



200 tests 72501

500 tests 72502



## TPHA TESTS

Kits for the qualitative and semi-quantitative detection of antibody to *Treponema pallidum* in human serum or plasma by passive haemagglutination



Newmarket Laboratories Ltd  
Lanwades Business Park,  
**Kentford, Newmarket, CB8 7PN – UK**

**Distributed by:**

Bio-Rad  
3 Boulevard Raymond Poincaré  
**92430 Marnes - la - coquette - France**



<b>TPHA 200</b>	<b>Produktcode 72501</b>	<b>200 Tests</b>
<b>TPHA Screening 500</b>	<b>Produktcode 72502</b>	<b>500 Tests</b>

**Kits für die qualitative und semiquantitative Detektion von *Treponema pallidum*-Antikörpern im menschlichen Serum oder Plasma mittels passiver Hämagglutination**

**IVD** Alle hergestellten und in den Verkehr gebrachten Reagenzien unterliegen einem Qualitätssicherungssystem, das sich vom Eingang der Rohmaterialien bis zum Vertrieb der Produkte erstreckt. Jede Charge unterliegt der Qualitätskontrolle und wird nur bei Konformität mit den Freigabekriterien in den Verkehr gebracht. Die Aufzeichnungen zu Produktion und Qualitätskontrolle einer jeden Charge befinden sich in unserer Firma.

**Klinischer Hintergrund**

Syphilis ist eine chronische Infektionskrankheit, die spezifische Infektionsstadien durchläuft: Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstadium. Die einzelnen Stadien sind durch unterschiedliche klinische Symptome gekennzeichnet. Im Anfangsstadium treten in der Regel Geschwüre auf (auch „harter Schanker“ genannt), gefolgt von Ausschlag und langen Ruhephasen im Krankheitsverlauf. Wird die Infektion nicht behandelt, kann sie zu Herzkreislaufproblemen und Neurosyphilis führen.

Auslöser der Krankheit sind die Spirochäten *Treponema pallidum*, die in der Regel beim Geschlechtsverkehr übertragen werden. Syphilis kann aber auch durch die Transfusion infizierten Bluts übertragen werden. Eine intrauterine Ansteckung ist ebenfalls möglich. Die Kultivierung der Bakterien in künstlichen Medien hat sich so gut wie unmöglich erwiesen. Der Nachweis der Bakterien erfolgt in der Regel durch den Nachweis von Antikörpern im Blut, die bereits kurz nach der anfänglichen Ansteckung auftreten.

Es gibt vier verschiedene Arten von Syphilis-Tests: direkter Nachweis unter dem Mikroskop, Treponemen-Antikörpertests, Nicht-Treponemen-Antikörpertests und direkte Antigentests. Aufgrund der langen Ruhephasen im Krankheitsverlauf und der Unspezifität der Nicht-Treponemen-Tests setzen sich Blutuntersuchungen zur Ermittlung spezifischer Anti-Treponemen-Antikörper bei Screenings immer mehr durch. Ein solcher Test ist der **TPHA-Test**.

**Verwendung**

Diese Kits zur Detektion von *Treponema-pallidum*-Antikörpern im menschlichen Serum und Plasma sind nur von angemessen ausgebildetem und qualifiziertem Personal zu verwenden.

**Testprinzip**

Die Testkits TPHA 200 und TPHA Screening 500 arbeiten auf der Grundlage konservierter Vogelerythrozyten, die mit *T. pallidum*-Antigenen (Nichols-Stamm) beschichtet sind. Diese binden sich an spezifische Antikörper im Serum oder Plasma des Patienten. Die Zellen sind in einem Medium suspendiert, das Substanzen zur Eliminierung unspezifischer Reaktionen enthält. Positive Reaktionen zeigen sich in der Agglutination der Zellen, negative Reaktionen durch das Absetzen der Zellen in Form eines Knopfs oder kleinen Rings.

Obgleich das Testkit in erster Linie für die Durchführung qualitativer Tests gedacht ist, können die Antikörper-Werte in jeweils zweifacher Verdünnung titriert werden.

Die Agglutinationsmuster können entweder mit dem Auge oder einem zum Auswerten von Agglutinationsmustern geeigneten Plattenleser ausgewertet werden.

### Inhalt

	Name	Reagenz	TPHA 200 Testkit (200 Tests) 72501	TPHA Screening- Kit 500 (500 Tests) 72502
R1	Testzellen	Mit <i>T. pallidum</i> - Antigenen beschichtete konservierte Hühnererythro- zyten	2 x 8,5 ml	2 x 20 ml
R2	Kontrollzellen	Konservierte Hühnererythro- zyten, unbeschichtet	2 x 8,5 ml	20 ml
R3	Verdünnungs- mittel	Absorbenzien enthaltende Kochsalzlösung	2 x 20 ml	125 ml
R4	Positivkontrolle	Humanserum-Titer 640-2560	0,5 ml	0,5 ml
R5	Negativ- kontrolle	Humanserum-Titer: <80	0,5 ml	0,5 ml
<b>Gebrauchsanweisung</b>				

### Warnhinweise

#### **Nur zur In-vitro-Diagnostik.**

Alle Reagenzien enthalten Natriumazid (weniger als 0,1% w/v). Flüssige Abfälle, die bei der Verwendung der Kits anfallen, sind mit viel Wasser wegzuspülen, um die Ansammlung potenziell explosiver Substanzen in den laboreigenen Rohrleitungen zu vermeiden.

Die zum Kit gehörigen Kontrollmaterialien sind aus menschlichem Serum hergestellt. Sie wurden auf Spenderebene getestet und als negativ in Bezug auf Hepatitis B und C sowie HIV 1 und 2 befunden. **Sie sollten jedoch so behandelt werden, als ob sie potenziell Krankheiten übertragen können.**

Serum- und Plasmaproben sind als mikrobiologische Gefahrenquelle zu behandeln und gemäß den geltenden Vorschriften und Gesetzen zu handhaben.

Nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.

Reagenzien nicht gegen Reagenzien austauschen oder mit Reagenzien kombinieren, die aus Kits mit anderen Lot-Nummern stammen.

### Lagerung

Bei Nichtverwendung zwischen 2 – 8°C lagern. Flaschen aufrecht stellen. **Nicht tiefgefrieren.**

Haltbarkeitsdatum siehe Datum auf dem Etikett.

### Benötigte Ausrüstung

Ordnungsgemäß geeichte und gewartete Pipetten, die in der Lage sind, Volumen von 10, 25, 75 und 190 abzugeben.

Plattenformat mit U-Vertiefungen (Mikroplatten mit 96 Vertiefungen) - Produktcode 83378 (5 Platten), 83357 (100 Platten).

### Proben

Serum- bzw. Plasmaproben sollten frei von Blutzellen und offensichtlicher mikrobieller Kontamination sein. Die Proben können bei 2-8° C bis zu 7 Tage vor dem Durchführen der Tests gelagert werden. Proben, die länger gelagert werden müssen, sollten bei mindestens minus 20°C eingefroren werden. Eingefrorene Proben sollten vor dem Testen aufgetaut und gut vermischt werden.

### Versuchsprotokoll (Manuell)

Bringen Sie zunächst alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur.

**Hinweis: Die Positiv- und Negativkontrollen des Testkits müssen bei jeder Versuchsreihe mitverwendet werden.**

### Qualitative Untersuchung

Für jede Probe werden drei Vertiefungen benötigt.

N.B. Das TPHA 500 Kit (Produktcode 72502) dient zum Screening großer Probenmengen und enthält nur eine kleine Menge an Kontrollzellen.

Bei der Erstuntersuchung sollten nur die Testzellen verwendet werden. Die Kontrollzellen sind bei der Untersuchung von Proben zu verwenden, die beim Ersttest ein positives Ergebnis ergeben haben.

#### **1 Probenverdünnung (auf 1 : 20)**

Geben Sie 190 µl des Verdünnungsmittel in eine Vertiefung.

Geben Sie in die gleiche Vertiefung 10 µl der Probe.

Gründlich vermischen.

*Hinweis: Die Positiv- und Negativkontrollen sind als Proben zu behandeln (d. h. auf 1:20 verdünnen)*

#### **2 Test**

Geben Sie 25 µl der unter Arbeitsschritt 1 verdünnten Probe in die Testvertiefung.

Geben Sie 25 µl der unter Arbeitsschritt 1 verdünnten Probe in die Kontrollvertiefung.

Resuspendieren Sie durch Schütteln der Phiole die Test- und die Kontroll suspension. Auf vollständige Resuspension überprüfen.

Geben Sie 75 µl Testzellen in die Testvertiefung und 75 µl Kontrollzellen in die Kontrollvertiefung (*Die endgültige Probenverdünnung nach Zusetzen der Zellen ist 1:80*)

Gründlich vermischen.

Inkubieren Sie die Platten mindestens 45 Minuten lang bei Raumtemperatur (15 – 30° C) auf einer vibrationsfreien Fläche.

Werten Sie die Absetzungsmuster aus. Agglutinationsmuster sind mindesten drei Stunden lang stabil, vorausgesetzt, dass sie nicht gestört werden.

### **Quantitative Untersuchung**

Für jede Probe werden 9 Vertiefungen benötigt.

**Hinweis: Die Positiv- und Negativkontrollen des Testkits müssen bei jeder Versuchsreihe mit verwendet werden, wobei das unten beschriebene quantitative Messverfahren durchzuführen ist.**

#### **1 Probenverdünnung (auf 1 : 20)**

Geben Sie 190 µl des Verdünnungsmittel in eine Vertiefung.

Geben Sie in die gleiche Vertiefung 10 µl der Probe.

Gründlich vermischen.

*Hinweis: Die Positiv- und Negativkontrollen sind als Proben zu behandeln (d. h. auf 1:20 verdünnen)*

#### **2 Titration**

Lassen Sie die erste Vertiefung leer und geben Sie 25 µl Verdünnungsmittel in jede der 7 verbleibenden Vertiefungen pro Reihe mit 8 Vertiefungen.

Geben Sie 25 µl aus Arbeitsschritt 1 in die 1. Vertiefung.

25 µl aus Arbeitsschritt 1 in die 2. Vertiefung geben und gründlich vermischen. Auf die gleiche Weise entlang der Vertiefungsreihe verdünnen. Die aus der letzten Vertiefung anfallenden überschüssigen 25 µl entsorgen.

#### **3 Test**

Vermischen Sie vorsichtig die Testzellen, damit diese gut resuspendiert sind.

Geben Sie 75 µl Testzellen in jede Vertiefung. (*Die endgültige Probenverdünnung nach Zugabe der Zellen ist 1:80 – 1:10.240*)

Gründlich vermischen.

Inkubieren Sie die Platten mindestens 45 Minuten lang bei Raumtemperatur (15 - 30° C) auf einer vibrationsfreien Fläche.

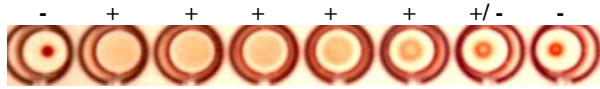
Werten Sie die Absetzungsmuster aus. Agglutinationsmuster sind mindesten drei Stunden lang stabil, vorausgesetzt, dass sie nicht gestört werden.

Der Titer der Probe ist der Kehrwert der höchsten Verdünnung, bei der sich eine Agglutination zeigt

## Versuchsauswertung und -validierung

### Interne Qualitätskontrolle

Damit die Ergebnisse gültig sind, muss die Negativkontrolle ein negatives Resultat ergeben (siehe Auswertungsdiagramm), die Positivkontrolle muss einen Titer von 640 – 2560 ergeben (das Diagramm gibt Ihnen einen Anhaltspunkt zum Titrationsendpunkt)



CC 1:80 1:160 1:320 1:640 1:1280 1:2560 1:5120

Proben, deren Agglutination geringer ist als „+/-“ oben, ist negativ.

### TPHA Screening 500 – Auswertung der Ergebnisse

Proben, die eine stärkere Agglutination als „+/-“ oben aufweisen, sollten als vorläufig **positiv** betrachtet werden. Wiederholen Sie den Test wie oben verfahren, jedoch im Duplikat, und geben Sie die mitgelieferten Kontrollzellen in eine Reihe von Vertiefungen, die Testzellen in die andere.

### TPHA 200 - Auswertung der Ergebnisse

	Testzellen	Kontrollzellen
<b>Positiv: Stark</b>	Volles Zellmuster, das den ganzen Boden der Vertiefung bedeckt.	Negative Knopfform
<b>Schwach positiv</b>	Zellmuster bedeckt ca. 1/3 des Vertiefungsbodens.	Negative Knopfform
<b>Unbestimmt</b>	Zellmuster zeigt eine eindeutig offene Mitte	Negative Knopfform
<b>Negativ</b>	Zellen setzen sich in Form eines kompakten Knopfes ab, typischerweise mit einem kleinen, leeren Bereich in der Mitte.	Negative Knopfform
<b>Unspezifische Reaktion)</b>	Positive Reaktion	Positive Reaktion

**Absorption unspezifischer Reaktionen** (Zu verwendendes Verfahren, wenn sowohl in den Test- als auch in den Kontrollzellen eine Agglutination sichtbar ist)

1. 10 µl Probe zu 190 µl resuspendierter Kontrollzellen geben, gut vermischen und bei Zimmertemperatur 30 Minuten inkubieren.
2. Bei mindestens 1500g 3 Minuten lang zentrifugieren, damit sich die Zellen absetzen können.
3. In 2 Vertiefungen jeweils 25 µl des Überstands aus Schritt 2 geben.
4. Vermischen Sie vorsichtig die Test- und die Kontrollzellen, damit diese gut resuspendiert sind.  
Geben Sie 75 µl Testzellen in die 1. Vertiefung.

Geben Sie 75 µl Kontrollzellen in die 2. Vertiefung.

Gründlich vermischen und bei Raumtemperatur mindestens 45 Minuten inkubieren.

Die resultierenden Absetzungsmuster wie oben lesen und auswerten.

### Leistungsmerkmale

#### Spezifität

Zwei unabhängige Studien an je 2900 **Spenderseren** zeigten eine 100%ige Übereinstimmung mit vorhandenen Testmethoden. Die anfängliche Reaktionsrate betrug 0,1%, die wiederholte Reaktionsrate betrug 0%.

Eine unabhängige Studie an 200 **pränatalen Seren** zeigte eine 100 %ige Spezifität. (95% Vertrauensgrenzen: 98,04 -100 %)

#### Empfindlichkeit

Interne Studien an 110 bekannt positiven Proben ergaben 100% positive Ergebnisse. (95% Vertrauensgrenze: 98,04 -100 %) Dazu gehörten 2 Proben, die in anderen kommerziell erhältlichen TPHA-Tests ein negatives Ergebnis erzielt hatten, aber ein positives Ergebnis in FTA- und spezifischen IgM EIA-Tests.

#### Klinische Proben

Es wurden 467 Proben mit Verdacht auf Syphilis untersucht, die zur Untersuchung an ein Labor gesandt worden waren.

Klinische Kategorie	Nummer	Reaktiv bei TPHA Screening 500 und TPHA 200	Reaktiv bei anderen TPHA-Tests
<b>Syphilis positiv*</b>	217	216	214
<b>Syphilis negativ</b>	250	0	0

\* Einschließlich behandelter und unbehandelter Fälle sowie Fälle von Neurosyphilis

**Empfindlichkeit** 99,5 % ( 95%-Vertrauensgrenzen: 97,54 – 100 % )

**Spezifität** 100 % ( 95%-Vertrauensgrenzen: 98,04 -100 % )

#### Spezifität bei potenziell kreuzreaktiven Proben

Klinische Kategorie	Getestete Anzahl	Reaktiv bei TPHA Screening 500 und TPHA 200	Nicht reaktiv bei TPHA Screening 500 und TPHA 200
<b>Rheumafaktor +ve</b>	10	0	10
<b>EBV-Infektion</b>	10	0	10
<b>Nach Hepatitis-B-Impfung</b>	10	0	10
<b>SLE</b>	10	0	10
<b>Genitalherpes</b>	10	0	10
<b>Lyme-Krankheit</b>	10	0	10
<b>Leptospirose</b>	10	1	9

**Analytische Empfindlichkeit**

Dieses Testkit ist nachweislich in der Lage, 0,05 IE/ml an Anti-Treponemen-Antikörpern zu entdecken. Getestet wurden Verdünnungen des Serums nach dem First International Standard (NIBSC, London, Großbritannien)

**Präzision und Genauigkeit**

Bei N =10 Versuchsreihen einer positiven Probe betrug der Variationskoeffizient CV = 8,1% Genauigkeit = -2.5%



## Literatur

1. Rathlev T. - Haemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic *Treponema pallidum* WHO/VDT/RES 1965 ; 77 : 65.
2. Tomizawa T, Kasamatsu S. - Haemagglutination tests for diagnosis of syphilis. A preliminary report. Japan. J. Med. Sci. Biol. 19, 305-308, 1966.
3. Rathlev T. - Haemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis. Br J Vener Dis 1967 ; 43 : 181-5
4. Tomizawa T, Kasamatsu S, Yamaya S. - Usefulness of the haemagglutination test using *Treponema pallidum* antigen (TPHA) for the serodiagnosis of syphilis. Jap J Med Sci Biol 1969 ; 22 : 341-50.
5. Sequeira P,J,L. Eldridge A,E. - Treponemal Haemagglutination test. Br J Vener Dis 1973 ; 49 : 242-8.
6. Larsen S.A., Hambie E.A., et coll., Specificity, sensitivity and reproducibility among the fluorescent treponemal antibody absorption test, the microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies, and the hemagglutination treponemal test for syphilis. J. Clin. Microbiol., 1981 ; 14 : 441 – 445.
7. Paris Hamelin, A., Dreux P. et coll. – Tréponématoses : aspects cliniques et biologiques. Feuille. Biol. 1991a ; 23 : 88-89.
8. Houg H. - Syphilis : new diagnostic directions. Intern. J. STD and AIDS 1992 ; 3 : 391-413.
9. Sluis J.J. Van Der. - Laboratory Techniques in the diagnosis of syphilis : a review. Genitourin Med. 1992 ; 68 : 413-9.
10. Daguët G.L. - Diagnostic Biologique de la Syphilis. Technique et Biologie, 1995 ; 120 :5-30.
11. North M, Let Guntz Ph. Sérodiagnostic de la syphilis. La Revue Française des Laboratoires, 1997 ; 294 : 51-58.



UK Use By  
DE Verwendbar bis  
ES Fecha de caducidad  
IT Utilizzare entro  
FR Utiliser jusque  
NL Houdbaar tot  
DK Holdbar til  
P Fecha de caducidad



UK Temperature limitation  
DE Zulässiger Temperaturbereich  
ES Limite de temperatura  
IT Limiti di temperatura  
FR Limites de température  
NL Temperatuurlimiet  
DK Temperaturbegrænsning  
P Limite de temperatura



UK Manufacturer  
DE Hersteller  
ES Fabricante  
IT Fabbricante  
FR Fabricant  
NL Fabrikant  
DK Producent  
P Fabricante



UK Consult Instructions for Use-  
DE Gebrauchsanweisung beachten  
ES Consulte las instrucciones de uso  
IT Consultare le istruzioni per l'uso  
FR Consulter les instructions d'utilisation  
NL Raadpleeg de gebruiksaanwijzing  
DK Se brugsanvisning  
P Consulte las instrucciones de uso



UK In Vitro Diagnostic Medical Device  
DE In Vitro Diagnostikum  
ES Producto sanitario para diagnóstico in vitro  
IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro  
FR Dispositif médical de diagnostic in vitro  
NL Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek  
DK Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik  
P Producto sanitario para diagnóstico in vitro



UK Batch code  
DE Lagenbezeichnung  
ES Código de lote  
IT Codice del lotto  
FR Code du lot  
NL Lot nummer  
DK Lotnummer  
P Código de lote

72501-72502 CE MOD2 2007/01