

Seraline[®] Anti-Treponema-4 IgG Seraline[®] Anti-Treponema-4 IgM

Line Immunoassay zum Nachweis von IgG oder IgM Antikörpern gegen *Treponema pallidum*
in humanem Serum oder Plasma

REF LIA-010-4 G ▼ 20 IVD *In-vitro*-Diagnostikum CE
REF LIA-010-4 M ▼ 20 IVD *In-vitro*-Diagnostikum CE



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Einführung

Treponema pallidum ssp. pallidum ist der Erreger der Syphilis, einer weltweit verbreiteten, sexuell übertragbaren Erkrankung des Menschen mit regional unterschiedlichen Neuerkrankungsraten. In westlichen Industriestaaten wird seit 2000 ein Wiederanstieg der Erkrankungszahlen beobachtet. Die Inzidenz liegt aktuell bei ca. 2-4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr (1).

Der klinische Verlauf der Syphilis ist durch verschiedene Stadien unterschiedlicher symptomatischer Bandbreite charakterisiert. Die Infektion mit *Treponema pallidum* erfolgt durch sexuelle Kontakte, wobei der Erreger an der Infektionsstelle, die im Genital-, Oral- oder Analbereich liegen kann, durch Mikroverletzungen oder auch intakte Schleimhäute eindringt. Von dort breiten sich die Treponemen systemisch über Blut- und Lymphgefäße aus. In diesem Primärstadium entwickelt sich an der Infektionsstelle eine schmerzlose Ulzeration (Ulcus durum oder auch harter Schanker) und der Befall der regionären Lymphknoten führt zur Lymphadenopathie. Unbehandelt geht die Infektion nach ca. 9-10 Wochen in das Sekundärstadium über, welches sich klinisch typischerweise in Form eines makulopapulösen Exanthems oder anderen ulzerativen Hautveränderungen äußert. Daneben treten aber auch eine Reihe weiterer, z.T. weniger charakteristischer Symptome wie generalisierte Lymphknotenschwellung, Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust, subfebrile Temperaturen u.a. auf. In den bläsigen Hautausschlägen ist der Erreger in großer Zahl enthalten. Im Verlaufe des Wochen bis Monate dauernden Sekundärstadiums werden Erreger-spezifische Antikörper gebildet. Reinfektionen sind dennoch möglich. Nach Abklingen der Symptome und einer längeren, z.T. mehrjährigen Latenzzeit wird schließlich das Tertiärstadium erreicht. Es ist durch vielfältige Symptomenkomplexe in Abhängigkeit von der zugrunde liegenden Organmanifestation gekennzeichnet. Bei Beteiligung des Zentralnervensystems kann sich das Tertiärstadium klinisch in Form der Neurosyphilis oder anderer neurologischer Symptome manifestieren (1,2).

Eine Syphilis-Infektion während der Schwangerschaft kann zur transplazentaren Übertragung des Erregers auf den Fetus (konnatale Infektion) führen, was in über 40% der Fälle Abort, Totgeburt oder Frühgeburt zur Folge hat. Die Ausprägung der Erkrankung beim Neugeborenen (Syphilis neonatorum) reicht von klinischer Unauffälligkeit (50-70% der infizierten Kinder) über blutigen Schnupfen, Haut- und Schleimhautirritationen und Fieber bis hin zu Ödemen, Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie, Enteritis, Hydrocephalus und Meningitis. In seltenen Fällen treten klinische Symptome erst im Kleinkindalter auf (3,4).

Die Therapie der Syphilis erfolgt antibiotisch. Mittel der Wahl ist Penicillin G; alternativ sind Tetrazykline und Cephalosporine wirksam (3).

Die Diagnostik einer *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* Infektion kann direkt (Erreger- oder Nukleinsäurenachweis) oder indirekt (serologischer Nachweis) erfolgen.

Der direkte Erregernachweis aus Primärläsionen, Lymphknotenpunktionen oder Abstrichen aus Exanthenen des Sekundärstadiums gelingt mittels Dunkelfeldmikroskopie oder im direkten Immunfluoreszenztest mit markierten Erreger-spezifischen Antikörpern. Der Nachteil dieser Methoden besteht in der Notwendigkeit der Testdurchführung unmittelbar nach Entnahme des Probenmaterials. Nukleinsäureamplifikationstechniken wie die PCR können aus Abstrichen, Punktionen, Blut oder Liquor durchgeführt werden. Die diagnostische Aussage ist zurzeit aber noch fraglich (2,5).

Für die Labordiagnostik einer Syphilisinfektion werden in erster Linie serologische Methoden zum Nachweis Erreger-spezifischer Antikörper aus Serum, Plasma oder aus Liquor empfohlen. Die Vorgehensweise folgt einer Stufendiagnostik bestehend aus einem Suchtest und einem Bestätigungstest (1, 2, 6).

Als Suchtest werden Treponema pallidum-Hämagglutinationstest (TPHA), Treponema pallidum-Partikelagglutinationstest (TPPA) oder ein polyvalenter Enzymimmunoassay (ELISA), der alle Antikörper-Isotypen erfasst, eingesetzt. Ein positives Suchtestergebnis muss mit einem Bestätigungstest überprüft werden.

Als Bestätigungstest hat sich der Fluoreszenz-Treponema-Antikörper-Absorptionstest (FTA-ABS-Test) etabliert. Auf Objektträgern fixierte Treponemen dienen als Testantigene für den Antikörpernachweis aus der Patientenprobe. Zur Eliminierung potentiell kreuzreagierender Antikörper müssen die Patientenproben aber mit *Treponema phagedenis* („Reiter-Treponemen“) vorinkubiert werden, um ausreichende Testspezifität zu erzielen. Alternativ zum FTA-ABS-Test kann auch ein Immunoblot oder Line Immunoassay als Bestätigungstest eingesetzt werden. Bei diesen Methoden werden Antikörper gegen verschiedene *T. pallidum* Antigene nachgewiesen (2, 4, 7). Gegenüber dem Immunoblot bietet der Line Immunoassay den Vorteil, dass ausschließlich die als *T. pallidum* spezifisch anerkannten Proteinantigene Tpp47, Tpp17, Tpp15 und TmpA in Form hochreiner, rekombinanter Proteine eingesetzt werden (8). Aufgrund ihrer Species-Spezifität sind unerwünschte Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen kommensalische Treponemen nahezu ausgeschlossen und eine Vorabsorption ist nicht mehr erforderlich (7). Zur Differenzierung zwischen einer frischen, aktiven und einer zurückliegenden Infektion sollten im Bestätigungstest IgM- und IgG-Antikörper getrennt bestimmt werden. Die Bestimmung von IgM-Antikörpern zur Beurteilung der Aktivität der Infektion kann mittels IgM Immunoblot oder Line Immunoassay oder 19S-IgM-FTA-ABS Test erfolgen. Da IgM-Antikörper über Monate bis Jahre persistieren können, ist bei positivem IgM-Antikörperbefund die Berücksichtigung klinisch-anamnestischer Befunde unbedingt in eine Therapieentscheidung mit einzubeziehen (2).

Als serologische Verlaufskontrolle nach Therapie werden quantitative Nachweisverfahren wie IgM-ELISA, 19S-IgM-Test oder Lipoidantikörpernachweis (z.B. VDRL-Test, Cardiolipin-KBR) empfohlen (2, 4, 6).

Literatur:

1. Thomas, L. (Hrsg): Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main; 5. Auflage 1998
2. Hagedorn, H.-J.; Brockmeyer, N.H.; Hunfeld, K.P.; Münstermann, D.; Potthoff, A.; Schöfer, H.: Syphilis. Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards (MiQ) 16; Urban und Fischer, München; 2. Auflage 2012
3. Brandis, H.; Eggers, H.J.; Köhler, W.; Pulverer, G. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York; 7. Völlig neu bearbeitete Auflage 1994

4. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) online (Hrsg.): Diagnostik und Therapie der Syphilis. Leitlinien der Deutschen STD Gesellschaft. 07/2008
5. Bundesministerium für Gesundheit (Hrsg.): Treponema pallidum. Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 2002; 45: 818-826
6. Neumeister, B.; Geiss, H.K.; Braun, R.W.; Kimmig, P. (Hrsg): Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York; 2. Vollständig überarbeitete Auflage 2009
7. Larsen, S.A.; Steiner, B.M.; Rudolph, A.H.: Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. Clinical Microbiology Reviews, Jan. 1995; Vol. 8, No. 1; p1-21
8. Sambri, V.; Marangoni, A.; Eyer, C.; Reichhuber, C.; Soutschek, E.; Negosanti, M.; D'Antuono, A.; Cevenini, R.: Western Immunoblotting with Five Treponema pallidum Recombinant Antigens for Serologic Diagnosis of Syphilis. Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology, May 2001; Vol. 8, No. 3; p.534-539

Anwendungsbereich

Der *Seraline*[®] Anti-Treponema-4 IgG / *Seraline*[®] Anti-Treponema-4 IgM ist ein empfindlicher Line Immunoassay (LIA) zum qualitativen Nachweis von treponemenspezifischen IgG- bzw. IgM-Antikörpern in humanem Serum oder Plasma. Er sollte als Bestätigungstest nach positiven Syphilis-Screeningtests eingesetzt werden.

Testprinzip

Die Antigene werden auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und fixiert. Nach der Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran wird diese in gebrauchsfertige Streifen geschnitten.

Die Reaktion zum Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

Die zu untersuchenden Proben werden in einer Verdünnung von 1 : 101 zusammen mit Teststreifen in den Vertiefungen der Inkubationswanne inkubiert. Dabei reagieren die spezifischen Antikörper mit den auf der Membran fixierten Antigenen. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden die nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit Wasch- und Inkubationspufferlösung (WIB) entfernt.

Schritt 2

Enzymmarkierte (Meerrettichperoxidase, POD) Konjugatantikörper (anti-human-IgG, oder -IgA oder -IgM) reagieren mit den an die Antigenbanden gebundenen Probenantikörpern. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden nicht gebundene Konjugatmoleküle durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit WIB entfernt.

Schritt 3

Während der Substratreaktion setzen die gebundenen POD-Moleküle des Konjugats das Substrat unter Ausbildung blauer Präzipitate um. Die Reaktion wird nach 10 min durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser gestoppt.

Die gefärbten Antigenbanden auf den getrockneten Teststreifen werden durch Anlegen der Auswerteschablone identifiziert und das Testergebnis entsprechend der Auswertekriterien bestimmt. Die identifizierten Banden sind im Protokoll zu dokumentieren. Alternativ können die Teststreifen mit der Evaluierungssoftware *Seraline*[®] scan automatisch ausgewertet werden.

Verwendete Treponema Antigene

Bezeichnung*	Charakterisierung / Spezifität		Herkunft
Tpp47	Hauptmembranprotein, Lipoprotein, hoch immunogen, aktiviert Endothelzellen, $M_r=47$ kDa	hochspezifisch	<i>T. pallidum</i> Nichols
TmpA	Membranassoziiertes Lipoprotein, Signalpeptid, $M_r=37$ kDa	hochspezifisch	<i>T. pallidum</i> Nichols
Tpp17	Hauptmembranprotein, Lipoprotein, $M_r=17$ kDa	hochspezifisch	<i>T. pallidum</i> Nichols
Tpp15	Hauptmembranprotein, Lipoprotein, immunogen, $M_r=15$ kDa	hochspezifisch	<i>T. pallidum</i> Nichols

* Die Nomenklatur für eine Reihe von Banden wird in der Literatur hinsichtlich Molekulargewicht, Spezifität und Wertigkeit in den einzelnen Erkrankungsstadien nicht einheitlich wiedergegeben.

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparinplasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 101 (15 µl Probe und 1500 µl WIB) mit der gebrauchsfertigen Wasch- und Inkubationslösung (hergestellt aus konzentriertem WIB (2)) in der Inkubationswanne verdünnt. Die Proben sollten steril entnommen und maximal 48 Stunden bei 2..8°C gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20°C zu lagern. Tiefgefrorene Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Die Verwendung von kontaminierten Proben kann die Hintergrundfärbung der Streifen erhöhen und darüber hinaus zu falschen Ergebnissen führen.

Testkomponenten

1	TESTSTR	Teststreifen inkl. Auswerteschablone	20 Streifen Farbcodierung: lila
2	WIB CONC 5x	Wasch- und Inkubationspuffer, 5-fach	70 ml Konzentrat, transparente Flasche, schwarze Kappe
3	CONJ HRP IgG CONJ HRP IgM	Anti-human IgG-POD-Konjugat oder Anti-human IgM-POD-Konjugat	35 ml gebrauchsfertig, rot gefärbt, transparente Flasche, rote Kappe grün gefärbt, transparente Flasche, grüne Kappe
4	SUBSTR TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	35 ml gebrauchsfertig, schwarze Flasche, blaue Kappe
5	INCUTRAY	Inkubationswanne mit Deckel	2

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

• Messzylinder und Bechergläser • Pipetten und Pipettenspitzen für 15 µl und 1500 µl
 • Kunststoffpinzette • Wipp-Schüttler • Filterpapier • Absaugsystem mit Auffanggefäß
 für infektiöse Lösungen • destilliertes oder deionisiertes Wasser

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Mit einem Testbesteck können 20 Bestimmungen durchgeführt werden.

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Teststreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung nach Öffnung innerhalb von 3 Monaten zu verbrauchen.

Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien auf Raumtemperatur zu erwärmen. Stellen Sie die gebrauchsfertige Wasch- und Inkubationslösung her, indem Sie das Wasch- und Inkubationspufferkonzentrat (5-fach) vor Verwendung gründlich schütteln und 1 : 5 mit destilliertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 20 ml WIB (5-fach) + 80 ml destilliertes Wasser

Testdurchführung

- Der Test ist bei Raumtemperatur (18...25°C) durchzuführen.
- Teststreifen mit einer Kunststoffpinzette so in die Inkubationswanne legen, dass die aufgedruckten Nummern nach oben zeigen.
- Alle Inkubationsschritte sollten auf einem Wipp-Schüttler mit einer empfohlenen Schüttelfrequenz von ca. 20 bis 30 Rotationen pro Minute erfolgen.
- Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Arbeitsschritte

1. Teststreifen mit **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) **5 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
2. **15 µl** Probe zugeben.
3. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
4. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
5. **1,5 ml** **CONJ HRP** zugeben.
6. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
7. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
8. Teststreifen mit **1,5 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** auf Wipp- Schüttler inkubieren.
9. Substrat absaugen und Teststreifen zum Abstoppen der Farbreaktion **3 x** mit **1,5 ml** destilliertem Wasser spülen.
10. Die Teststreifen sind nach dem Abstoppen zwischen Filterpapier zu trocknen und anschließend auszuwerten.

Achtung:

Bei „Problemseren“ (Hypergammaglobulinämien, zirk. Immunkomplexe, Milchantikörper) kann sich der Hintergrund der Streifen sehr schnell blau färben. In solchen Fällen ist die Farbreaktion vorzeitig durch dreimaliges Spülen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser zu stoppen.

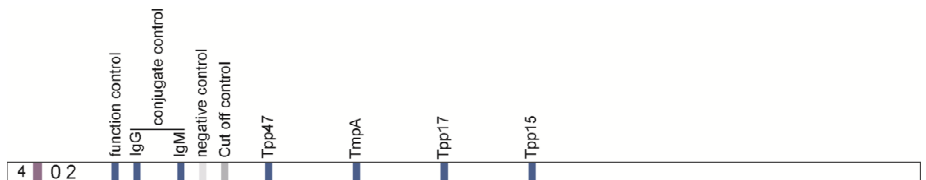
Auswertung

Gültigkeitskriterien für den Test

Auf jedem Teststreifen des *Seraline*[®] Anti-Treponema-4 IgG / *Seraline*[®] Anti-Treponema-4 IgM sind untereinander 5 Kontrollbanden aufgetragen:

- Die Funktionskontrolle (positive Bande mit jeder Probe).
- Die Konjugatkontrollen IgG und IgM (positive Bande nur mit dem eingesetzten Konjugat IgG oder IgM).
Achtung: Die jeweils andere Konjugatkontrolle kann in Abhängigkeit von der Probe auch eine blassere, unspezifische Bande zeigen.
- Die Negativ-Kontrolle (Bandenintensität muss kleiner sein, als die der Cut-off-Kontrolle).
- Die Cut-off-Kontrolle (Bandenintensität dient der Bewertung der diagnostischen Banden als positiv oder negativ).

Der Test kann ausgewertet werden, wenn die Funktionskontrolle, die erwartete Konjugatkontrolle und die Cut-off-Kontrolle sichtbar sind.



Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung sollte nur an trockenen Streifen erfolgen. Die Teststreifen können mit Hilfe der Evaluierungssoftware *Seraline*[®]scan automatisch ausgewertet werden. Alternativ kann die Zuordnung der Banden mit Hilfe der beiliegenden Auswerteschablone durchgeführt werden. Die identifizierten Banden sind im Protokoll zu dokumentieren.

Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

Bewertung	IgG	IgM
negativ	max. 1 Bande ≥ Cut-off-Kontrolle	keine Bande ≥ Cut-off-Kontrolle
positiv	min. 2 Banden ≥ Cut-off-Kontrolle	min. 1 Bande ≥ Cut-off-Kontrolle

Inverse Antigenbanden (helle Antigenbande auf dunklem Hintergrund) sind als negativ zu bewerten. Die entsprechende Probe sollte mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.

Leistungsmerkmale

Sensitivität

Zur Ermittlung der Sensitivität des **Seraline® Anti-Treponema-4 IgG** wurden insgesamt n=230 Seren mit Verdacht auf *Treponema pallidum* Infektion untersucht. Die Serumproben wurden zuvor mit unterschiedlichen Referenzmethoden (TPHA, TPPA, Immunoblot, VDRL) vorcharakterisiert.

n = 230		Referenzbefund	
		positiv	negativ
Seraline® Anti-Treponema-4 IgG	positiv	217	3
	negativ	6	4

Sensitivität des **Seraline® Anti-Treponema-4 IgG** im Vergleich zum Referenzbefund: **97,3%** (217/223).

In der folgenden Tabelle sind die **Seraline®** Ergebnisse der mit verschiedenen Referenzmethoden befundenen Proben getrennt aufgelistet.

Panel	Sensitivität			
	Seraline® Anti-Treponema-4 IgG	Immunoblot	TPHA	TPPA
1 n=136	96,3% (131/136)	100% (136/136)	-	-
2 n=45	97,8% (44/45)	97,8% (44/45)	100% (45/45)	-
3 n=42	100% (42/42)	100% (42/42)	-	100% (42/42)

Zur Ermittlung der Sensitivität des **Seraline® Anti-Treponema-4 IgM** wurden insgesamt n=211 Seren mit Verdacht auf *Treponema pallidum* Infektion untersucht. Die Serumproben wurden zuvor mit einem kommerziell erhältlichen Immunoblot (Referenzmethoden) vorcharakterisiert.

n = 211		Referenzbefund	
		positiv	negativ
Seraline® Anti-Treponema-4 IgM	positiv	101	15
	negativ	4	91

Sensitivität des **Seraline® Anti-Treponema-4 IgM** im Vergleich zum Referenzbefund: **96,2%** (101/105).

In der folgenden Tabelle sind die **Seraline®** Ergebnisse der mit verschiedenen Referenzmethoden befundenen Proben getrennt aufgelistet.

Panel	Sensitivität		
	Seraline® Anti-Treponema-4 IgM	Immunoblot A	Immunoblot B
1 n=48	93,8% (45/48)	100% (48/48)	-
2 n=42	97,6% (41/42)	100% (42/42)	100% (42/42)
3 n=15	100% (15/15)	100% (15/15)	86,6% (13/15)

Spezifität

Zur Ermittlung der Spezifität wurden 407 Blutspenderseren und 50 Seren von Schwangeren mit den **Seraline® Anti-Treponema-4 IgG / Seraline® Anti-Treponema-4 IgM** untersucht.

Von diesen Proben wurde 2 (Blutspenderkollektiv) im IgM-Nachweis und keine im IgG-Nachweis positiv bestimmt.

Seraline® Anti-Treponema-4 IgG: 100%

Seraline® Anti-Treponema-4 IgM: 99,6%

Grenzen der Methode

Eine Interpretation des Ergebnisses soll nur in enger Verbindung mit den klinischen Befunden erfolgen. Ein negatives *Seraline*[®] Treponema Ergebnis kann eine Infektion mit *Treponema pallidum* nicht vollständig ausschließen. In begründeten Einzelfällen können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Wie bei allen immunologischen Bestimmungsmethoden können Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Nichtkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.

Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben bis zu einer Konzentration von 500 mg/dl (Hämoglobin), 1000 mg/dl (Lipide) und 20 mg/dl (Billirubin C und Billirubin F) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse. Rheumafaktoren bis zu einer Konzentration von 500 IU/ml beeinflussen ebenfalls nicht die Ergebnisse.

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Teststreifen und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Teststreifen dürfen nur mit einer Kunststoffpinzette gehandhabt werden. Vor Testbeginn sollten im Protokollvordruck Probenidentifikationsnummer, Teststreifennummer und Chargennummer notiert werden. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Wasch- und Inkubationspuffer und Substrat.** Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8°C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

- **Nicht essen, trinken oder rauchen!**
- **Nie mit dem Mund pipettieren!**
- **Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!**
- **Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!**



Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2018-03-15	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Aktualisierung



Hersteller



Bestell-Nummer



Chargen-Nummer



Anzahl der Bestimmungen



Biologische Gefahr



Hinweise beachten



Verfallsdatum



Lagertemperatur



Arbeitsanleitung beachten

Seraline[®] Anti-Treponema-4 IgG Seraline[®] Anti-Treponema-4 IgM

Line Immunoassay for detection of IgG or IgM antibodies to *Treponema pallidum*
in human serum or plasma

REF LIA-010-4 G ▼ 20 IVD *In-vitro*-diagnostic device CE
REF LIA-010-4 M ▼ 20 IVD *In-vitro*-diagnostic device CE



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Introduction

Treponema pallidum ssp. pallidum is the causative agent of Syphilis, a sexually transmitted globally spread disease in humans. The incidence varies depending on the region and a consistent increase is observed since 2000 in western industrial nations with an actual level of 2-4 cases per 100,000 population per year (1).

The clinical course of Syphilis is characterized by different stages with varying symptoms. Infection occurs by sexual contacts. Skin lesions but also intact mucosa in the genital, oral or anal region are the most likely sites of entry for the pathogen and from there it spreads via blood and lymph vessels. During this primary stage a painless ulcer (ulcus durum) develops at the site of entry and a swelling of the regional lymph nodes (lymphadenopathy). Without treatment the infection will enter into the secondary stage after 9-10 weeks. Clinical signs are patchy papular exanthems or other ulcerative skin irritations, accompanied by several less characteristic symptoms like lymphadenopathy, fatigue, weight loss, subfebrile temperatures etc. The papular skin rashes contain a large number of pathogens. In the course of the secondary stage, which lasts between weeks to months, specific antibodies are produced. Nevertheless reinfections may occur. After decline of the symptoms and a latency period of up to several years the tertiary stage with a wide range of symptoms depending on the respective organ manifestations develops. Involvement of the central nervous system results in the clinical picture of Neurosyphilis or other neurological manifestations (1, 2).

Connatal *T. pallidum* infection by transplacental transmission during pregnancy causes spontaneous abortion, premature birth or stillbirth in 40% of the cases. About 50-70% of infected neonates are clinically unsuspectacular. Otherwise symptoms like bloody rhinitis, skin and mucosa irritations, fever, oedema, hepatosplenomegaly, lymphadenopathy, enteritis, hydrocephalus and meningitis may occur. In rare cases clinical symptoms do not develop before early childhood (3, 4).

Antibiotic treatment with Penicillin G is the method of choice for Syphilis therapy. Alternative antibiotics are tetracyclines and cephalosporines (3).

Treponema pallidum infections are diagnosed either by direct (pathogen detection or PCR) or indirect (serology) methods.

Direct pathogen detection from aspirates or smears of primary lesions, lymph nodes or exanthems by dark-field microscopy or direct immune fluorescence is hampered by the necessity to test the samples immediately after collection. Nucleic acid amplification techniques like PCR from aspirates, smears, blood or liquor are available but the diagnostic relevance is currently questionable (2, 5).

Laboratory diagnosis of Syphilis is preferably performed by detection of *T. pallidum* specific antibodies in serum, plasma or liquor. A two-step algorithm comprising a first screening and a subsequent confirmatory test is recommended (1, 2, 6). *Treponema pallidum* hemagglutination test (TPHA) or *Treponema pallidum* particle agglutination test and a polyvalent, IgG, IgA and IgM antibody detecting enzyme immunoassay (ELISA) are suitable screening methods. A positive or questionable screening result must be checked by a confirmatory test.

The Fluorescence *Treponema* Antibody Absorption test (FTA-ABS test) is an established confirmatory test. *Treponema* fixed to the surface of glass slides serve as target antigens for antibody detection from patient samples. In order to reach satisfying test specificity potentially cross reactive antibodies have to be eliminated by absorption with *Treponema phagedenis*. Immunoblots or line immunoassays are also suitable confirmatory tests (2, 4, 7). The major advantage of line immunoassays is the use of defined, highly purified recombinant antigens (Tpp47, Tpp17, Tpp15 and TmpA), that are confirmed as *T. pallidum* specific (8). Therefore cross reactivities appear unlikely and an absorption step is not needed (7). For differentiation between acute and recent infections confirmatory testing should always include the separate detection of IgG and IgM antibodies. Either immunoblot or line immunoassay or 19S-IgM-FTA-ABS test can be used to detect specific IgM antibodies for evaluation of the activity of the infection. Since IgM antibodies may persist for months up to years, a positive IgM result must always consider clinical findings for therapeutic decisions (2).

Quantitative detection methods like IgM-ELISA, 19S-IgM-Test or Lipoid antibody detection (e.g. VDRL-test, Cardiophilin-KBR) are recommended for serological follow-up after therapy (2, 4, 6).

Literature:

1. Thomas, L. (Hrsg): Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main; 5. Auflage 1998
2. Hagedorn, H.-J.; Brockmeyer, N.H.; Hunfeld, K.P.; Münstermann, D.; Potthoff, A.; Schöfer, H.: Syphilis. Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards (MIQ) 16; Urban und Fischer, München; 2. Auflage 2012
3. Brandis, H.; Eggers, H.J.; Köhler, W.; Pulverer, G. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York; 7. Völlig neu bearbeitete Auflage 1994
4. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) online (Hrsg.): Diagnostik und Therapie der Syphilis. Leitlinien der Deutschen STD Gesellschaft. 07/2008
5. Bundesministerium für Gesundheit (Hrsg.): *Treponema pallidum*. Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 2002; 45: 818-826
6. Neumeister, B.; Geiss, H.K.; Braun, R.W.; Kimmig, P. (Hrsg): Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York; 2. Vollständig überarbeitete Auflage 2009
7. Larsen, S.A.; Steiner, B.M.; Rudolph, A.H.: Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. Clinical Microbiology Reviews, Jan. 1995; Vol. 8, No. 1; p1-21
8. Sambri, V.; Marangoni, A.; Eyer, C.; Reichhuber, C.; Soutschek, E.; Negosanti, M.; D'Antuono, A.; Cevenini, R.: Western Immunoblotting with Five *Treponema pallidum* Recombinant Antigens for Serologic Diagnosis of Syphilis. Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology, May 2001; Vol. 8, No. 3; p.534-539

Intended use

The *Seraline*[®] Anti-Treponema-4 IgG / *Seraline*[®] Anti-Treponema-4 IgM is an in vitro diagnostic device (Line Immunoassay, LIA) for the qualitative detection of specific IgG or IgM antibodies against *Treponema pallidum* in human serum or plasma samples. It should be used as a confirmatory test after a positive ELISA result.

Principle of the test

The antigens are plotted on nitrocellulose membranes and blocked to avoid unspecific reactions. After this procedure the membrane is cut into strips. The reaction for detection of specific antibodies is performed in 3 steps:

Step 1

The test strips are incubated in the diluted (1 : 101) serum or plasma samples for 45 minutes. Specific antibodies present in the samples react with the membrane bound antigens during that time. After incubation unbound proteins are removed by 3 washing cycles.

Step 2

The second incubation starts with the addition of enzyme labelled, isotype specific conjugate antibodies to the nitrocellulose strips. After 45 minutes of incubation unbound conjugate is removed by 3 washing cycles.

Step 3

The addition of the colourless precipitating substrate stains the membrane bound immune complexes by formation of blue precipitates. The reaction is stopped after 10 minutes by aspirating the substrate followed by rinsing the strips with sufficient quantity of distilled or deionized water.

After drying the strips, interpretation of the resulting pattern is done by comparison with the specific template. Alternatively the strips can be evaluated with the *Seraline*[®]scan software.

Used Treponema antigens

Nomenclature*	Properties / Specificity	Origin
Tpp47	Main membrane protein, Lipoprotein, Highly immunogenic, activates endothelial cell, M _r =47 kDa	Highly specific <i>T. pallidum Nichols</i>
TmpA	Membrane associated lipoprotein, signal peptide, M _r =37 kDa	Highly specific <i>T. pallidum Nichols</i>
Tpp17	Main membrane protein, Lipoprotein, M _r =17 kDa	Highly specific <i>T. pallidum Nichols</i>
Tpp15	Main membrane protein, Lipoprotein, immunogenic, M _r =15 kDa	Highly specific <i>T. pallidum Nichols</i>

* The nomenclature for some bands is not consistently used in the literature concerning molecular mass and specificity, respectively.

Preparation and storage of samples

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. Samples have to be diluted 1 : 101 (15 µl sample and 1500 µl WIB) with the ready to use wash and incubation solution (prepared from concentrated WIB (2)) in the incubation tray. Sample collection should be done in a sterile manner. Samples can be stored at 2...8°C for a maximum of 48 hours. For longer storage times samples have to be stored at -20°C. Frozen samples have to be warmed to room temperature and mixed well before starting the test run. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Kit components

1	TESTSTR	test strips incl. evaluation template	20 strips colour coded: purple
2	WIB CONC 5x	wash and incubation buffer 5-fold	70 ml concentrate, transparent bottle, black cap
3	CONJ HRP IgG	anti-human IgG-HRP-conjugate	35 ml , ready to use, coloured red, transparent bottle, red cap coloured green, transparent bottle, green cap
	CONJ HRP IgM	anti-human IgM-HRP-conjugate	
4	SUBSTR TMB	substrate 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	35 ml , ready to use, black bottle, blue cap
5	INCUTRAY	incubation tray with cover	2

Materials required but not provided

- glassware
- pipettes and tips for 15 µl and 1500 µl
- plastic forceps
- rocking platform (vertical)
- filter paper
- collecting devices for infectious material
- distilled or deionized water

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 20 determinations. The complete test kit with closed reagent bottles is stable until the expiry date printed on the labels when stored at 2...8°C. After opening and proper storage as requested the reagents have to be used within 3 months.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. Ready to use wash and incubation solution has to be prepared from the 5-fold concentrated WIB (2) by dilution of 1 : 5 with distilled water. Mix the concentrate before dilution.

For example: 20 ml WIB (5-fold) + 80 ml distilled water

Assay procedure

- The test has to be performed at room temperature (18...25°C).
- The test strips have to be transferred into the incubation tray by use of plastic forceps in a way that the printed strip number on the top is visible.
- All incubation steps should be done on a rocking platform with a recommended frequency of rocking of about 20 - 30 rotations per minute.
- The following procedure has to adhere strictly to the time table.

Working steps

1. Incubate the test strips with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)) on a rocking platform for **5 min**.
2. Add **15 µl** sample.
3. Cover the incubation tray and incubate for **45 min** on a rocking platform.
4. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
5. Add **1.5 ml** **CONJ HRP**
6. Cover the incubation tray and incubate **45 min** on a rocking platform.
7. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
8. Incubate the test strips with **1.5 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** on a rocking platform.
9. Aspirate substrate and rinse the test strips **3 x** with **1.5 ml** distilled water to stop the reaction.
10. The developed test strips have to be dried between filter paper before evaluation.

Please Note:

With so-called „problematic“ samples (e.g. from patients with hypergammaglobulinaemia, circulating immune complexes, antibodies to milk proteins) the background develops rapidly and the test strips discolour blue. In such cases the substrate reaction has to be terminated earlier.

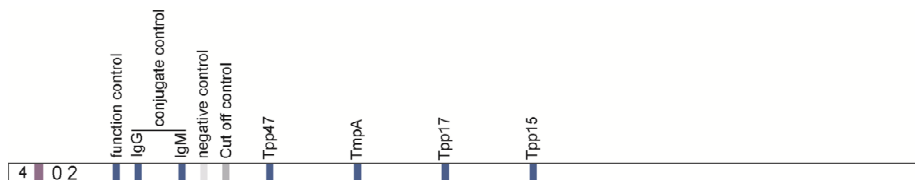
Test evaluation

Test validity

The *Seraline*[®] Anti-Treponema-4 IgG / *Seraline*[®] Anti-Treponema-4 IgM test strips contain 5 consecutive control lines beneath the strip number:

- Function control (positive reaction with every sample).
- Conjugate controls IgG and IgM (positive reaction with the corresponding conjugate).
Note: The other conjugate control band may develop a weak, non-specific colour.
- Negative control (band intensity must be less than the Cut off control).
- Cut off control (band intensity is used for result evaluation of the diagnostic bands).

The test run is valid if the function control, the corresponding conjugate control and the Cut off control are clearly visible.



Result interpretation

Generally the evaluation of the test has to be done with dried strips. To support identification of stained bands the evaluation template should be used. The identified bands have to be documented on the data sheet. Alternatively the strips can be evaluated with the *Seraline*[®] scan software. Judgement of the bands is performed according to the following classification:

Result interpretation	IgG	IgM
negative	max. 1 band ≥ Cut off control	no bands ≥ Cut off control
positive	min. 2 bands ≥ Cut off control	min. 1 band ≥ Cut off control

Inverse bands (bright bands on dark background) should be evaluated as negative. The respective serum should always be examined using other serological methods.

Performance characteristics

Sensitivity

Serum samples (n = 230) from patients with suspect of syphilis were investigated in a study using **Seraline® Anti-Treponema-4 IgG**. The serum samples have been pre-determined with different reference methods (TPHA, TPPA, Immunoblot, VDRL).

n = 230		Reference results	
		positive	negative
Seraline® Anti-Treponema-4 IgG	positive	217	3
	negative	6	4

Sensitivity of the **Seraline® Anti-Treponema-4 IgG** in comparison to the reference results: **97.3%** (217/223).

The following table presents the **Seraline®** sensitivity results compared to the different reference methods.

Panel	Sensitivity			
	Seraline® Anti-Treponema-4 IgG	Immunoblot	TPHA	TPPA
1 n=136	96.3% (131/136)	100% (136/136)	-	-
2 n=45	97.8% (44/45)	97.8% (44/45)	100% (45/45)	-
3 n=42	100% (42/42)	100% (42/42)	-	100% (42/42)

Serum samples (n = 211) from patients with suspect of syphilis were investigated in a study using **Seraline® Anti-Treponema-4 IgM**. The serum samples have been pre-determined with an Immunoblot (reference method).

n = 211		Reference results	
		positive	negative
Seraline® Anti-Treponema-4 IgM	positive	101	15
	negative	4	91

Sensitivity of the **Seraline® Anti-Treponema-4 IgM** in comparison to the reference results: **96.2%** (101/105).

The following table presents the **Seraline®** sensitivity results compared to the different reference methods.

Panel	Sensitivity		
	Seraline® Anti-Treponema-4 IgM	Immunoblot A	Immunoblot B
1 n=48	93.8% (45/48)	100% (48/48)	-
2 n=42	97.6% (41/42)	100% (42/42)	100% (42/42)
3 n=15	100% (15/15)	100% (15/15)	86.6% (13/15)

Specificity

A population of 407 healthy blood donors and 50 samples from pregnant women were investigated to determine the specificity of *Seraline*[®] Anti-Treponema-4 IgG and *Seraline*[®] Anti-Treponema-4 IgM Line Immunoassays.

Out of this population no serum samples were determined positive for IgG and 2 serum samples (blood donor collective) were determined positive for IgM antibodies with the *Seraline*[®] Anti-Treponema-4 IgG and *Seraline*[®] Anti-Treponema-4 IgM resp. resulting in a specificity of

***Seraline*[®] Anti-Treponema-4 IgG: 100%**

***Seraline*[®] Anti-Treponema-4 IgM: 99.6%**

Limitations of the procedure

The final result interpretation should always consider clinical findings. Individual cases may require repeated investigations of samples taken at intervals of several weeks. As in other Immunoassays, impurities and cross contamination of reagents and samples by fungi or bacteria can produce false positive as well as false negative results. Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the test strips or insufficient rinsing after substrate reaction and also incorrect timing can produce erroneous results.

Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples did not interfere with the test up to a concentration of 500 mg/dl (hemoglobin), 1000 mg/dl (lipids) and 20 mg/dl (bilirubin C and bilirubin F). Rheumatoid factors did not interfere up to a concentration of 500 IU/ml.

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instruction carefully. The test should be performed by trained technical laboratory staff only. The test instructions have to be followed strictly. Do not use reagents from damaged packages or bottles. Handle the test strips with plastic forceps only. Prior to testing the identification numbers of the samples, the numbers of the test strips and the lot number of the kit should be documented on the data sheet. The expiry dates stated on the respective labels are to be observed.

Do not use or mix reagents from different lots except for wash and incubation buffer and for substrate.

Do not use reagents from other manufacturers to complete the kit. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact immediately remove by rinsing with water. All reagents should be stored at 2...8°C. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should be observed:

- **Do not smoke, eat or drink while handling kit material!**
- **Never pipette by mouth!**
- **Always use protective gloves!**
- **Note safety precautions of the single test components!**



History of changes

Version	Section	Modifications
2018-03-15	Common advices and precautions	Update



Manufacturer



Catalogue-No.



Lot-No.



Number of determinations



Biohazard



Notice advices



Use by



Storage temperature



Consult instructions for use