



Mast Group Ltd.
Mast House, Derby Road, Bootle
Liverpool, Merseyside, L20 1EA
United Kingdom
Tel: + 44 (0) 151 472 1444
Fax: + 44 (0) 151 944 1332
email: sales@mastgrp.com
Web: www.mastgrp.com

Mast Diagnostica GmbH
Feldstrasse 20
DE-23858 Reinfeld
Germany
Tel: + 49 (0) 4533 2007 0
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68
email: mast@mast-diagnostica.de
Web: www.mastgrp.com

Mast Diagnostic
12 rue Jean-Jacques Mention
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1
France
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22
email: info@mast-diagnostic.fr
Web: www.mastgrp.com



MAST-TPHA

Verwendungszweck

HA101. *Treponema pallidum* Hämagglutinationsassay mit Flüssigreagenzien zur Serodiagnose der Syphilis.

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Packungsinhalt

Der MAST-TPHA HA101 enthält folgende Komponenten für 200:

1. Probediluent, gebrauchsfertig, 2 x 20 mL, enthält Phosphatpuffer pH 7,2 und „normales“ Kaninchenserum.
 2. Testzellen, gebrauchsfertig, 2 x 8,5 mL. Suspension von tannin-behandelten Hühnererythrocyten, mit *T. pallidum* (Nichols-Stamm) beschichtet, enthält Zellbestandteile von *T. pallidum* (Reiters-Stamm) in einem Phosphatpuffer.
 3. Kontrollzellen, gebrauchsfertig, 2 x 8,5 mL, Suspension von tannin-behandelten Hühnererythrocyten, enthält Zellbestandteile von *T. pallidum* (Reiter-Stamm) in einem Phosphatpuffer.
 4. Positivkontrolle, gebrauchsfertig, 1 x 2 mL verdünntes Humanserum mit *T. pallidum*-spezifischen Antikörpern, 1 : 20 vorverdünnt; Endtiter 1:2560 +/- eine Titerverdünnung.
 5. Negativkontrolle, gebrauchsfertig, 1 x 2 mL vorverdünntes Humanserum, enthält keine *T. pallidum*-Antikörper.
 6. Gebrauchsanweisung.
- Die oben aufgeführten Komponenten 1 - 5 enthalten 0,095 % Natriumazid als Konservierungsmittel.

Lagerung und Haltbarkeit

Ungeöffnet sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zum auf dem Packungsetikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach dem Öffnen den MAST-TPHA bei 2 bis 8°C lagern, der Kit kann bis zum Verfallsdatum verwendet werden.

Die Reagenzien nicht einfrieren.

Die Proben können bis zu 48 Stunden vor Gebrauch bei 2 bis 8°C gelagert werden. Ist eine längere Lagerung erforderlich, können sie bis zu einem Jahr bei Minus 20°C gelagert werden. Die aufgetauten Proben müssen vor Gebrauch gut durchgemischt werden.

Vorsichtsmaßnahmen

MAST-TPHA-Reagenzien enthalten humanes Material. Sie sind auf HCV-, HIV I- und HIV II-Antikörper und HBsAg in Einzelbestimmung negativ getestet worden. Da kein Test garantieren kann, dass Produkte humanen Ursprungs infektionsfrei sind, ist höchste Vorsicht beim Gebrauch und bei der Entsorgung geboten. Keine Reagenzien und Komponenten verschlucken.

MAST-TPHA-Reagenzien enthalten keine gefährlichen Substanzen, wie sie in aktuellen UK Chemikalien-Hinweisen (Hazardous Information and Packaging for Supply) definiert sind. Alle Reagenzien sollten bei Verwendung und Entsorgung immer als potenziell infektiös betrachtet werden.

Die Schutzmaßnahmen für den Umgang mit potenziell infektiösem Material beachten und nur unter sterilen Bedingungen arbeiten. Der Test sollte nur von geschultem Laborpersonal durchgeführt werden. Es empfiehlt sich, den Abfall des potenziell infektiösen Materials vor der Entsorgung zu autoklavieren. Natriumazid (Konservierungsmittel) kann bei Einnahme toxisch sein und mit Blei- oder Kupferwasserleitungen unter Bildung von hoch explosiven Salzen reagieren. Es sollte daher nur zusammen mit viel Wasser über den Abfluss entsorgt werden. Bitte das Sicherheitsdatenblatt beachten.

Hämagglutinationsteste sind gegen Hitze, direktes Sonnenlicht und Vibration empfindlich. Jeden Kontakt mit solchen Quellen während der Inkubation vermeiden. Eine Speichelkontamination der Proben oder Reagenzien kann falsche Ergebnisse liefern und muss vermieden werden. Für jede Probe eine separate Einmal-Pipettenspitze verwenden, um etwaige Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Alle Reagenzien nach Gebrauch wieder fest verschließen. Die Reagenzien nicht an den Rand der Vertiefungen pipettieren. Vor dem Testbeginn alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20 bis 25°C) bringen. Alle Reagenzien durch leichtes Schwenken oder Kippen gut mischen.

Beschädigte oder kontaminierte Kit-Bestandteile nicht verwenden. Reagenzien aus Kits unterschiedlicher Chargenbezeichnung sind nicht austauschbar.

Zusätzlich benötigte Materialien

Mikrodilutoren oder Mikropipetten für Volumina von 25-, 75- und 100 µL. Feste Mikrotiterplatten mit U-förmigen Vertiefungen, z.B. Dynatech M24A.

Probengewinnung und -vorbereitung

Der Test ist nur zum Gebrauch mit Serum- und Liquor-Proben bestimmt. Plasma sollte nicht verwendet werden. Etwaige Gerinnsel in der Probe abzentrifugieren und das klare Serum behalten. Hämolyisierte, kontaminierte oder lipämische Seren nicht verwenden.

Serumproben vor Gebrauch gut durchmischen (Vortex-Mischer). Die Proben erfordern keine weitere Vorbehandlung. Das wiederholte Auftauen und Einfrieren der Proben verursacht falsche Ergebnisse und sollte vermieden werden.

Testdurchführung

a) Reagenzienvorbereitung

1. MAST-TPHA-Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.
2. Die Test- und Kontrollzellen vor Gebrauch völlig resuspendieren. Eine Schaumbildung vermeiden.

B. Qualitative Durchführung / Screeningansatz

für jeden Test werden 4 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte benötigt.

1. Das Probediluent in die Mikrotiterplatte nach folgendem Schema dispensieren:
 - 25 µL in Reihe 1, 3 & 4 und 100 µL in Reihe 2 pipettieren.
2. 25 µL jeder Probe in eine Vertiefung in Reihe 1 pipettieren.
 - Gut mischen und 25 µL von Reihe 1 nach Reihe 2 pipettieren.
 - Gut mischen und 25 µL von Reihe 2 nach Reihe 3 pipettieren.
 - Gut mischen und 25 µL aus Reihe 3 verwerfen.
 - 25 µL von Reihe 2 nach Reihe 4 pipettieren.
 - Gut mischen und 25 µL aus Reihe 4 verwerfen.
3. 75 µL gut gemischte Kontrollzellen in Reihe 3 pipettieren.
4. 75 µL gut gemischte Testzellen in Reihe 4 pipettieren.
5. Die Platte zum Mischen leicht anklöpfen. Die Endverdünnungen in Reihen 3 & 4 sind 1:80.
6. Die Platten abdecken und 45 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen (alternativ können die Platten über Nacht stehen).
7. Die Agglutinationsreaktionen auswerten.

Hinweis: die Kitkontrollen sind vorverdünnt und sollten direkt in die entsprechenden Vertiefungen der Reihen 3 & 4 pipettiert werden (es ist kein Diluent erforderlich).

C. Alternativer Ein-Well-Screeningansatz:

1. 190 µL Diluent in Reihe 1 pipettieren.
2. 10 µL Probe in Reihe 1 pipettieren und gut mischen.
3. 150 µL aus Reihe 1 abpipettieren und verwerfen.
4. 25 µL von Reihe 1 in Reihe 2 pipettieren.
5. 75 µL Testzellen in Reihe 1 pipettieren.
6. 75 µL Kontrollzellen in Reihe 2 pipettieren.
7. Die Platte zum Mischen leicht anklöpfen.
8. Der Endtiter in Reihen 1 & 2 beträgt 1:80.
9. Die Platten abdecken und 45 – 60 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen (alternativ können die Platten über Nacht stehen).
10. Die Agglutinationsreaktionen auswerten.

D. Quantitative Durchführung

Falls positive Ergebnisse routinemäßig quantifiziert werden, kann die Durchführung so modifiziert werden, dass auf die Kontrollzellen verzichtet und nur eine Endverdünnung angesetzt wird. Die Mehrzahl der Proben wird negativ oder echt positiv sein. Die Kontrollzellen können für die unten stehende quantitative Durchführung verwendet werden.

1. Verdünnungen in einer Mikrotiterplatte wie folgt ansetzen:
 - Für jede Probe 25 µL Diluent in jede Vertiefung eines Streifens pipettieren. Bei Austitrierung der Kontrollen sollte bei Reihe 3 begonnen werden.
 - 25 µL von Reihe 2 der Platte mit dem Screeningansatz in Reihe 1 der quantitativen Platte übertragen.
 - Gut mischen und 25 µL verwerfen.
 - 25 µL von Reihe 2 der Screeningplatte in Reihe 2 der quantitativen Platte übertragen.
 - Je 25 µL austitrieren und zwar von Reihe 2 bis Reihe 8 (Kontrollen sollten ab Reihe 3 austitriert werden).
2. 75 µL gut durchmischte Kontrollzellen zu Reihe 1 pipettieren.
3. 75 µL gut durchmischte Testzellen zu Reihe 2-8 pipettieren.
4. Die Platte leicht anklöpfen, um die Reaktionen zu mischen. Die Endverdünnung in Reihen 1 & 2 beträgt 1:80.
5. Die Platten abdecken und 45-60 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen (alternativ können die Platten über Nacht stehen).

Hinweis: die Kitkontrollen sind vorverdünnt, 25 µL direkt zu einzelnen Vertiefungen in Reihen 1, 2 und 3 pipettieren, bei Austitrierung ab Reihe 3 beginnen (kein Diluent in Reihe 1 & 2 erforderlich).

Interpretation der Ergebnisse

Screeningansatz

Agglutinierte Zellen bilden eine regelmäßige, glatte Schicht auf dem Boden der Vertiefung. Nicht-agglutinierte Zellen bilden einen kompakten Knopf in der Mitte der Vertiefung. Schwache Agglutinationen bilden einen charakteristischen Ring oder eine Zellmatte, die von einem roten Ring umgeben ist. In Gegenwart von *T. pallidum*-spezifischen Antikörpern zeigen die Testzellen eine Agglutinationsreaktion, jedoch nicht die Kontrollzellen. Liegen keine spezifischen Antikörper vor oder sind diese unterhalb des Suchtiters, kommt es zu keiner Agglutination der Testzellen. Das Reaktionsmuster der Kontrollzellen sollte nicht für die Beurteilung eines negativen Ergebnisses der Testzellen herangezogen werden, Kontrollzellen bilden stets einen etwas kompakteren Knopf als Testzellen. Eine Agglutination der Kontrollzellen und der Testzellen ist ein Hinweis auf Antikörper gegen Trägererythrozyten. In diesem Fall ist der Test nicht auswertbar und sollte wiederholt werden, allerdings muss vorher das Testserum absorbiert werden. Das Testserum 1:4 mit Kontrollzellen verdünnen und 45 – 60 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Die Probe (1000 rpm/5 Minuten) zentrifugieren und den Überstand 1:5 mit Diluent verdünnen. Diesen Ansatz sofort, ohne weitere Verdünnung, mit Test- und Kontrollzellen testen. Es wird ferner ein Bestätigungstest (FTA-ABS) empfohlen.

Quantitative Durchführung

Die Ergebnisse sind analog der Screeningkriterien zu interpretieren. Der Titer mit der höchsten Verdünnungsstufe, bei dem es noch zu einer Agglutination kommt, gilt als Endtiter. Das positive Kontrollserum sollte einen Titer von 1:2560 ± einer Titerstufe zeigen. Der Ausgangstiter ist bei der quantitativen Methode 1:80. Bei Titern bis zu 1:164.000 wurden keine Prozone-Phänomene (Hook-Effekte) festgestellt.

Grenzen des Testverfahrens

Den Test nur für Serum oder Liquor verwenden.

Reaktionskomponenten können nicht wieder verwendet werden. Kein serologischer Agglutinationstest kann zwischen *T. pallidum*- und anderen pathogenen Antikörpern, z.B. gegen *T. pertenue* und *T. carateum* unterscheiden. Weitere Störfaktoren sind nicht bekannt, alle positiven Ergebnisse sollten bestätigt werden, z.B. mit einem FTA-ABS-Test. Klinische Befunde sind für die abschließende Bewertung mit heranzuziehen. Bei einem schwachen oder vermeintlich positiven Ergebnis sollte der Test wiederholt werden. Eine Diagnose sollte sich nie auf einen Assay allein verlassen. Für die Interpretation sollten alle klinischen Daten mit in Betracht gezogen werden. Der Test kann bei frühen aktiven oder späten latenten Syphilisfällen ein negatives Ergebnis liefern. Ein RPR- oder VDRL-Test mit der entsprechenden Patientenprobe kann die Ergebnisse komplettieren, da diese Tests eine aktive Syphilis anzeigen.

Qualitätskontrolle

Bei jeder Testdurchführung sollten die Kontrollen oder Proben mit gekanntem Wert mit getestet werden. Die negative Kontrolle sollte nach 45 Minuten ihr negatives und die positive Kontrolle ein positives Ergebnis liefern. Bei unerwarteten Ergebnissen der Kontrollen oder der bekannten Proben, sind die Testergebnisse ungültig.

Referenz

Literatur auf Anfrage erhältlich.