neisseria polysaccharea
Neisseria subflava
*Nocardia farcinia**
*Paracoccidioides brasiliensis**
*Paragrypa** (2)
Proteus mirabilis (2)
Proteus vulgaris (2)
Providencia stuartii
Pseudomonas sp. (7)
 Syncytialny Wirus Oddechowy*
 Rhinovirus*
Salmonella sp. (4)
Serratia marcescens
Sphingobacterium multivorum
Staphylococcus aureus (6)
Staphylococcus sp. (8)
Stenotrophomonas maltophilia
Streptococcus anginosus u•
Streptococcus bovis u
Streptococcus Groupa A •(2)
Streptococcus Groupa B • (8)
Streptococcus Groupa C u•
Streptococcus Groupa F u•
Streptococcus Groupa G u•
Streptococcus mutans u•
Streptococcus parasanguis u•
Streptococcus sanguis u•
Trichomonas vaginalis (2)

* czyste kultury z CDC o szacunkowo wysokiej koncentracji.
 u *Streptococcus* Nie A, B (Całkowita liczba szczepów - 16)
 • *Streptococcus* Nie D (Całkowita liczba szczepów 17)

CZYNNIKI INTERFERUJĄCE

Próbkę moczu z podwyższoną liczbą białych krwinek (podwyższona zawartość w małym powiększeniu), czerwonych krwinek* (podwyższona zawartość w małym powiększeniu), z białkiem (zawartość 500 mg/dl), glukozą (zawartość >2000 mg/dl), i zmętnieniem (zawierające zmętnienie) zbadane były za pomocą testu [REDACTED]. Nie wykryto wpływu tych czynników na pracę testu.

*Uwaga- jedna próbka moczu z podwyższoną zawartością krwinek czerwonych dała błędny wynik spowodowany intensywnym zabarwieniem membrany testowej i zamaskowaniem linii w polu wyniku.

BADANIE ODTWARZALNOŚCI

Badania testu [REDACTED] na próbkach ślepych były przeprowadzone w trzech osobnych, zabezpieczonych miejscach z zastosowaniem kodowanych próbek ślepych obejmujących próbki ujemne, słabo dodatnie, umiarkowanie dodatnie, wysoko dodatnie. Sprawdzano próbki z i bez kwasu borowego. Analitycy oznaczali

każdą próbkę wielokrotnie w ciągu trzech różnych dni. Trzysta pięćdziesiąt siedem (357) spośród 359 ogólnej liczby badanych próbek (99.4%) dało spodziewane wyniki.

BADANIA SPRAWDZAJĄCE - PMR

Czułość analityczna

Granica wykrywalności testu

Granica wykrywalności dla testu [REDACTED] była określona za pomocą wielokrotnego rozcieńczenia hodowli *Streptococcus pneumoniae*.

Dziesięciu (10) różnych analityków przeprowadziło 10 testów z każdego rozcieńczenia, co dało 100 wyników z każdego rozcieńczenia. Na podstawie uzyskanych wyników określono granicę wykrywalności testu na poziomie 5×10^4 komórek na mililitr.

Gęstość zawiesiny <i>S.pneumoniae</i>	Liczba wyników dodatnich/ całkowita liczba oznaczeń	Procent wykrytych
7.5×10^4 komórek/ml	100/100	100%
5×10^4 komórek/ml	100/100	100%
3×10^4 komórek/ml	91/100	91%
1.5×10^4 komórek/ml	44/100	44%
0 komórek/ml	0/100	0%

Zmienność serowarów

Cztery serowary (6, 14, 19, 23) najczęściej odpowiedzialne za pneumokokowe choroby inwazyjne hodowano, a hodowle rozcieńczano do poziomu 5×10^4 komórek w mililitrze PMR. Rozcieńczone hodowle badano testem [REDACTED]. Czternastu analityków wykonało po 10 testów dla każdego serowaru co dało 140 oznaczeń dla jednego serowaru. Wszystkie cztery serowary zostały wykryte w 100% przy zastosowanej granicy wykrywalności testu (5×10^4 komórek na mililitr).

CZUŁOŚĆ I SPECYFICZNOŚĆ KLINICZNA

W prospektywnych badaniach w kilku ośrodkach, test [REDACTED] był stosowany do badania próbek PMR uzyskanych od 590 pacjentów hospitalizowanych i z leczenia otwartego, u których wystąpiły objawy zapalenia opon mózgowych lub od pacjentów którym z innych powodów wykonano punkcję lędźwiową. Pacjenci potwierdzani byli jako dodatni jeśli wynik posiewu PMR był dodatni.

Wyniki badań testu [REDACTED] opracowano standardowymi metodami. Specyficzność wyniosła 99% (557/560), z 95% przedziałem ufności = 98% - 100%. Czułość wyniosła 97% (29/30), z 95% przedziałem ufności = 84% - 100%. Jedna próbka dodatnia nie została wykryta testem [REDACTED], ale w odpowiedniej hodowli wyrosły tylko 2 kolonie.

		PMR	Hodowla
		+	-
[REDACTED]	+	29	3
Wynik	-	1	557

Czułość = 97% (84% - 100%)

Specyficzność = 99% (98% - 100%)

Dokładność = 99% (98% - 100%)

REAKCJE KRZYŻOWE

Badanie PMR

Zarówno Enterowirusy jak i bakterie wyizolowano z 61 *S. pneumoniae*-ujemnych próbek PMR sprawdzanych w powyższych badaniach prospektywnych. Sześćdziesiąt (60) z tych próbek okazało się ujemnymi w oznaczeniu testem [REDACTED] ze specyficznością 98%. Jedna dodatnia próbka zawierała *Enterococci*. Jednakże, drugi płyn mózgowo-rdzeniowy zawierający *Enterococci* wykazał wynik ujemny w teście [REDACTED] tak, jak w badaniu hodowli czystych kultur (zobacz *Badanie Czystych kultur* na następnej stronie).

Bakteria/wirus izolowany z PMR	Liczba próbek	Specyficzność
Enterovirus	24	100%
<i>Acinetobacter</i>	3	100%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	100%
<i>C. diphtheriae</i>	1	100%
<i>Enterobacter</i>	2	100%
<i>Enterococci</i>	2	50%
<i>Escherichia coli</i>	2	100%
<i>Haemophilus influenzae</i> type B	1	100%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	100%
<i>Morganella morganii</i>	1	100%
<i>Neisseria meningitidis</i>	3	100%

<i>Staphylococcus koagulazo-ujemne</i>	9	100%
<i>Staphylococcus koagulazo-dodatnie</i>	2	100%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	100%
<i>Streptococcus Groupa A</i>	1	100%
<i>Streptococcus Groupa B</i>	1	100%
<i>Streptococcus viridans</i>	4	100%
ogółem	61	98%

Badanie czystych kultur

Oprócz bakteryjnych i wirusowych infekcji napotkanych w części badań prospektywnych, [REDAKT] zebrał dodatkowo zestaw potencjalnych czynników dających reakcje krzyżowe, zawierający najbardziej powszechne czynniki bakteryjne i wirusowe wywołujące zapalenie opon mózgowych. Wszystkie bakterie były sprawdzane testem [REDAKT] przy gęstości zawiesiny w zakresie od 10^7 to 10^8 jtk/ml. Wirusy były sprawdzane przy 10^5 I.U./ml lub wyżej. [REDAKT] Test wykazał 100% specyficzności, dając ujemne wyniki dla wszystkich zbadanych wirusów i bakterii.

Chłoniak Burkitta (wirus EpsteinBarr)

Coxsackie A7 Wirus

Coxsackie B3 Wirus

Echovirus

Enterococcus faecium

Haemophilus influenzae A

Haemophilus influenzae B

Haemophilus influenzae C

Haemophilus influenzae D

Haemophilus influenzae E

Haemophilus influenzae F

Haemophilus influenzae, nieoznaczony typ (51997)

Haemophilus influenzae, nieoznaczonym typ (35891)

Herpes Simplex Wirus Typ 1

Herpes Simplex Wirus Typ 2

Listeria monocytogenes (19115)

***Listeria monocytogenes* (19424)**

Neisseria meningitidis serogroupa A

***Neisseria meningitidis* serogroupa B**

***Neisseria meningitidis* serogroupa C**

***Neisseria meningitidis* serogroupa D**

Neisseria meningitidis serogroupa L

Streptococcus oralis (35037)

CZYNNIKI INTERFERUJĄCE

Próbki PMR z podwyższoną liczbą białych krwinek (1×10^4 komórek/ml), czerwonych krwinek (30 komórek/ml), z białkiem (3g/dl), bilirubiną (100 µg/ml), zbadane były za pomocą testu [REDAKT]. Nie wykryto wpływu tych czynników na pracę testu.

BADANIE ODTWARZALNOŚCI

Badania testu [REDAKT] na próbkach ślepych były przeprowadzone w trzech osobnych laboratoriach z zastosowaniem kodowanych próbek ślepych obejmujących próbki ujemne, słabo dodatnie oraz umiarkowanie dodatnie. Analitycy oznaczali każdą próbkę wielokrotnie w ciągu trzech różnych dni. Sto procent (100%) z 270 próbek dało spodziewane wyniki.

INFORMACJE KATALOGOWE

Numery katalogowe:

[REDAKT]