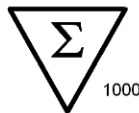




MICROSYPH™ TPHA1000

IVD

REF **FTPHA1000**



Nur für den Fachgebrauch



Axis-Shield Diagnostics Limited
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

DEUTSCH: VERWENDUNGSZWECK

Der MICROSYPH™ TPHA1000 ist ein Schnelltest zum Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* in Humanserum oder Plasma (EDTA-, Citrat- oder Heparin-Plasma) durch indirekte Hämagglutination. Dieser Testkit ist als Suchtest für Screening-Untersuchungen konzipiert.

EINLEITUNG

Bei Syphilis handelt es sich um eine durch *Treponema pallidum* Subspezies *pallidum* verursachte, sexuell übertragbare Infektionskrankheit. Da Treponemen nicht *in-vitro* kultiviert werden können, erfolgt die Diagnose von Syphilis mit Hilfe des klinischen Befundes und dem Nachweis spezifischer Antikörper durch serologische Tests. Serologische Syphilis-Suchtests unter Verwendung von Cardiolipin und Lecithin als Antigene sind einfach durchzuführen, es kommt jedoch häufig zu falsch positiven Reaktionen, da in diesen Tests keine Antigene aus *T. pallidum*¹ eingesetzt werden. Für TPI- und FTA-ABS-Tests wird pathogenes *T. pallidum* als Antigen verwendet, allerdings sind diese Tests in der Routineserodiagnostik problematisch. Für den TPI-Test ist lebendes pathogenes *T. pallidum* erforderlich und für den FTA-ABS-Test wird ein Fluoreszenzmikroskop benötigt. Für beide Tests sind umfangreiche Fachkenntnisse erforderlich.

TPHA-Assays haben sich als geeigneter und spezifischer Test in der Diagnose von Treponemeninfektionen erwiesen, sie zeigen eine ähnliche Spezifität, wie der TPI-Test⁶ und eine Sensitivität, die mit derjenigen des FTA-ABS-Tests⁷ vergleichbar ist. Sie benötigen ein Minimum an Laborausstattung und sind sehr einfach durchzuführen. Bei Anfall grosser Probenserien können sie automatisiert durchgeführt werden.

PRINZIP DES ASSAYS

MICROSYPH™ TPHA1000 dient dem Nachweis von humanen Antikörpern gegen *T. pallidum* in Serum oder Plasma nach dem Prinzip der indirekten Hämagglutination (IHA). Konservierte Hühnererythrozyten werden mit antigenen Bestandteilen des pathogenen *T. pallidum* (Stamm Nichols)²⁻⁵ sensibilisiert. Diese Testzellen agglutinieren in Gegenwart spezifischer Antikörper gegen *T. pallidum* und bilden charakteristische Agglutinationsmuster in Mikrotiterplatten.

Antikörper gegen nicht pathogene Treponemen werden durch einen in der Zellsuspension befindlichen Extrakt von Reiter'schen Treponemen absorbiert. Die Testresultate liegen innerhalb von 60 Minuten vor, die Agglutinationsmuster sind einfach auswertbar und stabil.

Zur Vereinfachung des Probenverdünnungsschritts wurde dem Diluent ein blauer Farbstoff zugefügt. Die Farbe verändert sich nach Zugabe der Probe.

BESTANDTEILE DES TESTKIT

TEST CELLS	2 × 40 mL	<p>Mit <i>T. pallidum</i> Antigen sensibilisierte, konservierte Hühnererythrozyten in Pufferlösung.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Die Testzellen sind vor Gebrauch gründlich zu suspendieren. <input type="checkbox"/> Die Testzellen setzen sich während der Lagerung ab. <input type="checkbox"/> Es ist wichtig, dass die Zellen während der Lagerung bei 2° - 8° C mit Pufferlösung bedeckt sind.
DIL	1 × 250 mL	<p>Pufferlösung enthält blauen Farbstoff und 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Gebrauchsfertig.
CONTROL +	1 × 0,5 mL	<p>Defibriniertes menschliche Syphilis Plasma mit Antikörpern gegen <i>T. pallidum</i>. Das verwendete Humanplasma ist nicht reaktiv gegenüber Hepatitis-B-Oberflächenantigen, HCV-, HIV-Antigen und HIV-Antikörpern, wenn der Nachweis mit von der FDA zugelassenen Tests durchgeführt wird.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Vor Gebrauch verdünnen.
CONTROL -	1 × 0,5 mL	<p>Humanserum mit Antikörpern gegen <i>T. pallidum</i>. Das verwendete Humanserum ist nicht reaktiv gegenüber Hepatitis-B-Oberflächenantigen, HCV-, HIV-Antigen und HIV-Antikörpern, wenn der Nachweis mit von der FDA zugelassenen Tests durchgeführt wird. Enthält 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Vor Gebrauch verdünnen.

LAGERUNG DER REAGENZIEN

Die in den jeweiligen Testkits enthaltenen Reagenzien sind aufeinander abgestimmt. Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen dürfen nicht gegeneinander ausgetauscht werden.

Der Testkit ist **aufrecht stehend** und bei 2° - 8° C zu lagern. Reagenzien dürfen nach ihrem Verfallsdatum nicht verwendet werden. Reagenzien sind zu verwerfen, wenn sie verunreinigt sind oder mit den positiven bzw. negativen Kontrollen nicht die vorschriftsmäßige Reaktion erzielt wird.

Ein Testkit wurde ohne Beeinträchtigung seiner Funktion über einen Zeitraum von 52 Wochen fünf Mal geöffnet und geschlossen.

PROBENSAMMLUNG UND AUFBEWAHRUNG

Es können Serum- oder Plasmaproben verwendet werden. Nach Zugabe eines Konservierungsmittels, z. B. 0,1% Natriumazid, können die Proben bei 2° - 8° C gelagert werden. Für eine Langzeitlagerung sind die Proben bei -20° C aufzubewahren. Vor einem Assay sind alle sichtbaren Feststoffe durch Zentrifugieren zu entfernen.

PROBENVERDÜNNUNG

Die Proben, die positive und negative Kontrolle sind im Verhältnis 1 zu 20 mit Diluent zu verdünnen. Das Diluent enthält einen Farbstoff, dessen Farbe nach Zugabe der Proben oder Kontrollen von blau nach grün/gelb wechselt.

Zur spektralphotometrischen Überprüfung der Probenzugabe sind die Proben gemäß den Schritten 1 - 2 des Testprotokolls zu verdünnen. Vor der Durchführung von Schritt 3 ist die Mikrotiterplatte mit einem Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm und soweit verfügbar bei einer Referenzwellenlänge von 690 nm zu messen. Wenn die optische Dichte (O.D.) unter 0,2 liegt, ist das vorliegende Probenvolumen zu gering und es ist eine neue Probenverdünnung anzufertigen.

Beachten Sie bitte, dass für die positiven und negativen Kontrollen wegen ihrer Zusammensetzung O.D.-Werte unter 0,2 erhalten werden können.

Verdünnte Proben und Kontrollen müssen innerhalb eines Arbeitstages verwendet werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur für die Anwendung als In-vitro-Diagnostikum.

1. Die in dieser Testanleitung enthaltenen Anweisungen, besonders die Handhabungs- und Lagerungsvorschriften, sind genauestens zu befolgen.
2. Eine Kontamination von Reagenzien oder Proben mit Speichel ist unbedingt zu vermeiden, da hierdurch falsch positive Ergebnisse erhalten werden können.
3. Die Kontrollen enthalten Humanserum oder Humanplasma, welches mit von der FDA für Hepatitis-B-Oberflächenantigen, HCV-, HIV-Antigen und HIV-Antikörper zugelassenen Tests untersucht und als nicht reaktiv/negativ befunden wurde. Da kein bekannter Test die absolute Gewähr bieten kann, dass Produkte aus menschlichem Blut pathogenfrei sind, müssen die Kontrollen als potentiell infektiös eingestuft und unter Beachtung der gleichen Sicherheitsrichtlinien gehandhabt werden, die für andere potentiell gefährliche biologische Stoffe gelten. US Department of Human Health Services "*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*" (US-Gesundheitsministerium "Biosicherheit in Mikrobiologischen und Biomedizinischen Laboratorien"), 5. Auflage, Washington, DC: US Government Printing Office, Januar 2007,¹⁴ beschreibt, wie diese Materialien sollten in Übereinstimmung mit der Guten Laborpraxis behandelt werden.
4. Nicht mit dem Mund pipettieren.
5. In Bereichen, in denen Testkits und Proben gehandhabt werden, nicht rauchen, essen, trinken und keine Kosmetika anwenden.
6. Erkrankte Hautareale, Schnitte, Abschürfungen und andere Hautläsionen ausreichend schützen.
7. Das Diluent und die negative Kontrolle enthalten 0,1% Natriumazid.

Diluent	EUH032	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
Positiv-Kontrolle		

Auch wenn das vorhandene Natriumazid nur in niedriger Konzentration vorliegt, darf dieses nicht durch Ausgussbecken mit Geruchverschlüssen oder Abflussleitungen aus Metall entsorgt werden, um eine Explosionsgefahr aufgrund der Ansammlung von Blei- oder Kupfersalzen auszuschliessen. Nach dem Gebrauch sind die Abflüsse mit Wasser zu spülen.

8. Sicherheitsdatenblätter für alle in diesem Testkit enthaltenen Stoffe sind auf Anfrage von Axis-Shield Diagnostics erhältlich.

PRÄPARATION

Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Materialien/Geräte

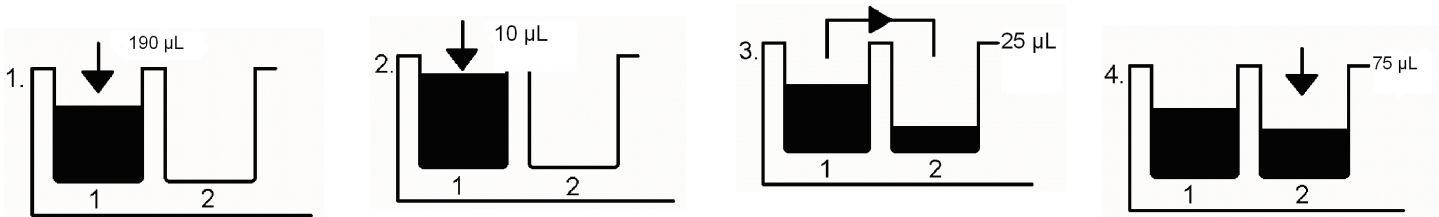
1. Präzise und in gutem Zustand befindliche Pipetten zum Abmessen von 10, 25, 75 und 190 Mikrolitern.
2. Starre Mikrotiterplatten mit U-förmigen Kavitäten.
3. Mikrotiterplattenphotometer und/oder Mikrotiterplattenprozessor (optional). Die Geräte sowie die Auswertungssoftware sind vor Gebrauch und Inbetriebnahme gemäß den Anweisungen des Herstellers zu validieren, zu pflegen und zu kalibrieren.

Geliefertes Material

Der FTPHA1000 Testkit enthält ausreichend Reagenzien zur Durchführung von 1000 manuellen Bestimmungen. Die Anzahl der mit automatischen Mikrotiterplattenprozessoren durchführbaren Bestimmungen ist abhängig von den individuellen Eigenschaften des Gerätes.

TEST PROTOKOLL

1. Für jede Bestimmung werden 2 Kavitäten in der Mikrotiterplatte benötigt. Die Mikrotiterplatte mit einem sauberen, feuchten Lappen oder Papiertuch abwischen, um eine statische Aufladung zu vermeiden. 190 μL Diluent in die Kavität 1 pipettieren.
2. 10 μL der Probe in die Kavität 1 pipettieren. Den Inhalt von Kavität 1 mit einer Pipette mischen. Anmerkung: Für die positive und negative Kontrolle werden weitere Kavitäten benötigt. Die Kontrollen sind so zu behandeln, wie die Proben.
3. 25 μL in die Kavität 2 übertragen.
4. 75 μL der vollständig suspendierten Testzellen in die Kavitäten pipettieren, in denen sich 25 μL der verdünnten Probe bzw. Kontrolle befinden.



5. Den Inhalt der Mikrotiterplatte mischen, dazu leicht an alle vier Seiten der Platte klopfen.
6. Mindestens 60 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
Vorsicht: Die Mikrotiterplatte vor Wärme, direkter Sonneneinstrahlung und jeglichen Vibrationen schützen.
7. Ergebnisse ablesen. Wenn ein Mikrotiterplattenphotometer eingesetzt wird, ist die Platte zuerst visuell zu lesen, da die Platte bei der Herausgabe aus dem Gerät möglicherweise geschüttelt wird.

ABLESEN DER ERGEBNISSE

Visuell

Positives Ergebnis

Ein stark positives Ergebnis erscheint als glatte Zellenmatte auf dem Boden der Kavität, manchmal mit Falten an den Rändern. Bei weniger stark reagierenden Proben ist diese Matte kleiner und kann innerhalb eines Zellenrings liegen.

Negatives Ergebnis

Ein negatives Ergebnis wird durch einen kompakten Zellenknopf mit oder ohne sehr kleinem mittigen Loch angezeigt.

Fragliches Ergebnis

Ein fragliches Ergebnis erscheint als Zellenknopf mit einem kleinen, mittigen Loch, es erscheint als deutlich definierter, dichter Ring auf einem ziemlich klaren Hintergrund.

Kollabiertes Ergebnis

Einige sehr stark positive Proben können in der 1:80 Verdünnung im Test kollabierende Agglutinationsmuster ergeben. Diese Muster sind mit dem eines fraglichen Ergebnisses vergleichbar, allerdings kann der dichte Ring gezackt (ausgefranst) sein.

Spektralphotometrisch

Spektralphotometrisch erzielte Ergebnisse sind visuell zu überprüfen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die negative Kontrolle darf keine Agglutination verursachen, demgegenüber muss die positive Kontrolle in dem Test zur Agglutination führen. Sollte dieses nicht eintreten, ist der Test ungültig und die Ergebnisse dürfen nicht verwendet werden. Wenn der Test wiederholt wird, ist eine neue Verdünnung für jede Probe und jede Kontrolle anzufertigen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Zeigt eine Probe in dem Test ein positives Ergebnis, dann ist sie als reaktiv zu bewerten. Soweit im Einzelfall nicht anders vorgeschrieben, sind derartige Proben unter Verwendung der Originalprobe in Doppelbestimmung erneut zu testen. Proben, die in wenigstens einem der Wiederholungstests reaktiv sind, werden als wiederholt reaktiv in dem MICROSYPH™ TPHA1000 Test bewertet. Derartige Proben sind weiter zu untersuchen und die Ergebnisse des Tests sind zusammen mit anderen klinischen und/oder Analyseresultaten auszuwerten.

Ein negatives Ergebnis zeigt das Nichtvorhandensein von Antikörpern gegen *T. pallidum* an. In einigen Fällen von Frühsyphilis kann es zu einem negativen Ergebnis kommen (**siehe dazu Anwendungsgrenzen**).

Ein fragliches Ergebnis kann einen niedrigen Antikörperspiegel bei Frühsyphilis, eine behandelte Altsyphilis oder Framboesia anzeigen. In derartigen Fällen ist die Probe erneut zu testen. Sollte dies nicht möglich sein, ist möglichst umgehend dem Patienten eine neue Probe zu entnehmen und der Test ist zu wiederholen, dabei ist der klinische Zustand des Patienten zu berücksichtigen.

ANWENDUNGSGRENZEN

1. Der MICROSYPH™ TPHA1000 Testkit enthält keine Kontrollzellen. Ein positives Ergebnis kann daher auf eine nicht spezifische Reaktion der Probe mit den Zellen zurückzuführen sein. Um diese Möglichkeit auszuschließen, sind die im Test reaktiven Proben unter Verwendung des MICROSYPH™ TPHA200 Testkits (FTPHA200) neu zu bestimmen.
Zur Bestätigung eines positiven Ergebnisses ist der FTA-ABS-Test einzusetzen, da hiermit eine Differenzierung zwischen IgG- und frühen IgM-Antikörpern möglich ist. Der FTA-ABS-Test ist darüber hinaus bei Frühsyphilis durchzuführen, da der Hämagglutinationsassay hier negativ ausfallen kann.
Zur Therapiekontrolle ist ein quantitativer Nachweis, wie z. B. ein RPR-Test durchzuführen. Dieser Testkit ist von Axis-Shield Diagnostics Ltd erhältlich.
2. Obwohl der MICROSYPH™ TPHA1000 Test sehr spezifisch ist, ist das Auftreten von falsch positiven Ergebnissen bei Patienten beobachtet worden, die an Lepra, infektiöser Mononukleose und Bindegewebserkrankungen leiden.
3. Serologische Tests, einschließlich des MICROSYPH™ TPHA1000 Tests, können nicht zwischen Syphilis und anderen Formen pathogener Treponemeninfektionen⁸, z. B. Framboesia⁷, unterscheiden. Welche Infektion vorliegt, ist anhand des klinischen Befundes zu ermitteln.
4. Die mit dem MICROSYPH™ TPHA1000 Test gefundenen Antikörper sind persistierend nach erfolgreicher Behandlung. Aus diesem Grunde kann ein positiver Nachweis frühere oder kürzliche Infektionen^{6,7,9,10} anzeigen.
5. In Folge einer Infektion mit *T. pallidum* können innerhalb von 1 bis 4 Wochen nach Ausbildung der charakteristischen Syphilisläsion (Schanker) Antikörper (sowohl Lipoid- als auch Treponemenantikörper) auftreten. Bei früher Primärsyphilis können daher Tests, wie der MICROSYPH™ TPHA1000 bei einigen Proben^{11,12,13} ein negatives Ergebnis ergeben. Im Spätstadium einer latenten/behandelten syphilitischen Infektion können die Antikörperspiegel unterhalb der Nachweisgrenze des MICROSYPH™ TPHA1000 Assays liegen und damit zu negativen Testergebnissen führen. In diesen Fällen sind alternative Testmethoden einzusetzen, wie z. B. der mikroskopische Nachweis von *T. pallidum*.
6. Mit Mikrotiterplattenphotometern erzielte Ergebnisse sind visuell zu überprüfen. In Abhängigkeit von den Messparametern können einige fragliche oder kollabierte Agglutinationsmuster fälschlicherweise als Grenzfall oder negativ bewertet werden.

7. Dieser Test darf nur mit individuellen (unvermischten) Serum- oder Plasmaproben durchgeführt werden.
8. Bei Verwendung von hämolysierten Proben, unvollständig geronnenen, fibrinhaltigen Plasmaproben bzw. bei mikrobiell verunreinigten Proben sind falsche Ergebnisse nicht auszuschließen.

LEISTUNGSMERKMALE

Spezifität

1.000 Proben von Blutspendern (500 Seren und 500 Plasmen) wurden mit einer Testkitcharge untersucht und weitere 1.000 Spenderproben (500 Seren und 500 Plasmen) wurden mit einer zweiten Testkitcharge untersucht. Die Ergebnisse sind nachstehend aufgeführt.

Anzahl der Proben	Testkit-charge	Anzahl positiver oder fraglicher Proben		Spezifität
		Erst-nachweis	Wiederholung	
500 Serum	1	0	0	100%
500 Plasma	1	2	0	100%
500 Serum	2	0	0	100%
500 Plasma	2	0	0	100%

Spezifität mit potentiell kreuzreaktiven Proben

71 potentiell kreuzreaktive Proben wurden mit einer Testkitcharge untersucht und weitere 72 Proben wurden mit einer zweiten Testkitcharge untersucht. Die Ergebnisse sind nachstehend aufgeführt.

Anzahl der Proben	Testkit-charge	Anzahl positiver oder fraglicher Proben	Spezifität
71 (siehe Anmerkung 1)	1	0	100%
72 (siehe Anmerkung 2)	2	0	100%

Anmerkung 1 : 18 Rheumafaktor positive, 9 Lyme-Borreliose positive, 5 Anti-Cardiolipin positive, 16 pränatale, 12 HCV positive, 6 HIV positive und 5 HBV positive Proben.

Anmerkung 2 : 18 Rheumafaktor positive, 9 Lyme-Borreliose positive, 5 Anti-Cardiolipin positive, 16 pränatale, 12 HCV positive, 6 HIV positive und 6 HBV positive Proben.

Sensitivität

137 mittels ELISA positiv gemessene Proben wurden mit zwei Testkitchargen untersucht. Die Ergebnisse sind nachstehend aufgeführt.

Anzahl der Proben	Testkit-charge	Anzahl negativer Proben	Sensitivität
137	1	3	97,8%
137	2	2	98,5%

STANDARDISIERUNG

Die Analyse der WHO-Referenzpräparation 3-1980 in einer Verdünnung zwischen 1/2560 und 1/10240 ergab mit dem MICROSYPH™ TPHA1000 Testkit eine 50%ige Agglutinationsreaktion in fünf unabhängigen Bestimmungen unter Verwendung von drei Testkitchargen.

VERWEISE

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.

SYMBOLS



Für *In-vitro*-Diagnostikum



Bestellnummer



Ch.-B.



Ausreichend für 1000 Tests



Achtung, Begleitdokumente beachten



Verwendbar bis



Lagerung bei 2-8°C



Positiv-Kontrolle



Negativ-Kontrolle



Testzellen



Diluent



Global Trade Item Number



Hersteller



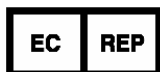
Axis-Shield Diagnostics Limited

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



EC Authorized Representative:

Medical Device Safety Service GmbH (MDSS)

Schiffgraben 41,
30175 Hannover,
Germany

Tel.: + (49) 511 6262 8630

Fax: + (49) 511 6262 8633

Ver 2019/09