



MICROTITRE PLATE HAEMAGGLUTINATION KIT
GEBRAUCHSANWEISUNG

TPHA Microtitre Plate Kit: Für die qualitative Bestimmung von *Treponema pallidum*.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Syphilis ist eine Geschlechtskrankheit, die vom Spirochäten-Mikroorganismus *Treponema pallidum* hervorgerufen wird. Dieser Organismus kann nicht auf künstlichen Medien kultiviert werden, weshalb die Diagnose der Syphilis von der Korrelation klinischer Daten mit dem durch serologische Tests nachgewiesenen spezifischen Antikörper abhängt. Für die Erkennung der Syphilis gibt es zwei unterschiedliche Methoden. TPHA-Tests, um Antikörper gegen *Treponema pallidum* zu erkennen, und nicht-treponemale serologische Tests, um bei Infizierten einen antikörperartigen Stoff mit der Bezeichnung Reagin zu erkennen.

VERWENDUNGSZWECK

Das Reagens ist ein Latex-Testreagens, das qualitativ und semi-quantitativ eingesetzt werden soll, um das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von *T. pallidum*-Antikörpern im Serum oder Plasma von Patienten zu bestimmen, wenn die Tests in Übereinstimmung mit den in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen empfohlenen Methoden durchgeführt werden.

GRUNDSATZ

Die TPHA (Treponema-Pallidum-Hämagglutination) ist ein indirekter Hämagglutinationstest zur qualitativen und semi-quantitativen Erkennung spezifischer *T. pallidum*-Antikörper in humanem Serum. Stabilisierte Vogelerthrozyten, sensibilisiert mit einer antigenischen *T. pallidum*-Lösung, agglutinieren beim Vorhandensein von *T. pallidum*-Antikörpern und ergeben ein charakteristisches Muster. Erfolgt keine Agglutination, zeigt dies im Allgemeinen das Nichtvorhandensein von Antikörpern an (siehe **Einschränkungen**).

KIT-BESCHREIBUNG

Das Lorne TPHA Kit erkennt *T. pallidum*-Antikörper. Die Testzellen sind erhaltene Vogelerthrozyten, die mit antigenischen Komponenten des pathogenen *T. pallidum* (Stamm Nichols) beschichtet sind. Alle nichtspezifischen Reaktionen werden anhand der Kontrollzellen erkannt, Vogelerthrozyten, die nicht mit *T. pallidum*-Antigenen beschichtet sind. Mit Kontrollzellen können weiters nichtspezifische Reaktionen absorbiert werden. Antikörper zu nicht pathogenen Treponemen werden von einem Extrakt von Reiter-Treponemen in der Zellsuspension absorbiert. Die Reagenzien enthalten weder CMR-Stoffe oder Stoffe mit endokriner Wirkung oder Stoffe, die beim Benutzer zu einer Sensibilisierung oder einer allergischen Reaktion führen könnten, noch bestehen sie aus solchen Stoffen. Die Reagenzien werden mit der optimalen Verdünnung zur Verwendung mit allen empfohlenen Methoden geliefert, ohne dass sie weiter verdünnt werden müssen oder ihnen etwas hinzugefügt werden muss. Die Los-Referenznummer und das Ablaufdatum befinden sich auf den **Etiketten der Epruvetten**.

LAGERUNG

Alle Komponenten des Kits bleiben bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Ablaufdatum stabil, wenn sie fest verschlossen bei 2-8 °C gelagert werden und während ihrer Verwendung Kontaminationen verhindert werden. Nicht einfrieren: gefrorene Reagenzien könnten die Funktionalität des Tests ändern. Die Epruvetten in vertikaler Position lagern. Bei einer Lagerung in einer horizontalen Position können Zellcluster entstehen. Bei Änderung der Position sanft mischen, um möglicherweise vorhandene Aggregate aufzulösen. Verschlechterung der Reagenzien: Vorhandensein von Clustern, Partikeln und Trübungen.

PROBEN

Frisches Serum oder Plasma. Stabil für 8 Tage bei 2-8 °C oder für 3 Monate bei -20 °C. Die Proben mit vorhandenem Fibrin sollten vor der Untersuchung zentrifugiert werden. Keine stark hämolysierten oder lipämischen Proben verwenden.

VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Das Kit ist nur für die *In-vitro*-Diagnostik vorgesehen.
2. Das Kit nicht nach dem Ablaufdatum verwenden (siehe **Etiketten auf Epruvette und Schachtel**).
3. Bei der Handhabung der Reagenzien ist Schutzkleidung wie Einmalhandschuhe und ein Laborkittel zu tragen.
4. Die Reagenzien in diesem Kit wurden zur Reduzierung der Keimbelastung verarbeitet, werden jedoch nicht steril geliefert. Nach erfolgter Öffnung einer Epruvette sollten die Inhalte bis zum Ablaufdatum brauchbar sein.
5. Von den bekannten Tests kann keiner garantieren, dass die aus menschlichen oder tierischen Quellen abgeleiteten Produkte frei von Infektionserregern sind. Bei der Verwendung und Entsorgung einer jeden Epruvette und ihrer Inhalte ist mit Vorsicht vorzugehen.

ENTSORGUNG DES KIT-REAGENS UND UMGANG MIT VERSCHÜTTUNGEN

Für Informationen zur Entsorgung des Kit-Reagens und der Dekontaminierung bei Verschüttungen siehe die **Sicherheitsdatenblätter**, die auf Anfrage verfügbar sind.

KONTROLLEN UND RAT

1. Es wird empfohlen, dass mit jeder Testserie parallel die TPHA-positiven und -negativen Kontrollen getestet werden. Zeigen die Kontrollen nicht die erwarteten Ergebnisse, sind die Tests als ungültig zu betrachten.
2. Alle Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung 18-25 °C erreicht haben.
3. Die Kontamination der Reagenzien oder des Serums mit Speichel vermeiden, da dies bei Proben zu falsch positiven Ergebnissen führt.
4. Die Komponenten aus unterschiedlichen Kits nicht untereinander austauschen.
5. Die Verwendung des Kits und die Interpretation der Ergebnisse muss von ordnungsgemäß geschultem und qualifiziertem Personal in Übereinstimmung mit den Anforderungen des Landes, in dem das Kit verwendet wird, durchgeführt werden, und der Benutzer muss bestimmen, ob sich das Kit zur Verwendung bei anderen Methoden eignet.

MITGELIEFERTE KIT-KOMPONENTEN

- 1) R1: Testzellen (gelbe Kappe, 1x7,5 ml): Stabilisierte Vogelerthrozyten, sensibilisiert mit *T. pallidum* (Nichols)-Antigenen, Konservierungsmittel, pH 7,2.
- 2) R2: Kontrollzellen (grüne Kappe, 1x7,5 ml): Stabilisierte Suspension von Vogelerthrozyten, Konservierungsmittel, pH 7,2.
- 3) R3: TPHA-Verdüner (weiße Kappe, 2x10 ml): Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2, Extrakt von *T. pallidum* (Reiter), Konservierungsmittel.
- 4) Kontrolle + (rote Kappe, 1x1 ml): Menschliches Immunsrum, vorverdünnt 1:20, Konservierungsmittel.
- 5) Kontrolle - (blaue Kappe, 1x1 ml): Tierisches Serum, Konservierungsmittel.

ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN UND GERÄTE

- a) Genaue Pipetten.
- b) Mikrotiterplatten mit „U“-förmiger Vertiefung.

QUALITATIVE METHODE

1. Die Reagenzien und die Probe Raumtemperatur erreichen lassen.
2. Sowohl die Epruvette mit den Test- als auch die mit den Kontrollzellen unmittelbar vor der Verwendung sanft, aber gründlich schütteln.
3. Die Probe 1:20 mit Verdüner verdünnen (10 µl Serum + 190 µl Verdüner (R3)).

4. In nebeneinanderliegende Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettieren:

	Testvertiefung	Kontrollvertiefung
Probe 1:20 oder Kontrolle*	25 µl	25 µl
Kontrollzellen	--	75 µl
Testzellen	75 µl	--

*Für jede getestete positive Kontrolle oder negative Kontrolle oder Patientenprobe sind jeweils 1 Testvertiefung und 1 Kontrollvertiefung erforderlich.

- Die Mikrotiterplatte gründlich mischen, bis homogene Zellen / eine homogene Probe erreicht werden.
- Die Mikrotiterplatte abdecken und 45-60 Min. bei Raumtemperatur inkubieren. Die Mikrotiterplatte von Erschütterungen, Hitze und direkter Sonneneinstrahlung fernhalten.
- Die Agglutinationsmuster der Zellen makroskopisch untersuchen.

SEMI-QUANTITATIVE METHODE

- Für jede Probe sind 8 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte erforderlich, mit den Buchstaben A bis H gekennzeichnet.
- In die Vertiefungen B bis H einschließlich 25 µl Verdüner geben.
- 25 µl der mit 1:20 verdünnten Probe, siehe **qualitative Methode** oben, in die Vertiefungen A und B übertragen.
- 25 µl der verdünnten Probe von Vertiefung B nehmen und verdoppelte Verdünnungen der Probe von Vertiefungen B bis einschließlich H durchführen. Dabei 25 µl der verdünnten Probe von Vertiefung H verwerfen.
- Den Vertiefungen A bis H einschließlich 75 µl Testzellen hinzufügen.
- Die Mikrotiterplatte sanft schütteln, um die Inhalte gründlich zu mischen.
- Die Mikrotiterplatte abdecken und 45-60 Min. bei Raumtemperatur inkubieren. Die Mikrotiterplatte von Erschütterungen, Hitze und direkter Sonneneinstrahlung fernhalten.
- Die Agglutinationsmuster der Zellen makroskopisch untersuchen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse anhand des Vergleichs der Agglutinationsmuster der Testzellen mit den Kontrollzellen ablesen. Die Punktevergabe und Meldung der Anzeigen erfolgt in Übereinstimmung mit den folgenden Kriterien:

Grad der Hämagglutination	Anzeige	Ergebnis
Glatte Ansammlung von Zellen, die den gesamten Boden der Vertiefung bedeckt, manchmal mit gefalteten Kanten	4+	Reaktiv
Glatte Ansammlung von Zellen, die einen Teil des Bodens der Vertiefung bedeckt	3+	Reaktiv
Glatte Ansammlung von Zellen umgeben von einem roten Kreis	2+	Reaktiv
Glatte Ansammlung von Zellen, die einen kleineren Bereich abdeckt und von einem kleineren roten Kreis umgeben ist	1+	Reaktiv
Zellen in Knopfform mit einem kleinen Loch in der Mitte	±	Grenzfall
Zellen in definitiver, kompakter Knopfform, manchmal mit einem sehr kleinen Loch in der Mitte.	-	Negativ

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

- Die negative Kontrolle sollte weder bei den Testzellen noch bei den Kontrollzellen ein Agglutinationsmuster aufweisen.
- Die positive Kontrolle sollte nur bei den Testzellen Agglutinationsmuster aufweisen.
- Ein von den Kontrollzellen ausgewiesenes Agglutinationsmuster zeigt das Vorhandensein von nicht spezifischen Antikörpern an und kann nicht interpretiert werden.
- Proben mit einem Muster, das einen Grenzfall darstellt, sollten erneut getestet und als negativ gemeldet werden, wenn erneut das gleiche Muster reproduziert wird.

- Reaktive Proben sollten wie bei der semi-quantitativen Methode oben beschrieben ausstritiert werden. Der Serumtiter wird als die höchste Verdünnung, die ein reaktives Ergebnis anzeigt, definiert.
- Eine klinische Diagnose sollte nicht aufgrund der Erkenntnisse durch ein einziges Testergebnis gestellt werden, sondern sollte sowohl klinische als auch Labordaten umfassen.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Dieses Kit kann nicht zwischen der Syphilis und anderen pathogenen Treponemeninfektionen, z. B. Frambösie, unterscheiden, weshalb stets der klinische Nachweis berücksichtigt werden sollte. Es wird empfohlen, dass alle positiven Ergebnisse anhand eines Alternativverfahrens wie FTA-ABS bestätigt werden.
- Das Lorne TPHA Syphilis Kit ist hochspezifisch; es wurden jedoch bei Proben von Patienten mit Mononukleose, Lepra, Borreliose, Autoimmunerkrankungen und Drogenabhängigkeit falsch positive Ergebnisse beschrieben.
- Der TPHA-Test ist nicht sinnvoll für die Bestimmung der Wirksamkeit der Therapie, da der Antikörperspiegel (der ein positives Testergebnis anzeigen würde) einige Zeit nach der klinischen Heilung der Erkrankung bestehen bleibt.
- Falsch positive oder falsch negative Ergebnisse können auch auftreten aufgrund von:
 - Kontamination von Testmaterialien
 - Unsachgemäßer Lagerung von Testmaterialien oder Auslassung eines Reagens
 - Abweichung von den empfohlenen Methoden

BESTIMMTE LEISTUNGSMERKMALE

- Das Kit zeichnete sich durch in den **empfohlenen Methoden** erwähnte Verfahren aus.
- Vor der Freigabe wird jedes Los des Lorne TPHA-Syphilis Kits anhand von **empfohlenen Methoden** getestet, um eine angemessene Reaktivität sicherzustellen.
- Bilirubin (≤ 20 mg/dl), Hämoglobin (≤ 10 g/l), Lipide (≤ 10 g/l) und Rheumafaktoren (≥ 300 IU/ml) wirken sich nicht störend aus. Es können andere Stoffe störend einwirken¹.
- Analytische Sensitivität:** 0,1 IU/ml wie anhand des 1. internationalen Standards für IgG und IgM aus syphilitischem Humanplasma getestet, NIBSC-Code 05/132.
- Prozoneneffekt:** Bis zu den Titern $\geq 1/163840$ wurde kein Prozoneneffekt erkannt.
- Diagnostische Sensitivität:** 100 %
- Diagnostische Spezifität:** 100 %.

HAFTUNGSAUSSCHLUSS

- Für das Leistungsverhalten der Reagenzien nach einem anderen Verfahren als den in den **empfohlenen Methoden** erwähnten ist der Benutzer verantwortlich.
- Alle Abweichungen sollten vor der Verwendung anhand von etablierten Laborverfahren validiert werden.

BIBLIOGRAPHIE

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

VERFÜGBARE KIT-GRÖSSEN

Kit-Größe	Katalognummer
100 Tests je Kit	043100A



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



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