

Newbio TPHA

1. Verwendungszweck

Für den qualitativen Nachweis von *Treponema pallidum* IgG- und IgM-Antikörpern gegen Syphilis in Humanserum oder EDTA-Plasma und zur Bestimmung des Titers der Proben vorgesehen. Die vorgesehene Zielgruppe sind Patienten mit Verdacht auf eine Syphilis-Infektion oder einem erhöhtem Risiko einer Syphilis-Infektion, die eine STI-Klinik oder andere Gesundheitseinrichtungen aufsuchen. Dieser Assay ist nicht für den automatisierten Einsatz bestimmt. Dieser Assay ist nicht für das Blut-Screening oder als Bestätigungstest für Spenderproben vorgesehen.

2. Testprinzip

Syphilis wird durch die Spirochaete *Treponema pallidum* verursacht und wird in der Regel durch sexuellen Kontakt übertragen, obwohl die Krankheit auch durch Transfusion von infiziertem Blut übertragen werden kann. Auch intrauterine Infektionen kommen vor. Die Infektion ist eine chronische Erkrankung, die in der Regel verschiedene primäre, sekundäre, tertiäre und quartäre Infektionsstadien durchläuft. Diese Stadien führen zu unterschiedlichen klinischen Symptomen, wobei typischerweise zunächst Geschwüre, die so genannten Schanker, und dann ein syphilitischer Ausschlag auftreten, gefolgt von langen Ruhephasen. Eine unbehandelte Infektion kann schließlich zu kardiovaskulären Problemen und Neurosyphilis führen.

Der Erreger kann nicht routinemäßig in künstlichen Medien gezüchtet werden, und die Diagnose der Infektion hängt in der Regel vom Nachweis von Antikörpern im Blut ab, die kurz nach der Erstinfektion auftreten.

Newbio TPHA verwendet konservierte Geflügel-Erythrozyten, die mit extrahierten Antigenen von *T. pallidum* (Nichols-Stamm) beschichtet sind. Spezifische Antikörper, die in einer Plasma- oder Serumprobe vorhanden sind, binden an diese Antigene, wenn die Probe mit den Erythrozyten inkubiert wird. Dadurch agglutinieren die Erythrozyten, setzen sich ab und bilden ein charakteristisches Muster in der Testvertiefung. Unspezifische Reaktionen werden durch die Verwendung von Absorptionsmitteln eliminiert.

3. Bestandteile

Name	Beschreibung	100 Tests NB007	200 Tests NB008	1000 Tests NB009
Testzellen	Mit Antigenen von <i>T. pallidum</i> beschichtete aviäre Erythrozyten	8.5 mL	2 x 8.5 mL	2 x 40 mL
Kontrollzellen	Aviäre Erythrozyten	8.5 mL	2 x 8.5 mL	1 x 40 mL
Probenverdünnungsmittel	Absorptionsmittel enthaltende Salzlösung	20 mL	2 x 20mL	4 x 50mL
Positive Kontrolle	Kaninchen Antiserum Titer 1/1280	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
Negative Kontrolle	Normales Kaninchenserum	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
Gebrauchsanweisung				

4. Zusätzlich benötigte Materialien

Mikropipetten für die Abgabe von: 10, 25, 75 und 190µL

U-Well-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen

5. Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

Kit-Kontrollen müssen mit jedem Assay durchgeführt werden.

Sicherstellen, dass die Test- und Kontrollzellen gründlich resuspendiert werden.

6. Lagerung und Haltbarkeitsdauer nach dem ersten Öffnen

1. Testzellen und Kontrollzellen müssen aufrecht bei 2-8°C gelagert werden. Nicht einfrieren.
2. Nach dem Öffnen sind Testzellen, Kontrollzellen, Probenverdünnungsmittel und Kontrollen bis zu 3 Monate haltbar, wenn sie aufrecht bei 2-8°C gelagert werden.
3. Nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

7. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Newbio TPHA ist nur für die In-vitro-Diagnostik geeignet. Nur für den professionellen Gebrauch.
2. Testzellen, Kontrollzellen, Probenverdünnungsmittel und Kontrollen enthalten Natriumazid (< 0,1 % w/v) als Konservierungsmittel, das sich in Blei- oder Kupferrohren ansammeln und potenziell explosive Azide bilden kann. Um die Ansammlung von Aziden zu verhindern, nach dem Entsorgen von azidhaltigen Lösungen in die Kanalisation mit großen Mengen Wasser spülen.
3. Die Reagenzien und Kontrollen enthalten Material tierischen Ursprungs. Jegliches, zur Herstellung dieses Produkts, verwendete Rinderalbumin stammt von Spendertieren, die von Inspektoren des Veterinärdienstes untersucht und als frei von Krankheiten zertifiziert wurden.
4. Testzellen, Kontrollzellen, Probenverdünnungsmittel und Kontrollen nicht einfrieren.
5. Testzellen und Kontrollzellen müssen vor der Verwendung gründlich resuspendiert werden. Andernfalls kann es zu einer unzureichenden Verdünnung und fehlerhaften Ergebnissen kommen.
6. Die Erythrozyten der Test- und Kontrollzellen sollten während der Lagerung vom Suspensionsmedium bedeckt sein; ist dies nicht der Fall, so sollten die Erythrozyten erneut suspendiert werden. Andernfalls kann es zu einer Verklumpung in der Testvertiefung kommen.
7. Testzellen, Kontrollzellen und Probenverdünnungsmittel aus derselben Charge können nach guter Laborpraxis gepoolt werden.
8. Reagenzien, die sichtbare Anzeichen von mikrobiellem Wachstum oder grober Trübung aufweisen, können auf eine Zersetzung hindeuten und sollten gemäß den örtlichen Vorschriften entsorgt werden.
9. Die Auswirkungen einer mikrobiellen Kontamination der Proben können nicht vorhergesagt werden.
10. Testzellen, Kontrollzellen, Probenverdünnungsmittel und Kontrollen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
11. Die Verschlusskappen der Positiv- und Negativkontrollfläschchen dürfen nicht vertauscht werden. Die Kontrollen sind durch farbcodierte Verschlusskappen und das Fläschchenetikett voneinander zu unterscheiden. Wenn die Verschlusskappen versehentlich vertauscht werden, sollten die Kontrollröhrchen verworfen werden.
12. Proben, die eine grobe Lipämie, Hämolyse oder Ikterus aufweisen, können beeinträchtigt sein und erfordern möglicherweise alternative Testung.
13. Abweichungen von der Gebrauchsanweisung des Newbio TPHA können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
14. Reagenzienreste auf sichere Weise und in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften entsorgen.

8. Probenentnahme, Handhabung und Lagerung

Newbio TPHA kann zur Testung von Humanserum oder EDTA-Plasmaproben bis zu 7 Tage nach der Entnahme verwendet werden. Die Proben sollten frei von Partikeln sein, um Interferenzen mit dem Testergebnis zu vermeiden. Wenn Erythrozyten oder andere sichtbare Bestandteile in der Probe vorhanden sind, diese durch Zentrifugation entfernen, um eine Beeinflussung der Testergebnisse zu vermeiden. EDTA-Plasma- und Serumproben bei 2-8°C bis zu 7 Tage aufbewahren. EDTA-Plasma- und -Serumproben können bis zu einem Monat bei weniger als -20°C eingefroren, aufgetaut und vor der Testung gründlich gemischt werden. Die Proben können bis zu 5 mal eingefroren und aufgetaut werden.

Alle Proben vor der Verwendung auf Raumtemperatur kommenlassen.

9. Assay-Verfahren

Für jede Probe werden 3 Vertiefungen, plus 2 zusätzliche Vertiefungen für Positiv- und Negativkontrollen, benötigt.

Hinweis: Für Newbio TPHA 1000 nur Kontrollzellen beim Wiederholungstest verwenden.

1. Probenverdünnung (auf 1:20)

190µL des Probenverdünnungsmittels in die erste Vertiefung geben.

10µL der Probe in die gleiche Vertiefung geben.

Gründlich mischen.

Hinweis: Die Kit-Kontrollen sind vorverdünnt (d. h. 1:20 verdünnt).

2. Test

25µL der Positivkontrolle oder Negativkontrolle in die vorgesehenen Testvertiefungen geben.

25µL der verdünnten Probe aus Schritt 1 in eine Testvertiefungen geben.

25µL der verdünnten Probe aus Schritt 1 in eine Kontrollvertiefung geben.

Die Test- und Kontrollzellen gründlich resuspendieren.

75µL der Testzellen in die Testvertiefung und 75µL der Kontrollzellen in die Kontrollvertiefung geben.

(Die endgültige Probenverdünnung beträgt 1:80)

Vertiefungen gründlich mischen.

Bei 15-30°C auf einer vibrationsfreien Oberfläche 45-60 Minuten lang inkubieren.

Die Agglutinationsmuster ablesen. Die Muster sind stabil, wenn sie erschütterungsfrei stehen.

Testverfahren für die Probentitration (optional)

Für jede Probe werden 9 Vertiefungen für Verdünnungen von 1:80 bis 1:10240 benötigt.

2 zusätzliche Vertiefungen für Positiv- und Negativkontrollen (wenn nur bei 1:80 getestet wird)

1 zusätzliche Vertiefung wird benötigt, wenn Kontrollzellen getestet werden.

1. Probenverdünnung (auf 1:20)

190µL des Probenverdünnungsmittels in die erste Vertiefung geben.

10µL der Probe in die gleiche Vertiefung geben.

Gründlich mischen.

Hinweis: Die Kit-Kontrollen sind vorverdünnt (d. h. 1:20 verdünnt).

2. Titration

Die zweite und dritte Vertiefung leer lassen, 25µL des Probenverdünnungsmittels in Vertiefung 4 bis Vertiefung 10 in der folgenden Reihenfolge hinzufügen.

25µL aus Schritt 1 in die zweite und dritte Vertiefung übertragen.

25µL aus Schritt 1 in die vierte Vertiefung übertragen und mischen, dann seriell entlang der Vertiefungsreihenfolge verdünnen und die überschüssigen 25µL aus der letzten Vertiefung verwerfen.

Hinweis: Es muss darauf geachtet werden, dass keine Probenverschleppung zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten stattfindet.

Kit-Positivkontrolle kann bei Bedarf titriert werden

3. Test

Die Testzellen gründlich resuspendieren
75µL der Kontrollzellen in Vertiefung 2 geben
75µL Testzellen in die Vertiefungen 3 bis 10 geben.

(Die endgültige Probenverdünnung beträgt 1:80 - 1:10.240)

Vertiefungen gründlich mischen.

Bei 15-30°C auf einer vibrationsfreien Fläche 45-60 Minuten inkubieren.

Die Agglutinationsmuster ablesen. Die Muster sind stabil, wenn sie erschütterungsfrei stehen.

Der Titer der Probe ist der Kehrwert der endgültigen positiven Probenverdünnung.

10. Kontrollverfahren

Die Positiv- und Negativkontrollen müssen mit jedem Testansatz durchgeführt werden. Falls erforderlich, kann dir im Kit enthaltene Positivkontrolle titriert werden, wobei der erwartete Endpunkt bei 1/640 - 1/2560 liegt. Zusätzliche QC-Tests können vom Anwender durch Einbeziehung anderer charakterisierter Proben oder Referenzmaterialien durchgeführt werden.

Die Positivkontrolle sollte ein positives Ergebnis und die Negativkontrolle ein negatives Ergebnis mit dem Test ergeben. Wenn mit den Kontrollen nicht die entsprechenden Ergebnisse erzielt werden, wird der Test als ungültig betrachtet und alle Proben in diesem Testansatz sollten erneut getestet werden.

TPHA-Kontrollen sind vorverdünnt. Sie sollten direkt in die Reaktionsvertiefung gegeben werden, ohne dass sie mit TPHA-Probenverdünnungsmittel verdünnt werden. Die Testzellen werden direkt zu den Kontrollen gegeben.

11. Auswertung der Ergebnisse

Eine Probe, bei der die Vertiefung der Testzellen nicht reaktiv ist, sollte als **negativ für *T.pallidum*-Antikörper** angesehen werden.

Eine Reaktivität, die weniger als zweifelhaft ist, gilt als negativ.

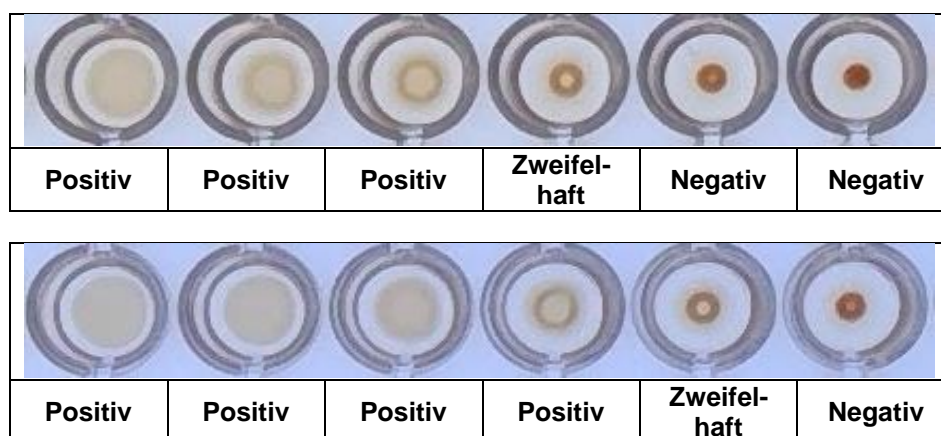
Eine Probe, bei der die Vertiefung der Testzellen reaktiv oder zweifelhaft ist, weist auf Antikörper gegen *T.pallidum* hin, die von einer Syphilis-Infektion herrühren. Die Probe sollte im doppelten Ansatz wiederholt werden. Wenn eines der beiden Wiederholungsergebnisse reaktiv oder zweifelhaft ist, sollte die Probe als **positiv für *T.pallidum*-Antikörper** angesehen werden. Sind beide Wiederholungsergebnisse nicht reaktiv, werden die Proben als nicht reaktiv eingestuft.

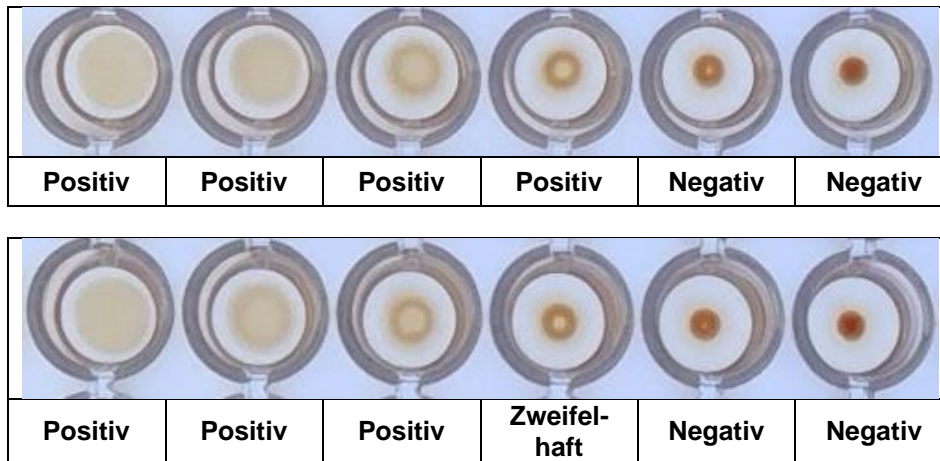
Ist eine Probe sowohl in den Vertiefungen der Test- als auch in den Kontrollzellen reaktiv und ist die Agglutination in der Vertiefung der Testzellen größer, gilt die Probe als positiv und sollte wie oben beschrieben wiederholt werden.

Bei der Proben titration gilt ein Titer von $\geq 1:80$ als reaktiv, und die Probe sollte im doppelten Ansatz wiederholt werden.

Reaktive Ergebnisse können auf aktive, zurückliegende oder erfolgreich behandelte Syphilis-Infektionen hinweisen.

Beispiele für die Interpretation der Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.





Testzellen	Kontrollzellen	Wiederholung	Absorption	Interpretation
+ (stark)	+ (schwach)	J	N	TP positiv
+ (gleich KZ)	+ (gleich TZ)	J	J	TP positiv
+ (schwach)	+ (stark)	J	J	TP positiv
+	-	J	N	TP positiv
-	-	N	N	TP negativ
-	+	J	N	TP negativ

Absorption unspezifischer Reaktionen (nur durchzuführen, wenn eine Probe eine größere oder gleiche Agglutination in den Kontrollzellen als in den Testzellen aufweist)

- 10µL der Probe zu 190µL der resuspendierten Kontrollzellen geben, gründlich mischen und 30 Minuten lang stehen lassen.
- 3 Minuten bei mindestens 1500g zentrifugieren, damit sich die Zellen abzusetzen.
- 25µL des Überstandes aus Schritt 2 in je 2 Vertiefungen geben.
- Sicherstellen, dass Test- und Kontrollzellen resuspendiert sind.
75µL der Testzellen in die erste Vertiefung geben.
75µL der Kontrollzellen in die zweite Vertiefung geben.
- Vertiefungen gründlich mischen und bei 15-30°C auf einer vibrationsfreien Oberfläche 45-60 Minuten lang inkubieren.
- Die Muster wie oben beschrieben ablesen und interpretieren.

Bei der Absorption von nicht-spezifischen Reaktionen wird der Überstand direkt in die Reaktionsvertiefung gegeben, ohne dass eine Verdünnung mit Probenverdünnungsmittel erfolgt. Wird dieser Schritt nicht korrekt durchgeführt, kann dies zu falsch negativen Ergebnissen führen.

12. Leistungsmerkmale

Nachweisgrenze

Newbio TPHA hat eine erwartete Nachweisgrenze von $\leq 0,1$ IU/mL gegenüber dem 1. IS der WHO für humanes syphilitisches Plasma-IgG NIBSC-Code:05/122.

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des Assays wurde anhand eines charakterisierten, gemischten Titerpanels mit 25 syphilispositiven und 5 syphilisnegativen Proben bewertet. Das Panel wurde unter Verwendung mehrerer Chargen von Newbio TPHA an 5 Testtagen über einen Zeitraum von 7 Tagen im doppelten Ansatz getestet, wobei an jedem Testtag zwei separate Durchläufe durchgeführt wurden.

Reproduzierbarkeitsstudie – Übereinstimmungsrate

Proben	Übereinstimmung N=	Total N=	Übereinstimmungsrate	95% Konfienzintervall
Syphilis positiv	250	250	100.00%	98.54 – 100%
Syphilis negativ	50	50	100.00%	92.89 – 100%
Gesamt	300	300	100.00%	98.78 – 100%

Kreuzreaktivität und Interferenzen

140 Syphilis-negative Proben, die Antikörper gegen Infektionskrankheiten (Röteln, Toxoplasma, Borrelien, EBV, HCV, HBV, HAV, HIV, HTLV, Herpes, Chlamydien), ANA-Antikörper, Rheumafaktor-Antikörper und Proben von schwangeren (mehrgebärenden) Probanden enthielten, wurden im Newbio TPHA getestet. Alle Proben ergaben das erwartete negative Ergebnis.

151 Syphilis-positive Proben, die diese Antikörper enthielten, und Proben von schwangeren (mehrgebärenden) Probanden wurden mit Newbio TPHA getestet. Alle Proben ergaben das erwartete positive Ergebnis.

High-Dose-Hook-Effekt

Die Wirkung von überschüssigen Antikörpern kann bei sehr hohen Antikörperspiegeln in Hämagglutinationstests beobachtet werden. In Studien für den Newbio TPHA wurden bei hohen TP-Antikörperspiegeln von bis zu 100 IU/mL keine negativen Ergebnisse erzielt.

Diagnostische Empfindlichkeit

Ein Panel von 205 kommerziell beschafften, gut charakterisierten TP-positiven Proben (157 Serum- und 48 EDTA-Plasmaproben) wurde mit dem Newbio TPHA im Vergleich zum Newbio PK TPHA 2000 getestet. Bei den kommerziell gewonnenen syphilispositiven Proben wurde davon ausgegangen, dass der tatsächliche klinische Status derjenige ist, der durch die Testergebnisse des Herstellers definiert ist.

Ursprüngliche Testung für Newbio TPHA versus PK TPHA 2000

Probe	Übereinstimmungsmessung	Übereinstimmung N=	Total N=	Zustimmungsrate	95% Konfienzintervall
Serum	PPA	157	157	100.0%	97.68-100.0%
EDTA Plasma	PPA	48	48	100.0%	92.60-100.0%
Kombiniert	PPA	205	205	100.0%	98.22-100.0%

(PPA: Positive prozentuale Übereinstimmung)

Statistischer Überblick über den klinischen Status

Probe	Übereinstimmungsmessung	Übereinstimmung N=	Total N=	Zustimmungsrate	95% Konfienzintervall
Alle Proben	Sensitivität	205	205	100.0%	98.22-100.0%

Diagnostische Spezifität

Ein Panel von 1248 bekanntermaßen TP-negativen EDTA-Plasmaproben wurde mit dem Newbio TPHA im Vergleich zum Newbio PK TPHA 2000 getestet. Ursprünglich reaktive Proben wurden mit der entsprechenden Methode in Doppelbestimmung erneut getestet.

Ursprüngliche Testung für Newbio TPHA versus PK TPHA 2000

Probe	Übereinstimmungs-messung	Übereinstimmung N=	Total N=	Zustimmungsrate (%)	95% Konfienzintervall (%)
EDTA Plasma	NPA	1236	1238	99.84	99.42-99.98

(NPA: Negative prozentuale Übereinstimmung)

Wiederholte Testung für Newbio TPHA versus PK TPHA 2000

Probe	Übereinstimmungs-messung	Übereinstimmung N=	Total N=	Zustimmungsrate	95% Konfienzintervall
EDTA Plasma	NPA	1245	1246	99.92	99.55-100.0

Statistische Zusammenfassung nach Probenart und klinischem Status— nach Wiederholungstestung






Probe	Übereinstimmungs-messung	Übereinstimmung N=	Total N=	Zustimmungsrate	95% Konfienzintervall
EDTA Plasma	Spezifität	1247	1248	99.92	99.55-100.0

13. Beschränkungen

Newbio TPHA kann für Serum- und EDTA-Plasmaproben verwendet werden. Es wurden keine störenden Substanzen identifiziert, jedoch kann der TPHA mit anderen Treponemen-Infektionen wie *T.pertenue* und *T.carateum* kreuzreagieren, so dass positive Ergebnisse durch eine andere Methode bestätigt werden sollten.

Bei früher primärer Syphilis können gelegentlich keine spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

14. Legende zu den Symbolen

	Katalognummer
	In-Vitro-Diagnostika
	Hersteller
	EU Bevollmächtigter
	EU Importeur



Vertriebs Händler



Temperaturbegrenzung



Mindesthaltbarkeitsdatum



Chargennummer



Gebrauchsanweisung beachten

15. Überwachung nach dem Inverkehrbringen

Sollte dieses IVD in einen schwerwiegenden Zwischenfall verwickelt sein, ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, ein Bericht zu erstatten.



www.new-bio.com

info@new-bio.com

16. Zusammenfassung von Sicherheit und Leistung

Die Zusammenfassung von Sicherheit und Leistung (SSP) kann von der EUDAMED-Website bezogen werden <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

17. Literaturhinweise

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. Wasley G.D. & Wong H.H.Y. Syphilis Serology Principles and Practice. Oxford Medical Publications 104 - 105



Gebrauchsanweisungen in anderen Sprachen finden Sie auf unserer Website <http://www.new-bio.com> oder wenden Sie sich an Ihren Händler. Weitere Sprachen sind auf Anfrage erhältlich.