

VIROTECH Treponema pallidum IgG LINE Immunoblot

(T. pallidum IgG LINE-16)

Bestell-Nr.: WE150G16

(T. pallidum IgG LINE-32)

Bestell-Nr.: WE150G32

VIROTECH Treponema pallidum IgM LINE Immunoblot

(T. pallidum IgM LINE-16)

Bestell-Nr.: WE150M16

(T. pallidum IgM LINE-32)

Bestell-Nr.: WE150M32

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Inhalt

| | |
|--|-----------|
| 1. Verwendungszweck | 3 |
| 2. Diagnostische Bedeutung | 3 |
| 3. Testprinzip | 3 |
| 4. Packungsinhalt | 4 |
| 4.1 Kit für 16 Bestimmungen..... | 4 |
| 4.2 Kit für 32 Bestimmungen..... | 4 |
| 4.3 Ctrl-Set (Kontrollen-Set): Erhältlich als Zubehör | 4 |
| 5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien | 4 |
| 6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise | 5 |
| 7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert) | 5 |
| 8. Untersuchungsmaterial | 5 |
| 9. Testdurchführung | 5 |
| 9.1 Vorbereitung der Proben..... | 5 |
| 9.2 Vorbereitung der Reagenzien..... | 6 |
| 9.3 Immunoblot Testdurchführung..... | 6 |
| 9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren..... | 7 |
| 10. Testauswertung | 7 |
| 10.1 Auswertung der Patientenproben | 7 |
| 10.2 Einsatz der Cut off Kontrolle..... | 7 |
| 10.3 Bedeutung der Antigene | 8 |
| 10.4 Auswertungskriterien | 8 |
| 10.5 Grenzen des Tests | 8 |
| 11. Leistungsmerkmale | 9 |
| 11.1 Sensitivität IgG..... | 9 |
| 11.2 Sensitivität IgM..... | 9 |
| 11.3 Spezifität | 9 |
| 11.4 Diagnostische Sensitivität | 9 |
| 11.5 10 | |
| 11.6 Kreuzreaktivität | 10 |
| 11.7 Durchseuchung (Erwartete Werte)..... | 10 |
| 11.8 Intra-Assay-Präzision (Wiederholbarkeit) | 10 |
| 11.9 Inter-Assay-Präzision (Reproduzierbarkeit) | 10 |
| 12. Literatur | 11 |
| 13. Testablaufschema | 12 |

1. Verwendungszweck

Line Immunoblot Testkit zum qualitativen Nachweis von *Treponema pallidum* spezifischen IgG- bzw. IgM- Antikörpern in Humanserum. Der Kit kann bei einer erweiterten Syphilisdiagnostik als Bestätigungstest eingesetzt werden, wenn das Ergebnis des Suchtests fraglich oder positiv ist.

2. Diagnostische Bedeutung

Die Gattung *Treponema* umfaßt mehrere humanpathogene Spezies und Subspezies. *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* ist der Erreger der Syphilis (Lues), einer nur beim Menschen vorkommende Erkrankung. Syphilis wird generell sexuell übertragen und verläuft üblicherweise in 3 Stadien: Primärstadium, Sekundärstadium und Tertiärstadium jeweils mit latenten oder inaktiven Phasen (2). Zusätzlich kann *T. pallidum* in der Schwangerschaft durch die infizierte Mutter an den Fötus weitergegeben werden (kongenitale Syphilis) (2). Die Diagnose hängt von serologischen Analysen ab, da *T. pallidum* nicht *in vitro* (1) kultiviert werden kann.

T. pallidum-Infektionen lösen beim Wirt zwei Gruppen von Antikörperbildung aus:

- a) *Treponema* unspezifische Antikörper, genannt Reagin.
- b) *Treponema* spezifische Antikörper, die mit *T. pallidum* und verwandten Stämmen reagieren.

Für eine gute Syphilis-Diagnostik empfiehlt sich folgende Stufen diagnostik (4):

1. Screeningtest: TPHA- / TPPA-Test oder ELISA (polyvalent)
2. Bestätigungstest: FTA-ABS-Test (polyvalent) oder Immunoblot
3. Beurteilung der Aktivität der Infektion: 19S-IgM-FTA-ABS (IgM-ELISA) oder VDRL-Test

Es sollte generell zwischen IgG und IgM spezifischen *Treponema*-Antikörpern unterschieden werden. IgM zeigt in der Regel eine frische, aktive Infektion an, während IgG ein Indikator für eine zurückliegende Infektion ist. Außerdem deutet eine IgM-Aktivität bei Neugeborenen auf eine kongenitale Syphilis hin (3). Nur ELISA, Immunoblot und 19S-IgM-FTA-ABS können zwischen IgG und IgM differenzieren.

Die Bewertung von *Treponema pallidum*-spezifischen IgM-Antikörpern zur Überprüfung der Behandlungsindikation einer Treponemen-Infektion ist für den normalen Infektionsverlauf gut geeignet. Ein positiver IgM-Antikörperbefund sollte immer im Zusammenhang mit der Patientenanamnese (Infektionsstadium, Therapie, klinisches Bild) beurteilt werden, da IgM-Antikörper abhängig von dem Zeitintervall zwischen Infektion und Therapiebeginn wenige Monate bis zu mehreren Jahren (persistierende IgM-Antikörper) nachweisbar bleiben. Bei Neurosyphilis, Reaktivierungen oder Zweitinfektionen kann die IgM-Antikörpersynthese nahezu vollständig unterdrückt sein (4).

3. Testprinzip

Proteine des Erreger-Antigens werden durch ein spezielles Sprühverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Nitrozellulosemembran wird dann in Einzelstreifen geschnitten.

Die Inkubation der antigentragenden Nitrozellulosestreifen mit Humanserum/-plasma-Proben erlaubt den Nachweis vorhandener spezifischer Antikörper. Diese Antikörper bilden Immunkomplexe mit dem auf den Teststreifen fixierten Antigenen. Nach Entfernung der nicht gebundenen Antikörper durch Waschschriffe, werden die einzelnen Nitrozellulosestreifen mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-human IgG- bzw. IgM- Antikörpern inkubiert. Nachdem nicht gebundene konjugierte Antikörper durch einen weiteren Waschschriff entfernt wurden, erfolgt die Sichtbarmachung der Antigen/Antikörper-Komplexe (der gebundenen Antikörper) durch die Zugabe eines ungefärbten Substrates, welches bei seiner enzymatischen Umsetzung blauviolette Banden ("Antigen-Banden") erzeugt. Die Enzym/Substrat-Reaktion wird durch Waschen der Nitrozellulosestreifen mit Aqua dest./deionisiert gestoppt. Abhängig von dem beobachteten Bandenmuster kann man auf das Vorhandensein von spezifischen IgG- bzw. IgM-Antikörpern schließen.

4. Packungsinhalt

4.1 Kit für 16 Bestimmungen

- | | | |
|---|-----------|-------------|
| 1. IgG bzw. IgM Nitrozellulose Teststreifen mit aufgespritzten Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig | 1x | 16 Streifen |
| 2. IgG bzw. IgM Cut off Kontrolle , Humanserum, vorverdünnt | 1x | 1,0 ml |
| 3. Verdünnungs-/Waschpuffer , pH7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel | 1x | 50 ml |
| 4. IgG- bzw. IgM- Konjugat (100x konz.) Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel | 1x | 0,7 ml |
| 5. Substrat (BCIP/NBT), gebrauchsfertig | 1x | 57 ml |
| 6. Auswertungsprotokollblatt zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse | 1x | 1 Stk. |

4.2 Kit für 32 Bestimmungen

- | | | |
|---|-----------|-------------|
| 1. IgG bzw. IgM Nitrozellulose Teststreifen mit aufgespritzten Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig | 2x | 16 Streifen |
| 2. IgG bzw. IgM Cut off Kontrolle , Humanserum, vorverdünnt | 1x | 1,0 ml |
| 3. Verdünnungs-/Waschpuffer , pH7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel | 2x | 50 ml |
| 4. IgG- bzw. IgM- Konjugat (100x konz.) Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel | 1x | 0,7 ml |
| 5. Substrat (BCIP/NBT), gebrauchsfertig | 1x | 57 ml |
| 6. Auswertungsprotokollblatt zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse | 1x | 1 Stk. |

4.3 Ctrl-Set (Kontrollen-Set): Erhältlich als Zubehör

| | |
|-------------------------------|----------|
| T. pallidum IgG LINE Ctrl-Set | WN150K60 |
| T. pallidum IgM LINE Ctrl-Set | WN150K80 |

| IgG bzw. IgM | gebrauchsfertige Kontrollen | Abkürzung |
|--------------------------------|---|------------|
| 0,5 ml IgG, bzw. 0,5 ml IgM | neg. Ctrl. / negative Kontrolle, Humanserum/-plasma mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig | NEG |
| 1,0 ml IgG, bzw. 1,0 ml IgM | Cut off Ctrl. / Cut off Kontrolle, Humanserum/-plasma mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig | CO |
| 0,5 ml IgG, bzw. 0,5 ml IgM | pos. Ctrl. / positive Kontrolle, Humanserum/-plasma mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig | POS |

Die positiven Banden > Cut off Bande können sie dem mitgelieferten Zertifikaten nehmen.

Die negative Kontrolle zeigt keine Banden bzw. keine für die Auswertung relevanten Banden > Cut off Bande.

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien

Testkit bei 2-8°C aufbewahren. Die Haltbarkeit der einzelnen Komponenten ist auf dem jeweiligen Etikett vermerkt; Kit-Haltbarkeit siehe Qualitätskontrollzertifikat.

- Die einzelnen Reagenzien nicht einfrieren und keinen hohen Temperaturen aussetzen.
- Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Lagerung der Reagenzien bei grellem Licht ist zu vermeiden.
- Die BCIP/ NBT-Substratlösung ist lichtempfindlich und muss im Dunkeln aufbewahrt werden.
- Nitrozellulose Teststreifen:** Streifen nach der Entnahme aus dem Beutel sofort verwenden. Beutel mit den nicht benötigten Streifen wieder fest verschließen und bei 2-8°C aufbewahren. Zur Archivierung der Ergebnisse sollten die Nitrozellulose Teststreifen unbedingt vor direktem Sonnenlicht geschützt werden, um ein Verblässen der Banden zu vermeiden.

| Material | Zustand | Lagerung | Haltbarkeit |
|---------------------|-------------------------------|---|-------------|
| Untersuchungsproben | unverdünnt | +2 bis +8°C | 1 Woche |
| Teststreifen | nach Öffnen | +2 bis +8°C (Lagerung im mitgelieferten Beutel) | 3 Monate |
| Kontrollen | nach Öffnen | +2 bis +8°C | 3 Monate |
| Konjugat | nach Öffnen | +2 bis +8°C | 3 Monate |
| | verdünnt | +2 bis +8°C | ca. 6h |
| Substrat | nach Öffnen | +2 bis +8°C (lichtgeschützt) | 3 Monate |
| Waschlösung | nach Öffnen | +2 bis +8°C (lichtgeschützt) | 3 Monate |
| | endverdünnt (gebrauchsfertig) | +2 bis +8°C | 4 Wochen |
| | endverdünnt (gebrauchsfertig) | oder Raumtemperatur | 2 Wochen |

6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

- Als Kontrollseren werden nur Seren verwendet, die getestet und als HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK und Hepatitis-B-surface-Antigen negativ befundet wurden. Trotzdem sollten Kontrollseren, Proben, verdünnte Proben, Konjugate und die Nitrozellulose Teststreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
- Bei der Durchführung des Immunoblots sind Einmalhandschuhe zu tragen und eine Plastik-Pinzette zu benutzen.
- Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.
- Die Inkubationswannen sind vom Hersteller nur für den Einmalgebrauch konzipiert. Ein mehrmaliger Gebrauch der Inkubationswannen liegt in der Verantwortung des Anwenders. Bei evtl. Mehrfachverwendung empfehlen wir, die Inkubationswannen nach Gebrauch mehrere Stunden in 1% Natriumhypochloritlösung zu desinfizieren, zu reinigen und gründlich mit Leitungswasser und Aqua dest./deionisiert zu spülen.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

- Inkubationswanne (bei Bedarf erhältlich unter Best.-Nr. WE300.08)
- Schüttler (vertikal nicht zentrifugal)
- Eine Spritzflasche zum Abstoppen
- Pipette oder Handwaschgerät
- Mikropipetten 5 µl - 1500 µl
- Pipettenspitzen
- Probenröhrchen (Tubes) 2-20 ml Volumen
- Plastikpinzette
- Aqua dest. oder deionisiert
- Filterpapier

8. Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial kann Serum und Plasma (hierbei ist die Art der Antikoagulanzen nicht von Relevanz) eingesetzt werden, auch wenn in dieser Packungsbeilage nur Serum erwähnt ist.

9. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für die Erzielung korrekter Ergebnisse.

9.1 Vorbereitung der Proben

- Pro Patientenprobe werden 15 µl Serum oder Plasma benötigt.
- Blutproben sollten aseptisch durch Venenpunktion entnommen werden. Nach vollständiger Gerinnung ist das Serum abzutrennen (entfällt bei Plasma). Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren bei -20°C eingefroren werden.
- Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Seren ist zu vermeiden.

4. Seren, die hitzeinaktiviert, lipämisch, hämolytisch oder mikrobiell kontaminiert sind, können zu verfälschten Ergebnissen führen und sollten daher nicht verwendet werden.
5. Getrübe Serumproben (insbesondere nach dem Auftauen) nicht verwenden, ggf. zentrifugieren (5 min bei 1000 x g), klaren Überstand pipettieren und im Test einsetzen.

9.2 Vorbereitung der Reagenzien

1. Zur Anpassung an die Laborroutine, können alle LINEs und EcoBlots in einem Testlauf mit gleichen Inkubationszeiten und parameter- / chargenübergreifenden Komponenten abgearbeitet werden. Die Cut off Kontrollen werden parameter- und chargenspezifisch eingesetzt.
2. Vor Verdünnung aller Testreagenzien das jeweilige Konzentrat auf Raumtemperatur bringen. Nur Aqua dest./deionisiert von hoher Qualität und Raumtemperatur verwenden.
3. Verdünnungen vor Testansatz gut durchmischen.
4. **Verdünnungs-/Waschpuffer**
Der Verdünnungs-/Waschpuffer liegt 10-fach konzentriert vor. Das Verdünnungs-/Waschpufferkonzentrat 1:10 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen (10ml/50ml/100ml Konzentrat + 90ml/450ml/900ml A. dest./deionisiert), gut mischen.
Sowohl der konzentrierte als auch der verdünnte Verdünnungs-/Waschpuffer können eventuell eine Gelbfärbung aufweisen. Diese Gelbfärbung hat weder Einfluss auf die Haltbarkeit des Verdünnungs-/Waschpuffers, noch auf die Funktionalität und diagnostische Aussagekraft des Testansatzes.
5. **IgG bzw. -IgM-Konjugat**
Das Konjugat 1 + 100 mit endverdünntem Verdünnungs-/Waschpuffer verdünnen, gut mischen. Pro Serumprobe wird 1,5ml Konjugat-Gebrauchslösung benötigt. Siehe Konjugatverdünnungstabelle (Punkt: „Testablaufschema“).
6. **Substratlösung**
Die Substratlösung wird gebrauchsfertig geliefert.

9.3 Immunoblot Testdurchführung

Achtung: Die Nitrozellulose Teststreifen dürfen nur in der freigegebenen Ig-Klasse getestet werden (siehe Etikett auf dem Blotheftechen und Bezeichnung auf jedem einzelnen Teststreifen).

Für die korrekte Durchführung und Beurteilung des *Treponema pallidum* LINEs, muß bei jedem Testansatz eine parameter- und chargenspezifische Cut off Kontrolle mitgeführt werden.

Für eine sichere *Treponema pallidum* Diagnostik sollte der LINE im IgG und IgM durchgeführt werden.

1. Die Testdurchführung erfolgt bei Raumtemperatur.
2. Für jede Probe je 1 Streifen in die Rinne einer sauberen Inkubationswanne legen. Streifen möglichst nur am markierten oberen Ende anfassen.
3. Je 1,5ml gebrauchsfertigen **Verdünnungs-/Waschpuffer** pipettieren und auf den Schüttler stellen. Darauf achten, dass die Nitrozellulose Teststreifen gleichmäßig mit Flüssigkeit bedeckt sind, die Streifen dürfen während der gesamten Testdurchführung nicht trocknen.
4. Die verstärkten Nitrozellulose Teststreifen sind innerhalb einer Minute vollständig befeuchtet und können in Rücken-, Bauch- oder Seitenlage inkubiert werden.
5. Je 15µl Patientenserum/-plasma bzw. 100µl der Cut off / Positiven / Negativen Kontrolle zu pipettieren, möglichst am oberen, markierten Streifenende. Patientenserum und Kontrolle 30 Minuten auf dem Schüttler inkubieren. Beim Pipettieren und anschließendem Abgießen darauf achten, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination der einzelnen Patientenproben kommt.
6. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen, oder vorsichtig abgießen. Beim Abgießen der Flüssigkeit bleiben die Nitrozellulose Teststreifen am Boden der Rinnen haften. Restflüssigkeit auf einem Saugpapier abtropfen.

7. Streifen **Waschen**: mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Vor Ablauf des letzten Waschschrilles die benötigte Menge an frischer Konjugatverdünnung (s. Tabelle) herstellen.
8. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
9. Je 1,5 ml der hergestellten **Konjugatverdünnung** in die entsprechenden Inkubationsrinnen pipettieren und **30 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren.
10. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen.
11. Streifen **Waschen**: mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Anschließend **1 x 1 Minute** mit **Aqua dest./deionisiert** spülen.
12. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
13. Je 1,5 ml gebrauchsfertige **Substratlösung** in die Rinnen pipettieren und **10 ± 3 Minuten** auf dem Schüttler entwickeln.
14. Farbentwicklung **stoppen** durch Abgießen der Substratlösung. Anschließend Streifen ohne Zwischeninkubation **3 x** mit je 1,5 ml **Aqua dest./deionisiert** waschen.
15. Aqua dest./deionisiert abgießen und Streifen auf ein sauberes saugfähiges Papier trocknen. Die Hintergrundfärbung, die bei feuchten Nitrozellulose Teststreifen beobachtet werden kann, geht bei den getrockneten Streifen vollständig zurück. Verstärkte Nitrozellulose Teststreifen benötigen im Vergleich zu den herkömmlichen Nitrozellulose Teststreifen etwas länger, bis sie getrocknet sind.
16. Zur Auswertung das beigefügte Auswertungsprotokoll verwenden. Die Beschriftung der hochspezifischen Banden auf dem Protokollblatt erleichtert Ihnen die Auswertung der Patientenproben.

Testablaufschema siehe letzte Seite

9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren

Für die automatisierte Abarbeitung der Blots und LINEs sind folgende Geräte validiert: Apollo und Profiblot. Grundsätzlich sind alle handelsüblichen Blotautomaten geeignet.

10. Testauswertung

Zur sicheren Auswertung ist jeder LINE Streifen mit zwei Kontrollen ausgestattet:

1. **Serumkontrolle** (= serum control):
Nur nach Inkubation mit Patientenserum erscheint unterhalb der Markierungslinie (= markline) die Seruminkubationsbande.
2. **Konjugatkontrolle** (= conjugate control):
Der LINE Streifen ist mit einer Konjugatkontrollbande ausgestattet, die nach Inkubation mit dem entsprechenden Konjugat erscheint.

Die Testdurchführung ist gültig, wenn auf dem entwickelten Nitrozellulose Teststreifen sowohl die Serumkontrolle als auch die interne Konjugatkontrolle deutlich zu erkennen ist.

Die Position der Serum- / und der Konjugatkontrollbande entnehmen Sie dem Protokollblatt.

10.1 Auswertung der Patientenproben

Die Position und Bezeichnung der reaktiven Banden entnehmen Sie bitte dem Protokollblatt.

IgG und IgM-Banden: TpN47, TmpA, TpN17, TpN15

10.2 Einsatz der Cut off Kontrolle

Banden, deren Intensität schwächer als die Cut off Bande (TpN 47) der Cut off Kontrolle sind, werden nicht in die Bewertung einbezogen. Die TpN47 Bande muß eine schwache Intensität zeigen.

Beurteilung der Bandenintensitäten:

TpN 47-Bande: Die Intensität der TpN 47-Bande der Cut off Kontrolle legt die Bewertung aller Proteinbanden im IgG und IgM wie folgt fest:

- **Geringere Intensität als die TpN 47-Bande der Cut off Kontrolle** = 0

- Gleiche Intensität wie die TpN 47-Bande der Cut off Kontrolle = 1
- Stärkere Intensität als die TpN 47-Bande der Cut off Kontrolle = 2

Die Summe der Bandenintensitäten ergibt die Gesamtbeurteilung.

10.3 Bedeutung der Antigene

Auflistung der verwendeten rekombinanten Proteine des *Treponema pallidum* - Antigens (5, 6).

| Antigen / Bezeichnung | Bedeutung der Antigene | Spezifität der Antikörper im LINE |
|-----------------------|--|---|
| TpN47 | Marker für eine primäre, sekundäre und latente Syphilis (5, 6) | Hochspezifisch für alle Infektionsstadien |
| TmpA (TpN44,5) | | |
| TpN17 | | |
| TpN15 | | |

Hinweis: Die Kombination der in der Tabelle aufgeführten hochspezifischen Antigene orientiert sich an den Vorgaben der Patente (Inhaber S. Krell) Nr.: DE 195 36 166 C1 und EP 0 855 032 B1, und den Richtlinien zur serologischen Syphilisdiagnostik, MIQ 2001: Syphilis (Hagedorn) (4).

10.4 Auswertungskriterien

Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.

| IgG-Beurteilung | |
|------------------------------|----------------|
| Summe der Bandenintensitäten | Interpretation |
| < 3 | Negativ |
| = 3 | Auffällig (*) |
| > 3 | Positiv |

| IgM-Beurteilung | |
|------------------------------|----------------|
| Summe der Bandenintensitäten | Interpretation |
| < 2 | Negativ |
| = 2 | Auffällig (*) |
| > 2 | Positiv |

(*): Bei einem auffälligen Befund sollte ein Zweitserum angefordert und/oder ein anderes Testverfahren zu Rate gezogen werden.

10.5 Grenzen des Tests

1. Ein negatives Blotergebnis schließt die Möglichkeit einer Infektion mit *Treponema pallidum* nicht vollständig aus. Die Probe kann vor Auftreten der Antikörper entnommen worden sein oder die Antikörperkonzentration liegt unter der Nachweisgrenze des Tests.
2. In seltenen Fällen können Patientenserum "inverse"-Banden zeigen (dunkler Hintergrund, weiße Banden); diese sind nicht zu bewerten, d.h. der Immunoblotist in diesen Fällen nicht auswertbar. Das Serum sollte mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.
3. Eine diagnostische Aussage bezüglich Neurosyphilis und Neugeborenensyphilis kann nicht getroffen werden, da entsprechenden Seren bzw. Liquorproben zur Evaluierung nicht vorlagen.
4. Aufgrund der hohen DNA-Homologie von *T. pallidum* subsp. *pallidum* (Syphilis), *endemicum* (endemische Syphilis) und *pertenue* (Frambösie, Yaws), zum Teil auch *Treponema carateum* (Pinta), sind Kreuzreaktivitäten zu erwarten. Das bedeutet für die Anwendung serologischer Tests, daß eine differentialdiagnostische Abgrenzung der nichtvenerischen Treponematosen nicht möglich ist (4).
5. Bei Lues latens Patienten kann es in Einzelfällen zu diskrepanten Ergebnissen zwischen dem 19S-IgM-FTA-ABS und rekombinanten Blot-Tests oder auch EIAs kommen. Die Ursache dieser Diskrepanzen bleibt derzeit unklar.
6. Bei der Interpretation von isoliert grenzwertigen bzw. positiven IgM-Ergebnissen bei Schwangeren, ist die Möglichkeit des Vorhandenseins multireaktiver IgM-Antikörper zu berücksichtigen. Diese Ergebnisse sollten mittels weiterer Tests (19S-IgM-FTA-ABS (IgM-ELISA) oder VDRL-Test, siehe „Diagnostische Bedeutung“) abgeklärt werden.

11. Leistungsmerkmale

11.1 Sensitivität IgG

In einer Studie mit u.a. Serenmaterial von Herrn Prof. Dr. H.-J. Hagedorn (Herford) wurden zur Überprüfung der Sensitivität im IgG 298 Seren mit Verdacht auf *Treponema pallidum* Infektionen im VIROTECH LINE IgG getestet. Dieses Patientenmaterial setzt sich aus verschiedenen Serenkollektiven (Syphilis-Seren des Primär- und Sekundärstadiums sowie Lues latens, Routineseren, Prostituiertenseren, ein kommerziell erhältliches Referenzserenpanel, Schwangerenseren, HIV-positive Seren und Verlaufsseren) zusammen. Die Seren wurden mit verschiedenen Referenzmethoden (Befund: Immunoblot, TPHA, FTA-ABS, Elisa u. VDRL) vorbestimmt.

| Serenkollektiv IgG (n=298) | | LINE IgG | |
|----------------------------|---------|----------|---------|
| | | Negativ | Positiv |
| Befund | Negativ | 36 | 7 |
| | Positiv | 12 | 230 |

Ein grenzwertiges Ergebnis im IgG ist in der Berechnung der Sensitivität nicht berücksichtigt worden.

In Bezug auf den Befund (Referenzmethoden) errechnet sich eine Sensitivität für IgG von 95,0 %.

11.2 Sensitivität IgM

In einer Studie von Prof. Dr. H.-J. Hagedorn wurden zur Überprüfung der Sensitivität im IgM 135 Seren im VIROTECH LINE IgM getestet. Diese Seren wurden mit dem 19S-IgM-FTA-ABS als Referenzmethode (Befund) vorbestimmt und umfassen Syphilis-Seren des Primär- und Sekundärstadiums sowie Lues latens u.a..

| Serenkollektiv IgM (n=135) | | LINE IgM | |
|-----------------------------|---------|----------|---------|
| | | Negativ | Positiv |
| Befund (19S-IgM-FTA-ABS) | Negativ | 28 | 0 |
| | Positiv | 12 | 83 |

Grenzwertige Ergebnisse im IgM sind in die Berechnungen der Sensitivität nicht berücksichtigt worden.

In Bezug auf den Befund (19S-IgM-FTA-ABS als Referenzmethoden) errechnet sich eine Sensitivität für IgM von 87,4 %.

11.3 Spezifität

Zur Ermittlung der Spezifität wurde ein Serenkollektiv bestehend aus: Blutspendern, Schwangeren und potentiell kreuzreagierenden Seren untersucht (IgG n = 387 / IgM n = 371).

| | LINE | |
|---------|------|-----|
| | IgG | IgM |
| negativ | 383 | 356 |
| positiv | 3 | 5 |

Grenzwertige Ergebnisse sind bei den Berechnungen der Spezifität nicht berücksichtigt worden.

Die Spezifität für IgG beträgt 99,2 % und IgM 98,6 %.

11.4 Diagnostische Sensitivität

Die Bewertung der diagnostischen Sensitivität beruht auf klinisch definierten Seren des Primär- und Sekundärstadiums (Serenquelle, Prof. Dr. H.-J. Hagedorn, Herford).

| Serenkollektiv IgG (n=32) | LINE IgG | |
|---------------------------|----------|---------|
| | Negativ | Positiv |

| | | | |
|-------------------------------------|----------------|---|----|
| Diagnostischer Befund/Klinik | Negativ | - | - |
| | Positiv | - | 32 |

| | | | |
|-------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|
| Serenkollektiv IgM (n=39) | | LINE IgM | |
| | | Negativ | Positiv |
| Diagnostischer Befund/Klinik | Negativ | 1 | 0 |
| | Positiv | 2 | 26 |

Grenzwertige Ergebnisse sind bei den Berechnungen der diagnostischen Sensitivität nicht berücksichtigt worden.

Aus den obigen Tabellen ist ersichtlich, daß im Gesamtbefund alle klinisch definierten Seren erkannt werden.

11.5

11.6 Kreuzreaktivität

In der Literatur (7) werden Kreuzreaktionen mit Antikörper gegen Partialantigene der Gattungen der Familie Spirochaetaceae beschrieben. Zu dieser Familie gehört sowohl die Gattung *Treponema* als auch die Gattung *Borrelia*. Kreuzreagierende Antikörper gegen die im VIROTECHLINE verwendeten Antigene TpN47, TmpA, Tp17 und Tp15 werden jedoch nicht beschrieben. In-house Testungen *Borrelia* Antikörper positiver Seren zeigten ein negatives Ergebnis für *Treponema* Antikörper. Desweiteren wurden Seren von Patienten mit Systemischem Lupus Erythematodes (SLE) getestet.

Die Ergebnisse waren ebenfalls negativ.

11.7 Durchseuchung (Erwartete Werte)

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse von Blutbankseren und Schwangerenserren:

| | | |
|--------------------|------------|------------|
| | IgG | IgM |
| Negativ | 222 | 188 |
| Grenzwertig | - | 5 |
| Positiv | 1 | - |

Bei dem einen positiv getesteten Serum handelt es sich um ein Blutspenderserum.

11.8 Intra-Assay-Präzision (Wiederholbarkeit)

Für die Ermittlung der Wiederholbarkeit wurden in einem Versuchsansatz 32 Nitrozellulose Teststreifen einer ungeschnittenen Nitrozellulosemembran mit der cut-off Kontrolle und in einem zweiten Versuchsansatz mit der positiven Kontrolle inkubiert. Die Banden zeigen auf dem gesamten Nitrozellulose-Sheet einheitliche Intensitäten.

11.9 Inter-Assay-Präzision (Reproduzierbarkeit)

Die Bestimmung der Testpräzision erfolgte in 10 unabhängigen Testansätzen mittels manueller Testung und Automatentestung von unterschiedlichen Personen.

Es wurden ein negatives Serum, ein schwach positives Serum und ein positives Serum im IgG und im IgM getestet:

| | |
|------------------------|------------|
| | IgG |
| Negativ | 10 |
| schwach Positiv | 10 |
| Positiv | 10 |

| | |
|------------------------|------------|
| | IgM |
| Negativ | 10 |
| schwach Positiv | 6/4 (*) |
| Positiv | 10 |

(*) Das IgM schwach positive Serum wurde in 10 Ansätzen 6x positiv und 4x grenzwertig bewertet.

12. Literatur

1. Lukehart, S.A., and C.M. Marra. 2007. Isolation and Laboratory Maintenance of *Treponema pallidum*. Curr. Protoc. Microbiol. Chapter 12:Unit 12A.1
2. Peeling R.W., and E.W. Hook. 2006. The pathogenesis of syphilis: the Great Mimicker, revisited. J. Pathol. 208(2):224-32.
3. Scotti, A.T., and L. Logan. 1968. A specific IgM antibody test in neonatal congenital syphilis. J. Pediatr. 73:242-243.
4. H.-J. Hagedorn, Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, MiQ 2001 (16):1-40
5. Gerber, A., S. Krell, and J. Morenz. 1996-7. Recombinant *Treponema pallidum* antigens in syphilis serology, Immunobiology. 196(5):535-49
6. Sambri, V., et al. 2001. Western Immunoblotting with five *Treponema pallidum* recombinant antigens for serologic diagnosis of Syphilis, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. (8). 3:534-539
7. Alfen, I., and H.J. Wellensiek. 1994. Die Bedeutung kreuzreagierender Antikörper für die Sero diagnostik der Lyme-Borreliose und der Syphilis. Lab. Med. (18):12-19

13. Testablaufschemata

Testdurchführung in Kurzform:

| | | |
|--------------------|---------------------------------------|--|
| Probeninkubation | 30 Minuten | 15 µl Patientenserum/-plasma/ 100 µl Kontrolle in je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer |
| Waschen | 3 x 5 Minuten | Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer |
| Konjugatinkubation | 30 Minuten | Mit 1,5 ml Gebrauchsverdünnung (1 + 100) |
| Waschen | 3 x 5 Minuten 1 x 1 Minute | Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer Mit Aqua dest./deionisiert |
| Substratinkubation | 10 ± 3 Minuten | Mit je 1,5 ml Substratlösung |
| Stoppen | 3 x ohne Zwischeninkubation | Mit je 1,5 ml Aqua dest./deionisiert |

Konjugatverdünnungstabelle: (gerundet)

| Anzahl Streifen | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------------------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|
| Verdünnungs/ Waschpuffer | 1,5ml | 3,0ml | 4,5ml | 6,0ml | 7,5ml | 9,0ml | 11,0ml | 12,0ml | 14,0ml | 15,0ml |
| Konjugat-Konzentrat | 15µl | 30µl | 45µl | 60µl | 75µl | 90µl | 110µl | 120µl | 140µl | 150µl |
| Endvolumen | 1,515ml | 3,03ml | 4,545ml | 6,06ml | 7,575ml | 9,09ml | 11,11ml | 12,12ml | 14,14ml | 15,15ml |

| Anzahl Streifen | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|--------------------------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| Verdünnungs/ Waschpuffer | 17,0ml | 18,0ml | 20,0ml | 21,0ml | 23,0ml | 24,0ml | 26,0ml | 27,0ml | 29,0ml | 30,0ml |
| Konjugat-Konzentrat | 170µl | 180µl | 200µl | 210µl | 230µl | 240µl | 260µl | 270µl | 290µl | 300µl |
| Endvolumen | 17,17ml | 18,18ml | 20,2ml | 21,21ml | 23,23ml | 24,24ml | 26,26ml | 27,27ml | 29,29ml | 30,3ml |

| Anzahl Streifen | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
|--------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Verdünnungs/ Waschpuffer | 32,0ml | 33,0ml | 35,0ml | 36,0ml | 38,0ml | 39,0ml | 41,0ml | 42,0ml | 44,0ml | 45,0ml |
| Konjugat-Konzentrat | 320µl | 330µl | 350µl | 360µl | 380µl | 390µl | 410µl | 420µl | 440µl | 450µl |
| Endvolumen | 32,32ml | 33,33ml | 35,35ml | 36,36ml | 38,38ml | 39,39ml | 41,41ml | 42,42ml | 44,44ml | 45,45ml |

| Anzahl Streifen | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
|--------------------------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| Verdünnungs/ Waschpuffer | 47,0ml | 48,0ml | 50,0ml | 51,0ml | 53,0ml | 54,0ml | 56,0ml | 57,0ml | 59,0ml | 60,0ml |
| Konjugat-Konzentrat | 470µl | 480µl | 500µl | 510µl | 530µl | 540µl | 560µl | 570µl | 590µl | 600µl |
| Endvolumen | 47,47ml | 48,48ml | 50,5ml | 51,51ml | 53,53ml | 54,54ml | 56,56ml | 57,57ml | 59,59ml | 60,6ml |