

# recomBlot Treponema IgG

## recomBlot Treponema IgM

Immunoblot-Test mit rekombinant produzierten und gelelektrophoretisch aufgetrennten Antigenen zur Bestimmung von IgG- und IgM-Antikörpern gegen **Treponema pallidum** in humanem Serum oder Plasma.

### 1. Allgemeines/ Verwendungszweck

Der recomBlot Treponema ist ein qualitativer *in-vitro*-Test zum Nachweis und zur Identifizierung von IgG- bzw. IgM-Antikörpern gegen *Treponema pallidum* in humanem Serum oder Plasma. Im Unterschied zu Enzymimmunoassays oder Spotttests erlaubt der Test, durch die elektrophoretische Auftrennung der Antigene, eine sichere Identifizierung und Lokalisation von spezifischen Antikörpern.

### 2. *Treponema pallidum* und Syphilis

Die Gattung *Treponema* enthält mehrere humanmedizinisch wichtige Spezies und Subspezies. *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* ist der Erreger der Syphilis oder Lues. Es handelt sich um 0,2 µm breite, 5 bis 15 µm lange Bakterien, die sich durch Rotation um ihre Längsachse fortbewegen. Die Kultivierung *in vitro* ist bis heute nicht gelungen.

#### 2.1 Epidemiologie

Die Syphilis (Lues) kommt nur beim Menschen vor. Obwohl *T. pallidum* über die letzten vier Jahrzehnte keine Resistenzen gegen Penicillin entwickelt hat, bleibt die Syphilis eine bedeutende sexuell übertragene Krankheit des Menschen. Nach Schätzungen der WHO traten 1995 weltweit ca. 12 Mio. Neuinfektionen bei Erwachsenen auf. In Deutschland ist die Zahl der Neuinfektionen seit 1950 von 85 auf 1,4 pro 100.000 Einwohner im Jahr 1990 zurückgegangen. Allerdings ist in den USA ein Wiederanstieg der Infektionshäufigkeit zu beobachten. Auch für Westeuropa ist wahrscheinlich mit zunehmenden Syphiliszahlen zu rechnen (1).

#### 2.2 Pathogenese und Klinik

Die Infektion erfolgt durch direkten Kontakt mit erregerhaltigen Läsionen über Mikrotraumen der Haut oder Schleimhaut. Die Krankheit läuft in Stadien ab. An der Infektionsstelle bildet sich nach 5 - 90 (im Mittel 21) Tagen eine Läsion (Primärstadium, harter Schanker, Lues I). Die *Treponemen* sind im Geschwür nachweisbar. Durch die Entwicklung der lokalen Immunität kommt es letztendlich zur Abheilung des Primärherdes.

3-6 Wochen später entwickelt sich das Sekundärstadium (Lues II), welches 1. durch die hämatogene Ausbreitung des Erregers im gesamten Organismus, 2. durch die Entstehung von multiplen Hautläsionen und 3. durch die Ausbildung einer partiellen systemischen Immunität, charakterisiert ist. Das Sekundärstadium der Syphilis dauert Wochen bis Monate. Rezidive sind in den ersten zwei Jahren nach Infektion, seltener auch später möglich. Während des Primär- und Sekundärstadiums ist der Träger infektiös.

Im Anschluss folgt eine klinisch stumme Phase der Latenz von 1 - 20 Jahren und länger. Der Erreger ist nicht eliminiert, hat sich aber wahrscheinlich in immunologische Nischen, wie z.B. dem Gewebe des Zentralnervensystems zurückgezogen.

Die darauffolgenden Manifestationen an Haut, Schleimhäuten und verschiedenen Organen, der tertiären Syphilis (Lues III), betreffen ca. ein Drittel der nicht behandelten Syphilispatienten. Krankheitsbilder sind gummöse Syphilis (Knoten/Geschwüre, heute seltener), kardiovaskuläre Syphilis und die Neurosyphilis. Zu den Spätphase-Symptomen gehören Verlust der Muskelkoordination, fehlendes Schmerzempfinden, gradielle Erblindung, Demenz, Impotenz, plötzlicher Schmerz, Tumorentwicklung und weitere Erkrankungen mit z.T. tödlichem Ausgang.

Während der Schwangerschaft kann der Erreger auf den Fötus übertragen werden (Syphilis connata). In etwa 40 % der Fälle führt dies zum Abort oder zum Tod des Kindes kurz nach der Geburt. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion des Fötus liegt bei 40-70 %. Zeigt ein infiziertes Neugeborenes keine Symptome, treten diese, bei fehlender Therapie, innerhalb von Wochen auf. Ungefähr 12 % der infizierten Neugeborenen sterben an der Erkrankung.

### 3. Diagnostik

Der direkte Erregernachweis ist in der Praxis nur bei der Untersuchung von Primärläsionen sinnvoll. Die klassische Dunkelfeldmikroskopie ist relativ insensitiv. Alternativ können fixierte Ausstriche mit FITC-markierten spezifischen Antikörpern untersucht werden.

Die Sensitivität der PCR-Methode wird unterschiedlich beurteilt. Sie bleibt in der Regel Speziallabors vorbehalten.

Die Serodiagnose der Syphilis erfolgt als Stufendiagnose. Als Antikörpersuchtest wird in der Regel der *T. pallidum*-Hämagglutinationstest (TPHA) angesetzt. Alternativ bietet sich der *recomWell* Treponema IgG/ IgM als modernes Screeningverfahren an. Die Spezifität und Sensitivität der Screeningtests sind vergleichbar. Hauptvorteil des *recomWell* Treponema IgG/ IgM ist die Möglichkeit IgG- und IgM-Antikörper getrennt zu erfassen, ebenso wie die einfachere automatisierte Abarbeitung bei großen Stückzahlen. Bei negativem Befund entfallen weiterführende Untersuchungen. Andernfalls schließen sich Bestätigungsteste zur Sicherung der Spezifität und Beurteilung der möglichen Aktivität an. Klassischerweise werden hierfür der FTA-Abs-Test, die *T. pallidum*-spezifische IgM-Antikörperdiagnostik sowie der Lipidantikörpernachweis eingesetzt.

Der *recomBlot* Treponema IgG/IgM offeriert eine ideale Alternative zu den herkömmlichen Bestätigungstesten. Er weist gegenüber den genannten immunologischen Verfahren zusätzliche Kriterien hinsichtlich Sensitivität und Spezifität auf (siehe 12).

### 4. Testprinzip

Für den *recomBlot* Treponema IgG bzw. IgM werden die spezifischen *Treponema pallidum* Antigene Tp 47, TmpA, Tp 37, Tp 17 und Tp 15 mit Hilfe rekombinanter *E. coli* Zellen hergestellt (3). Die verwendeten gereinigten, rekombinanten Antigene werden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die *Treponema pallidum*-Proteine werden dann elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Western-Blotting). Die Membran wird anschließend zur Blockierung freier Bindungsstellen mit einer Proteinlösung inkubiert, gewaschen und nach Zerschneiden in Streifen in Röhrchen verpackt.

Zum Nachweis von *Treponema pallidum* spezifischen Antikörpern werden die Streifen mit der verdünnten Serumprobe inkubiert, wobei die Antikörper sich an die Antigene auf den Streifen anlagern. Nicht-gebundene Antikörper werden anschließend abgewaschen und die Streifen in einer zweiten Inkubation mit anti-human-IgG bzw. anti-human-IgM inkubiert, das mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Mit einer durch die Peroxidase katalysierten Färbereaktion werden spezifisch gebundene Antikörper nachgewiesen. Falls eine Reaktivität gegen eines der *Treponema pallidum* Proteine gefunden wird, erscheint diese als dunkle Bande auf dem Streifen.

Als Reaktionskontrolle ist am oberen Ende der Streifen (unter der Nummer) eine Bande mit anti-human-Immunglobulin aufgetragen, die bei jedem Serum eine Reaktion zeigen muss.

## 5. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 20 Bestimmungen.

Jeder Reagenziensatz enthält:

<b>WASHBUF 10 X</b>	100 ml	Waschpuffer ( <b>zehnfach konzentriert</b> ) Enthält Phosphat-Puffer, NaCl, KCl, Detergenz, Konservierungsmittel: Methylisothiazolon und Oxyprion
<b>SUBS TMB</b>	45 ml	Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB, <b>gebrauchsfertig</b> )
<b>MILKPOW</b>	5 g	Magermilchpulver
<b>INCUTRAY</b>	2 Stück	Inkubations-Schalen mit je 10 Vertiefungen
<b>CONTRSTR</b>	1	Vorentwickelter Kontrollstreifen (kitspezifisch)
<b>INSTRU</b>	1	Gebrauchsinformation
<b>EVALFORM</b>	1	Auswertebogen

### 5.1 recomBlot Treponema IgG

Jeder Reagenziensatz enthält zusätzlich zu den unter Punkt 5 aufgeführten Komponenten:

<b>TESTSTR</b>	2 Stück	Röhrchen mit 10 fortlaufend nummerierten Western-Blot-Teststreifen beschichtet mit <i>Treponema</i> -Antigenen.
<b>CONTROL ± IgG</b>	70 µl	Schwachpositiv IgG-Serumkontrolle ( <b>Rote</b> Verschlusskappe) Humaner Ursprung, anti-HIV-1/2, anti-HCV und HBs-Ag negativ
<b>CONJ IgG</b>	60 µl	Anti-human IgG Konjugat ( <b>tausendfach konzentriert, Grüne</b> Verschlusskappe) Aus Kaninchen, enthält NaN <sub>3</sub> .

### 5.2 recomBlot Treponema IgM

Jeder Reagenziensatz enthält zusätzlich zu den unter Punkt 5 aufgeführten Komponenten:

<b>TESTSTR</b>	2 Stück	Röhrchen mit 10 fortlaufend nummerierten Western-Blot-Teststreifen beschichtet mit <i>Treponema</i> -Antigenen.
<b>CONTROL ± IgM</b>	130 µl	Schwachpositiv IgM-Serumkontrolle ( <b>Blaue</b> Verschlusskappe) Humaner Ursprung, anti-HIV-1/2, anti-HCV und HBs-Ag negativ
<b>CONJ IgM</b>	100 µl	Anti-human IgM Konjugat ( <b>fünfhundertfach konzentriert, Lila</b> Verschlusskappe) Aus Kaninchen, enthält NaN <sub>3</sub>

## 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

Deionisiertes Wasser, Absaugsystem mit Desinfektionsfalle, Mikropipetten, Plastikpinzette, Schüttler, Messzylinder, Laborwaage.

## 7. Hinweise zum Test und den Reagenzien

### 7.1 Vorsichtsmaßnahmen

- ☞ Für die Herstellung der Kontrollseren wird Blut von Spendern verwendet, bei denen keine Antikörper gegen HIV 1/2, HCV und kein Hepatitis Bs-Antigen nachgewiesen wurden. Da trotzdem eine Infektion nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, muss das Produkt mit der gleichen Sorgfalt behandelt werden wie die Patientenproben.
- ☞ Während des gesamten Testablaufs müssen geeignete Einmalhandschuhe getragen werden.

- ☞ Die Konjugate enthalten Natriumazid. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- ☞ Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben in Berührung kommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens 1 Stunde bei 121°C autoklaviert werden.
- ☞ Inkubationsschalen nur einmal verwenden.
- ☞ Streifen vorsichtig mit einer Plastikpinzette handhaben.

## 7.2 Hinweise zur Handhabung

Die Reagenzien vor und nach Gebrauch bei 2°C - 8°C lagern, **nicht einfrieren**. Vor Testbeginn sind alle Bestandteile für mindestens 30 Minuten auf 18°C - 25°C (Raumtemperatur) zu temperieren. Die Testdurchführung erfolgt ebenfalls bei Raumtemperatur.

Vor Gebrauch die Kontrollseren sowie die konzentrierten Konjugate gut durchmischen. Die Patientenseren ebenfalls gut mischen.

Das Röhrchen mit den Teststreifen ist erst unmittelbar vor Gebrauch zu öffnen, um eine Kondenswasserbildung zu vermeiden. Die nicht benötigten Streifen verbleiben im Röhrchen und werden weiterhin bei 2°C - 8°C gelagert (Röhrchen wieder gut verschließen, Teststreifen dürfen vor Versuchsbeginn nicht feucht werden!).

Die Schwachpositiv Kontrolle muss bei jedem Versuchsdurchgang unabhängig von der Anzahl der zu testenden Seren mitgeführt werden. Nur so ist die korrekte Testinterpretation möglich.

Die Packungen tragen ein Verfallsdatum, nach dessen Erreichen keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden kann.

Es dürfen nur Einzelreagenzien verwendet werden, deren Chargennummer mit der entsprechenden Chargennummer auf dem Etikett der Kitverpackung übereinstimmt.

Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen.

Bei substantiellen Änderungen am Produkt, bzw. der Anwendungsvorschrift kann die Anwendung außerhalb der von MIKROGEN vorgegebenen Zweckbestimmung liegen.

Automatisierung ist möglich, nähere Informationen erhalten Sie von MIKROGEN.

## 7.3 Herstellung der Lösungen

### 7.3.1 Herstellung des gebrauchsfertigen Waschpuffers

Dieser Puffer wird für die Serum- und Konjugatverdünnung sowie die Waschschritte benötigt.

Vor dem Verdünnen ist das Volumen des Waschpuffers für die entsprechende Anzahl der durchzuführenden Tests zu bestimmen.

Das Magermilchpulver wird zuerst in Waschpuffer-Konzentrat vorgelöst und diese Mischung dann mit deionisiertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt (Verdünnung: 1 + 9). Die benötigten Mengen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Volumina für in der Tabelle nicht aufgeführte Streifen-Anzahlen sind rechnerisch zu ermitteln.

Gebrauchsfertiger Waschpuffer kann bei 2°C - 8°C vier Wochen gelagert werden.

**Tabelle 1:** Waschpuffer pro eingesetzte Teststreifen

eingesetzte Teststreifen	Magermilch Pulver	Waschpuffer-Konzentrat	Deionisiertes Wasser	gebrauchsfertiger Waschpuffer
1	0,1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0,2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0,3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0,5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
15	1,5 g	30 ml	270 ml	300 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml

### 7.3.2 Herstellung der Konjugatlösungen

Die Konjugatlösung für die IgG- bzw. IgM-Bestimmung ist unmittelbar vor Gebrauch herzustellen, eine Lagerung der gebrauchsfertigen Konjugatlösung ist nicht möglich.

Ein Teil des IgG-Konjugat-Konzentrats wird mit 1000 Teilen gebrauchsfertigem Waschpuffer verdünnt (1 + 1000).

Ein Teil des IgM-Konjugat-Konzentrats wird mit 500 Teilen gebrauchsfertigem Waschpuffer verdünnt (1 + 500).

Die benötigten Mengen sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Volumina für in der Tabelle nicht aufgeführte Streifen-Anzahlen sind rechnerisch zu ermitteln.

**Tabelle 2:** Volumina der Anti-human-IgG-bzw. IgM-Konjugat-Verdünnung

eingesetzte Teststreifen *	IgG-Konjugat-Konzentrat	IgM-Konjugat-Konzentrat	gebrauchsfertiger Waschpuffer
1	2 µl	4 µl	2 ml
2	4 µl	8 µl	4 ml
3	6 µl	12 µl	6 ml
5	10 µl	20 µl	10 ml
10	20 µl	40 µl	20 ml
15	30 µl	60 µl	30 ml
20	40 µl	80 µl	40 ml

\* Die Mengen sind ohne Totvolumen berechnet. Je nach Abarbeitung (manuell bzw. an einem Gerät) bitte zusätzliche Konjugatlösung für 1 bis 3 Streifen ansetzen.

### 7.3.3 Substratlösung

Das Substrat ist gebrauchsfertig. Vor Beginn der Färbung auf Raumtemperatur (18°C - 25°C) bringen.

Eine Kontamination der nicht verwendeten Substratlösung durch unsterile Pipettenspitzen etc. muss unbedingt vermieden werden, da dadurch die Sensitivität des Testes beeinträchtigt werden kann.

## 7.4 Lagerung und Haltbarkeit

Die Reagenzien vor und nach Gebrauch bei 2°C - 8°C lagern.

Gebrauchsfertiger Waschpuffer kann bei 2°C - 8°C vier Wochen gelagert werden.

Die Konjugatlösung muss immer frisch zubereitet werden.

## 8. Probenmaterial

Das Probenmaterial kann Serum oder Plasma sein, das nach Entnahme möglichst rasch vom Blutkuchen getrennt wurde, um eine Hämolyse zu vermeiden. Hitzeinaktivierte Proben können zu erhöhten Hintergrundreaktionen führen. Eine mikrobielle Kontamination der Probe ist unbedingt zu vermeiden. Unlösliche Stoffe sind vor der Inkubation aus der Probe zu entfernen.

Die Verwendung von lipämischen, hämolytischen oder trüben Proben kann einen dunklen Hintergrund im recomBlot Treponema IgG/IgM ergeben. Diese Proben können darüber hinaus zu verfälschten Ergebnissen führen und sollten daher nicht verwendet werden.

### Achtung!

**Sollen die Bestimmungen nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu 2 Wochen bei 2°C - 8°C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei -20°C oder tiefer möglich. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben wird wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate nicht empfohlen.**

## 9. Testdurchführung

### 9.1 Allgemeines

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hängt in starkem Maße vom gleichmäßigen Waschen der Streifen ab. Die unter 9.3 und 9.5 beschriebenen Waschfrequenzen sollten deshalb immer eingehalten werden.

**Achtung! Unterschiede zwischen der IgG- und IgM-Testdurchführung.**

### 9.2 Inkubation der Proben

1. Für jeden Testansatz wird eine Vertiefung einer Inkubationsschale benötigt. In die Vertiefungen werden je **2 ml** des gebrauchsfertigen Waschpuffers pipettiert. In die mit gebrauchsfertigem Waschpuffer gefüllten Vertiefungen wird anschließend je ein Teststreifen vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette eingetaucht. Die Streifennummerierung zeigt nach oben.

#### Achtung!

**Die Streifen müssen vollständig mit gebrauchsfertigem Waschpuffer benetzt und untergetaucht sein.**

Verwendete Röhrchennummer und Streifennummer im Auswertebogen notieren.

### 2. Probenzugabe

**IgG-Testdurchführung: 10 µl** einer unverdünnten Probe (Humanserum oder Plasma) oder der entsprechenden Schwachpositiv Kontrolle werden in die dafür vorgesehenen Vertiefungen pipettiert (**Verdünnung 1 + 200**).

**IgM-Testdurchführung: 20 µl** einer unverdünnten Probe (Humanserum oder Plasma) oder der entsprechenden Schwachpositiv Kontrolle werden in die dafür vorgesehenen Vertiefungen pipettiert (**Verdünnung 1 + 100**).

Bitte achten Sie darauf, die Probe an einem Ende des untergetauchten Streifens in den Waschpuffer einzupipettieren und schnellstmöglich durch vorsichtiges Schütteln der Inkubationswanne einzumischen.

Probennummern und zu detektierende Immunglobulinklasse (IgG, IgM) im Auswertebogen notieren.

Die Inkubationsschale wird mit dem Kunststoffdeckel abgedeckt und unter leichtem Schütteln **1 Stunde** bei Raumtemperatur inkubiert.

#### Achtung!

**Es ist darauf zu achten, dass die Inkubationslösungen nicht in andere Vertiefungen verschleppt werden; insbesondere beim Öffnen und Schließen des Deckels sind Spritzer zu vermeiden (Gefahr der Kreuzkontamination).**

### 9.3 Waschen

1. Nach der Inkubation werden die Kunststoffdeckel vorsichtig von den Inkubationsschalen abgenommen.
2. Die Serumverdünnung wird vorsichtig aus den einzelnen Vertiefungen abgesaugt.

#### **Achtung!**

**Nach dem Absaugen der Lösungen aus einer Vertiefung sind die Pipettenspitzen zu wechseln oder nach jedem Absaugvorgang gut mit deionisiertem Wasser zu spülen, da die Gefahr einer Kreuzkontamination besteht.**

**Bei maschineller Abarbeitung sind diesbezüglich die Hinweise des Geräteherstellers zu beachten.**

3. In jede Vertiefung werden anschließend **2 ml** des gebrauchsfertigen Waschpuffers gegeben und für **5 Minuten** unter leichtem Schütteln auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem Waschvorgang wird der Waschpuffer abgesaugt.
4. Der Waschschrift unter Punkt 3 wird insgesamt **dreimal** durchgeführt.

### 9.4 Inkubation mit Peroxidase-Konjugat

Nach dem Waschen der Streifen werden in jede Vertiefung **2 ml** der entsprechend vorbereiteten Konjugatlösung (siehe Tabelle 2) gegeben und **45 Minuten** unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wird die Inkubationsschale mit dem Kunststoffdeckel abgedeckt.

### 9.5 Waschen

Die Konjugatlösungen werden aus den Inkubationswannen abgesaugt und die Streifen erneut gewaschen (vergleiche 9.3).

### 9.6 Substratreaktion

In jede Vertiefung werden **1,5 ml Substratlösung** gegeben und **5 – 15 Minuten** unter leichtem Schütteln und unter Beobachtung bei Raumtemperatur inkubiert.

#### **Achtung!**

**Den Färbeprozess beobachten, und alle Streifen so lange in der Substratlösung belassen, bis bei den mit der Schwachpositiv Serumkontrolle inkubierten Streifen Tp47, TmpA, Tp17 und Tp15 bei der IgG-Detektion bzw. TmpA und Tp15 bei der IgM-Detektion zu erkennen sind.**

**Bei hochpositiven Seren kann es zu einer Überreaktion der Färbung kommen. Es wird empfohlen, bei solchen Streifen die Färbung vorzeitig zu beenden.**

### 9.7 Abstoppen der Reaktion

1. Nach Absaugen der Substratlösung werden die Streifen dreimal kurz mit deionisiertem Wasser gewaschen.
2. Die Streifen werden vorsichtig mit einer Plastikpinzette aus dem Wasser entnommen und zum Trocknen für ca. 2 Stunden zwischen 2 Lagen saugfähigen Papiers gelegt. Anschließend können die Streifen auf dem beigelegten Auswertebogen aufgeklebt und die Ergebnisse protokolliert werden.
3. Die Streifen sollten vor Licht geschützt aufbewahrt werden.

## 10. Zusammenfassung der Testdurchführung

1.	alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.	
2.	in 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer die Streifen einlegen, die Streifen müssen komplett untergetaucht sein	
3.	jeweils von der Kontrolle bzw. Probe einpipettieren:	
	IgG: 10 µl	IgM: 20µl
4.	1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren	
5.	dreimal je 5 Minuten, mit je 2 ml Waschpuffer, auf dem Schüttler waschen	
6.	2 ml gebrauchsfertige Konjugatlösung zugeben	
7.	45 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren	
8.	dreimal je 5 Minuten, mit je 2 ml Waschpuffer, auf dem Schüttler waschen	
9.	1,5 ml der Substratlösung zugeben; 5 - 15 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren. Sollbanden siehe 9.6	
10.	mindestens dreimal mit deionisiertem Wasser waschen	
11.	2 Stunden zwischen 2 Lagen saugfähigen Papiers trocknen und das Ergebnis ablesen	

## 11. Auswertung

### 11.1 Bewertung der Bandenintensität

- Bei jeder Testdurchführung muss unabhängig von der Anzahl der Proben die Schwachpositiv Serumkontrolle mitgeführt werden. Die Schwachpositiv Serumkontrolle dient zur Abgrenzung der Reaktivität von der Hintergrund-Reaktivität (Cutoff).
- Notieren Sie im beigefügten Auswertebogen Datum, Chargen- und Röhrchen-Nummer, sowie die detektierte Antikörperklasse.
- Tragen Sie die Proben-Identifizierungs-Nummern in das Protokollblatt ein.
- Kleben Sie nun mit einem Klebestift die dazugehörigen Teststreifen in die entsprechenden Felder des Auswertebogens. Richten Sie dazu die Teststreifen mit der Reaktions-Kontrollbande an der eingezeichneten Markierungslinie aus. Kleben Sie dann mit einem durchsichtigen Klebeband die Teststreifen links von der Markierungslinie an. Flächiges Ankleben der ganzen Teststreifen mit Klebestift oder Klebeband kann zu Veränderungen der Färbung führen.
- Den vorentwickelten Kontrollstreifen mit den markierten Antigenbanden zur Orientierung an die aufgeklebten Teststreifen legen, und die reagierenden Banden identifizieren. Der vorentwickelte Kontrollstreifen ist kitspezifisch und stammt aus demselben Nitrozellulose-Block wie die Teststreifen im Testkit. Die Molekulargewichte bzw. die Bezeichnungen der Antigenbanden sind markiert.
- Die Bandenintensitäten auf dem Probenstreifen werden im Vergleich zur Schwachpositiv Kontrolle gesondert für jede Immunglobulinklasse bewertet (s. 11.2 bzw. Tabelle 3) und in den Auswertebogen eingetragen.

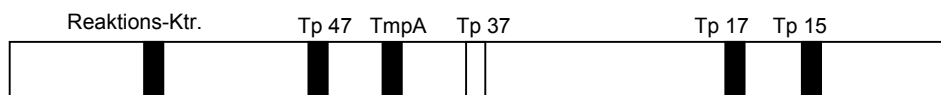
### 11.2 Kontrollergebnisse

Das Mitführen der Schwachpositiv Kontrolle ist unerlässlich. Dabei sollen die Testbedingungen (Sensitivität) geprüft und die Reaktivität mit den einzelnen Antigenbanden bestätigt werden. Die Lokalisation der Banden muss mit dem beigefügten Kontrollstreifen übereinstimmen.

Die Kontrollbande (Reaktions-Kontrolle) unterhalb der Streifennummer dient zur Überprüfung der Testdurchführung, und muss in jedem Fall eine deutliche Färbung zeigen.

Die mit den Schwachpositiv Serumkontrollen inkubierten Teststreifen dienen als Cutoff und sollten nachfolgende Bandenmuster aufzeigen:

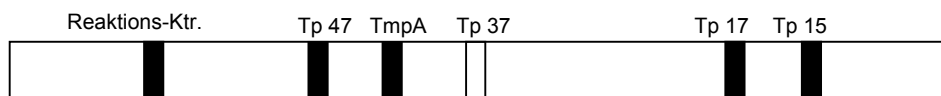
• **IgG-Schwachpositiv Kontrolle:**



Es sollten folgende Banden zu sehen sein: Reaktions-Kontrolle, Tp47, TmpA, Tp17 und Tp15.

Die Bewertung der Intensität aller Banden – außer der Tp37-Bande – orientiert sich an der entsprechenden Bande der Schwachpositiv Kontrolle. Zur Bewertung der Intensität der Tp37-Bande wird die Intensität der Tp15-Bande der Schwachpositiv Kontrolle herangezogen.

• **IgM-Schwachpositiv Kontrolle:**



Es sollten folgende Banden zu sehen sein: Reaktions-Kontrolle, TmpA und Tp15 (Tp47 und Tp17 können schwach reagieren).

Die Referenzbande für alle Banden – außer der TmpA-Bande – ist die Tp15-Bande der Schwachpositiv Kontrolle. Zur Bewertung der TmpA-Bande wird die entsprechende TmpA-Bande der Schwachpositiv Kontrolle herangezogen.

**Tabelle 3:** Bandenintensität

Banden	Intensität
keine Reaktion	0
geringere Intensität als bei der Schwachpositiv Kontrolle	1
gleiche Intensität wie bei der Schwachpositiv Kontrolle oder stärkere Intensität	2

**11.3 Testergebnisse und Testinterpretation**

Die Bewertung der Bandenintensität ist wie in Tabelle 3 angegeben durchzuführen.

Addieren Sie die Intensitäten der einzelnen Antigene. Die Beurteilung der Probe kann dann anhand der folgenden Tabelle 4 direkt bestimmt werden.

Je nach Anzahl und Intensität der auftretenden Banden ergibt sich folgende Beurteilung:

**Tabelle 4:** Testauswertung

Summe der Banden-Intensitäten IgG	Summe der Banden-Intensitäten IgM	Beurteilung
≤ 2	≤ 2	negativ
3 – 4	3	fraglich
≥ 5	≥ 4	positiv

## 11.4 Hinweise zur Interpretation

Für die Interpretation der Testresultate ist die Diskussion möglicher Kreuzreaktionen von Bedeutung. Die Gattung *Treponema* zählt ebenso wie die Gattung *Borrelia* zur Familie der *Spirochaetaceae*. In der Literatur werden kreuzreagierende Antikörper gegen Partialantigene, die der Familie der *Spirochaetaceae* gemeinsam sind, beschrieben (4). Hierbei sind aber folgende Punkte zu beachten:

1. Kreuzreagierende Antikörper gegen die im recomBlot Treponema verwendeten Antigene Tp47, TmpA, Tp17 und Tp15 sind nicht beschrieben. Es handelt sich hierbei um charakteristische *Treponema pallidum* Antigene, die von Seren von Lyme Borreliose Patienten nicht erkannt werden.
2. Bei dem Antigen Tp37 handelt es sich um eines der Flagellin-Proteine. Anti-Flagellin Antikörper sind zwar häufig kreuzreagierend, in eigenen Studien konnten wir jedoch bisher keine Kreuzreaktionen feststellen (siehe auch 12).

Bitte beachten Sie in diesem Zusammenhang auch die weiteren Hinweise:

Ein negatives recomBlot Treponema Testresultat kann eine Infektion mit *Treponema pallidum* nicht ausschließen. Bei bestehendem, klinischen Verdacht auf eine Infektion mit *Treponema pallidum* und negativem, serologischen Befund sollte nach vier Wochen eine weitere Probenentnahme und Testung erfolgen.

Ein positives Ergebnis im IgG und/ oder IgM bedeutet nicht in jedem Fall, dass ein aktives Krankheitsgeschehen vorliegt.

Serologische Testergebnisse sollten immer in Zusammenhang mit dem klinischen Bild gesehen werden.

**Dunkle Teststreifen:** Manche Seren von Patienten können auf dem gesamten Nitrozellulose-Streifen eine dunkle, durchgängige oder gemusterte Färbung erzeugen (z.B. bei Seren von Patienten mit Milcheiweiß-Allergien). Hierfür sind unterschiedliche Faktoren aus dem jeweiligen Patienten-Serum verantwortlich. Die Auswertung dieser Streifen ist in der Regel nur mit Einschränkungen möglich. So sind z.B. "inverse" Banden (weisse Banden auf dunklem Hintergrund) als negativ zu werten. Das entsprechende Serum sollte in jedem Fall mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.

## 12. Klinische Ergebnisse

In einer Studie wurden zusammen mit Prof. Dr. H.-J. Hagedorn mehr als 300 Patientenproben mit dem recomBlot Treponema IgG/IgM untersucht. Zur Ermittlung der Spezifität wurden TPHA negative Serumproben (Blutspender) und potentiell kreuzreagierende Seren, von z.B. Borrelia-Antikörper positiven Patienten, untersucht (Tabelle 5). Zur Ermittlung der Sensitivität wurden TPHA und FTA-ABS positive Proben verwendet (Tabelle 6).

Tabelle 5: Spezifität

	recomBlot Treponema							
	IgG				IgM			
	gesamt	negativ	fraglich	positiv	gesamt	negativ	fraglich	positiv
<b>Blutspender</b> (TPHA negativ)	205	202	3	0	205	205	0	0
<b>Potentiell kreuzreagierende Seren</b> (Borreliose, Leptospirose, Autoimmunerkr., Schwangere)	51	50	1	0	49	47	2	0
<b>Spezifität</b>								
Wertung nur positiver Befunde	100 %				100 %			
Wertung auch fraglicher Befunde als positiv	98,4 %				99,2 %			

**Tabelle 6:** Sensitivität

			<i>recomBlot Treponema</i>									
			IgG				IgM					
			gesamt	negativ	fraglich	positiv	gesamt	negativ	fraglich	positiv		
<b>TPHA positiv,</b>	<b>FTA-ABS positiv</b>		84	0	3	81						
<b>IgM-Antikörper positiv (19S-IgM-FTA)</b>								46	0	7	39	
<b>Sensitivität</b>												
Wertung nur positiver Befunde			96,4 %				84,8 %					
Wertung auch fraglicher Befunde als positiv			100 %				100 %					

### 13. Literatur

Die ausführliche Literaturliste finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation ab Seite 21. Auf Anforderung senden wir Ihnen gerne weiterführende Literatur zur Syphilis-Diagnostik.

### 14. Erklärung der Symbole

Die Tabelle mit der Erklärung der Symbole finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation auf Seite 22.

# recomBlot Treponema IgG

## recomBlot Treponema IgM

Immunoblot test with recombinant produced antigens separated by gel electrophoresis for the determination of IgG and IgM antibodies against **Treponema pallidum** in human serum or plasma.

### 1. General aspects

**recomBlot Treponema** is a qualitative in vitro test for the detection and safe identification of IgG or IgM antibodies against *Treponema pallidum* in human serum or plasma. **recomBlot Treponema** is used to confirm the results obtained from samples that have been positive in the screening test. Unlike enzyme immunoassays or spot tests, this test permits the safe identification and localisation of specific antibodies because the antigens are electrophoretically separated.

### 2. *Treponema pallidum* and Syphilis

The genus *Treponema* comprises several medically important species and subspecies. *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* is the causative agent of syphilis or lues. This pathogen is 0.2 µm wide and 5 to 15 µm long and exhibits motility by rotating around its longitudinal axis. Until now, these bacteria have not yet been cultured in vitro.

#### 2.1 Epidemiology

Syphilis (lues) occurs only in humans. Although *T. pallidum* has not developed resistance to penicillin over the last four decades, syphilis remains an important sexually transmitted disease of humans. According to the WHO, there were world-wide ca. 12 million new infections in adults in 1995. In Germany, the number of new infections per 100 000 citizens has decreased from 85 in 1950 to 1.4 in 1990. In USA, however, a reincrease in the infection rate has been observed. Even in Western Europe, increasing syphilis numbers are to be expected (1).

#### 2.2 Pathogenesis and Clinic

Infection occurs by direct contact with infected lesions via microtraumata of the skin or mucous membrane. The disease progresses through stages. After 5 - 90 days (average 21 days), a lesion appears at the site of infection (primary stage, hard chancre, lues I). *Treponema* can be detected in the sore. Finally, the development of local immunity results in the healing of the primary locus.

The secondary stage (lues II) develops 3 - 6 weeks later. This stage is characterised by (1) the haematogenic spreading of the pathogen throughout the entire organism, (2) the formation of multiple skin lesions, and (3) formation of partial systemic immunity. The second stage of syphilis lasts for weeks to months. Relapses may occur in the first two years after infection and, although seldom, even later. The disease is most contagious during the primary and secondary stages.

A clinically silent period of latency follows, which may last for 1 - 20 years and longer. The pathogen is not eliminated, but has probably retreated into an immunological niche, e.g., the tissue of the central nervous system.

The tertiary stage (lues III) is marked by manifestations of the skin, mucous membranes, and various organs and affects about one third of the untreated syphilis patients. The clinical picture shows gummatous syphilis (nodules/sores, seldom today), cardiovascular syphilis and neurosyphilis. The symptoms of the late phase include loss of muscle co-ordination, insensitivity to pain, gradual loss of sight, dementia, impotence, sudden pain, tumour development, and further disorders, sometimes causing death.

The pathogen can be transmitted to the foetus during pregnancy (syphilis connata). In about 40 % of all cases, infection results in abortion or death of the child shortly after birth. The probability of infection in utero is around 40 - 70 %. If an infected new-born child shows no symptoms, these will appear within weeks if the child is not treated. Approximately 12 % of infected new-born children die of this disease.

### 3. Diagnosis

In practice, direct detection of the pathogen is meaningful only in the investigation of primary lesions. Classical dark-field microscopy is relatively insensitive. Alternatively, a fixed smear with FITC-labelled specific antibodies can be used for examination.

The sensitivity of the PCR method is assessed differently. This method is usually carried out only in special laboratories.

The serodiagnosis of syphilis is performed in steps. As a rule, the *T. pallidum* hemagglutination test (TPHA) is used as an antibody search test. As an alternative the *recomWell* Treponema IgG/ IgM is an excellent screening test system. Specificity and sensitivity of the screening tests are similar. The main advantages of the *recomWell* Treponema are the possibility to distinguish between IgG and IgM antibodies and the capacity to process large numbers of samples by automatisation. If the result is negative, no other investigations are required. Otherwise confirmatory tests are conducted to ensure specificity and assess possible activity. For this purpose, the classical FTA-ABS test, the *T. pallidum* specific IgM antibody diagnosis and lipid antibody detection are used.

*recomBlot* Treponema IgG/IgM offers an ideal alternative to the conventional confirmation tests. In comparison with the immunological processes mentioned above, it exhibits additional criteria with regard to sensitivity and specificity (see 12).

### 4. Test principle

For *recomBlot* Treponema IgG/IgM the specific *Treponema pallidum* antigens Tp 47, TmpA, Tp 37, Tp 17 and Tp 15 are produced with the help of recombinant *E. coli* cells (3). The purified, recombinant antigens used are separated according to their molecular weight by means of SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The *Treponema pallidum* proteins are then transferred electrophoretically to a nitrocellulose membrane (Western Blotting). The membrane is subsequently incubated with a protein solution to block free binding sites, washed, cut into strips, and then packed into tubes.

To detect *Treponema pallidum* -specific antibodies, the strips are incubated with the diluted serum sample. During incubation, the antibodies bind to the antigens fixed on the test strips. Unbound antibodies are subsequently washed off and the strips are incubated (in a second incubation) with anti-human-IgG or anti-human-IgM coupled to horseradish peroxidase. Specifically bound antibodies are detected by a peroxidase-catalysed colour reaction. Dark bands appear on the test strip, showing the presence of reactivity against one of the *Treponema pallidum* proteins.

As the reaction control, a band of anti-human immunoglobulin, which must show a reaction with every serum, is applied at the top end of the strip below the number.

## 5. Package contents

The reagents in a pack are sufficient for 20 determinations.

Each reagent set contains:

<b>WASHBUF 10 X</b>	100 ml	Wash buffer ( <b>ten times the concentration</b> ) Contains phosphate buffer, NaCl, KCl, detergent, preservatives: methylisothiazolone and oxypyrione
<b>SUBS TMB</b>	45 ml	Substrate Solution Tetramethylbenzidin (TMB, <b>ready-to-use</b> )
<b>MILKPOW</b>	5 g	Skim milk powder
<b>INCUTRAY</b>	2 pieces	Incubation trays with 10 wells each
<b>CONTRSTR</b>	1	Predeveloped control strip (kit specific)
<b>INSTRU</b>	1	Instructions for use
<b>EVALFORM</b>	1	Evaluation form

### 5.1 recomBlot Treponema IgG

Additionally to the components listed under Point 5 each reagent set contains:

<b>TESTSTR</b>	1 piece	Test tubes with 10 consecutively numbered Western blot test strips coated with Treponema antigens
<b>CONTROL ± IgG</b>	70 µl	Weak positive IgG serum control ( <b>red</b> screw cap) Human origin, anti HIV-1/2, anti-HCV and HBs-Ag negative
<b>CONJ IgG</b>	60 µl	Anti-human IgG conjugate ( <b>thousand times the concentration, green</b> screw cap) from rabbit, contains NaN <sub>3</sub>

### 5.2 recomBlot Treponema IgM

Additionally to the components listed under Point 5 each reagent set contains:

<b>TESTSTR</b>	2 pieces	Test tubes with 10 consecutively numbered Western blot test strips coated with Treponema antigens
<b>CONTROL ± IgM</b>	130 µl	Weak positive IgM serum control ( <b>blue</b> screw cap) Human origin, anti HIV-1/2, anti-HCV and HBs-Ag negative
<b>CONJ IgM</b>	100 µl	Anti-human IgM conjugate ( <b>five hundred times the concentration, lilac</b> screw cap) from rabbit, contains NaN <sub>3</sub>

## 6. Additional reagents and accessory equipment required

Deionised water, vacuum extraction system with disinfection trap, micro pipettes, plastic forceps, shaker, metric cylinder with graduations, scales.

## 7. Information on test and reagents

### 7.1 Precautions

- ☞ Control sera are from blood donors verified for the absence of antibodies to HIV 1/2, HCV and no Hepatitis Bs-antigen. Since an infection cannot be excluded with absolute certainty despite this precaution, the product must be treated with the same care as the patient samples.
- ☞ Suitable single-use gloves must be worn during the entire test procedure.
- ☞ The conjugates contain sodium azide. Avoid contact with skin or mucosa.
- ☞ All reagents and materials contaminated with potentially infectious samples must be treated with suitable disinfectants or autoclaved at 121°C for at least 1 hour.
- ☞ Use incubation trays once only.
- ☞ Handle strips carefully with a plastic forceps.

### 7.2 Handling information

Store reagents before and after use at 2°C - 8°C, **do not freeze**. Temper all components before starting the test for at least 30 minutes to 18°C - 25°C (room temperature). Both the test and incubation procedures are carried out at room temperature.

Mix the control sera and concentrated conjugates well before use. Mix the patient sera well before use as well.

Do not open the tube containing the test strips until just before use to avoid condensation of water. The strips that are not used must be left in the tube and stored further at 2°C - 8°C (reclose tube tightly, test strips must not become moist before testing!).

Weak positive controls must always be run parallel to the sera being tested, regardless of how many sera are tested. This is the only way to ensure correct test interpretation.

A quality guarantee can only be given up to the expiry date on the packages.

Only reagents with lot numbers corresponding to the respective lot number on the label of the kit package may be used.

The test must be performed by well-trained and authorised qualified personnel.

In case of substantial modifications of the product or the instructions for use, the application of the test might differ from the purpose intended by MIKROGEN.

Automation is possible, please refer to MIKROGEN for details.

### 7.3 Preparation of solutions

#### 7.3.1 Preparation of ready-to-use wash buffer

This buffer is used for both serum and conjugate dilution as well as for the washing steps.

Prior to dilution, the volume of wash buffer required for the corresponding number of tests must be determined.

The skim milk powder is first dissolved in wash buffer concentrate. This mixture is then filled up with deionised water to the final volume (dilution: 1 + 9). See Table 1.

for the amounts required. Volumes for numbers of test strips not listed in the table have to be determined by calculation.

Ready-to-use wash buffer can be stored at 2°C - 8°C for four weeks.

**Table 1:** Wash buffer per test strip used

Test strips used	Skim milk powder	Wash buffer concentrate	Deionised water	Ready-to-use wash buffer
1	0,1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0,2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0,3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0,5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
15	1,5 g	30 ml	270 ml	300 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml

### 7.3.2 Preparation of conjugate solutions

The conjugate solution for the IgG resp. IgM test is to be prepared immediately before use. It is not possible to store the ready-to-use conjugate solution.

One part of IgG conjugate concentrate is diluted with 1000 parts of ready-to-use wash buffer (1 + 1000).

One part of IgM conjugate concentrate is diluted with 500 parts ready-to-use wash buffer (1 + 500).

The amounts used are listed in Table 2. Volumes for numbers of test strips not listed in the table have to be determined by calculation.

**Table 2:** Volumes for anti-human IgG resp. IgM conjugate dilution

Test strips used	IgG conjugate concentrate	IgM conjugate concentrate	Ready-to-use wash buffer
1	2 µl	4 µl	2 ml
2	4 µl	8 µl	4 ml
3	6 µl	12 µl	6 ml
5	10 µl	20 µl	10 ml
10	20 µl	40 µl	20 ml
15	30 µl	60 µl	30 ml
20	40 µl	80 µl	40 ml

\* The volumes have been calculated without dead volume. Depending on handling (manually or by machine processing) please prepare conjugate solution for additional 1 to 3 strips.

### 7.3.3 Substrate solution

The substrate is ready for use! Bring to room temperature (18°C - 25°C) before starting the colour reaction.

Avoid contamination of the unused substrate solution by nonsterile pipette tips, etc. at all costs since this may affect test sensitivity.

## 7.4 Storage and stability

Store reagents at 2°C - 8°C before and after use.

Ready-to-use wash buffer can be stored at 2°C - 8°C for four weeks.

The conjugate solution is to be prepared always freshly.

## 8. Sample material

The sample material can be serum or plasma that is separated from the coagulum as soon as possible after sampling. Heat-inactivated samples may result in raised background reaction levels. A microbial contamination of the sample is to be avoided at all costs. Insoluble substances are to be removed from the sample prior to incubation by means of centrifugation.

Use of lipaemic, haemolytic or turbid samples may result in a dark background in the *recomBlot* Treponema IgG/IgM. These samples may also result in false results and should therefore not be used.

### Important!

**If the tests are not carried out immediately, the samples can be stored for up to 2 weeks at 2°C-8°C. Longer storage of the samples is possible at -20°C or colder. Repeated freezing and thawing of the samples is not recommended because this may affect the quality of the results.**

## 9. Test procedure

### 9.1 General

The reproducibility of the results depends to a great extent on consistent washing of the strips. The washing frequencies described under 9.3. and 9.5 should therefore always be maintained.

### Important! Differences between IgG and IgM testing

### 9.2 Incubation of samples

1. One well in the incubation tray is required per serum to be tested. **2 ml** of ready-to-use wash buffer is pipetted into each well. Then one test strip is carefully dipped into each of the wells filled with wash buffer using a plastic forceps. The strip number must face upwards.

#### Important!

**The strip must be completely wet and immersed in the wash buffer.**

Record the tube and strip numbers used on the evaluation sheet.

2. Adding the samples

**IgG Test procedure:** **10 µl** of an undiluted sample (human serum or plasma) or of the corresponding weak positive control, are pipetted into the proper wells (**dilution 1 + 200**).

**IgM Test procedure:** **20 µl** of an undiluted sample (human serum or plasma) or of the corresponding weak positive control, are pipetted into the proper wells (**dilution 1 + 100**).

Please be sure to add the sample at one end of the immersed strips into the wash buffer and mix as soon as possible by shaking the tray carefully.

Record the sample numbers and the immunoglobulin class (IgG, IgM) on the evaluation sheet.

Cover the incubation tray with the plastic lid and incubate for **1 hour** at room temperature while shaking gently.

#### Important!

**Make sure the incubation solutions are not carried over into other wells; be particularly careful to avoid splashing when opening and closing the lid (risk of cross-contamination).**

### 9.3 Washing

1. Following incubation, the plastic lids are carefully removed from the incubation trays.
2. The serum dilution is carefully aspirated from the individual wells.

#### Important!

**When the solutions have been aspirated from a well, the pipette tip has to be changed or rinsed well with deionised water after each aspiration procedure to prevent cross-contamination.**

**In the case of machine processing the references of the equipment manufacturer have to be considered.**

3. Then place **2 ml** of the ready-to-use wash buffer in each well and wash on the shaker while shaking gently for **5 minutes**. The wash buffer is aspirated after the washing procedure.
4. Carry out the washing step under 3. a total of **three times**.

#### 9.4 Incubation with peroxidase conjugate

After washing the strips, place **2 ml** of the appropriately prepared **conjugate solution** (see Table 2) into each well and incubate for **45 minutes** while shaking gently at room temperature, whereby the incubation tray is covered with the plastic lid.

#### 9.5 Washing

The conjugate solutions are aspirated from the wells and the strips are washed again (see 9.3).

#### 9.6 Substrate reaction

Add **1.5 ml substrate solution** into each well and incubate for **5 - 15 minutes**, shaking gently and under observation, at room temperature.

#### Important!

**Observe the colour reaction process and leave all strips in the substrate solution until the strips incubated with the weak positive serum control show Tp47, TmpA, Tp17 and Tp15 in the IgG detection resp TmpA and Tp15 in the IgM detection.**

**The colour reaction may be excessive with highly positive sera. Recommendation: Stop the colour reaction in such strips earlier.**

#### 9.7 Stopping the reaction

1. After the solution is aspirated, wash the strips briefly **three times with deionised water**.
2. Use a plastic forceps to remove the strips carefully from the water and place them between 2 layers of absorbent paper to dry for about 2 hours. The strips may be adhesively attached to the enclosed evaluation sheet and the results may be recorded.
3. The strips should be stored protected from exposure to light.

### 10. Summary of the Test procedure,

1.	bring all reagents to room temperature	
2.	deposit the strips in 2 ml ready-to-use wash buffer and take care that they are completely immersed in the ready-to-use wash buffer	
3.	add of patient sample resp. control serum:	
	IgG: 10 µl	IgM: 20 µl
4.	incubate for 1 hour at room temperature while shaking gently	
5.	wash on the shaker three times with 2 ml of wash buffer for 5 minutes each time	
6.	add 2 ml appropriately prepared conjugate solution	
7.	incubate at room temperature for 45 minutes while shaking gently	
8.	wash on the shaker three times with 2 ml of ready-to-use wash buffer for 5 minutes each time	
9.	add 1.5 ml of the substrate solution, incubate while shaking at room temperature for 5 – 15 minutes. Bands see 9.6	
10.	wash the strips at least three times with deionised water	
11.	dry the strips between 2 layers of absorbent paper for 2 hours and read off the result	

## 11. Evaluation

### 11.1 Evaluation of band intensity

1. A weak positive control must be included in each test run, irrespective of the number of samples. The reactivity of the weak positive control serves as cutoff and as a discrimination from the background reactivity.
2. On the attached evaluation sheet, record the date, batch and tube number, and the detected antibody class.
3. Enter the sample identification number on the protocol sheet.
4. Now attach the corresponding test strips with a glue stick into the corresponding fields of the evaluation sheet. To do this, place the test strips with the reaction control band on the marking lines. Then use clear adhesive tape to attach the test strips left from the marking line. Complete sticking of the test strip with glue or adhesive tape may lead to aberrations of the colouring.
5. Place the predeveloped control test strip with the labelled antigen bands on the fixed test strips in such a way that the reaction control bands are aligned. The predeveloped test strip is kit specific and comes from the same nitrocellulose sheet as the test strips in the test kit. The molecular weights and names of the antigen bands are marked.
6. Band intensities are assessed by comparison with the weak positive control separately for each immunoglobulin class (refer to 11.2 resp. Table 4). Please record the values in the evaluation sheet.

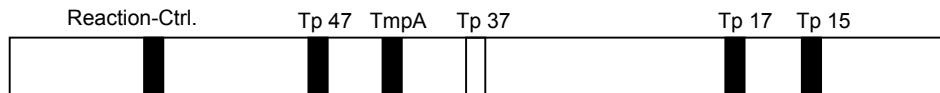
### 11.2 Control results

Weak positive controls must always be run parallel to the sera being tested. The test conditions (sensitivity) are to be examined and reactivity with the individual antigen bands are to be confirmed. The localisation of the antigen bands must agree with the attached control strip (kit specific).

The control band (reaction control) below the strip number is used to check the correct performance of the test. This band must show a distinct colouring.

The test strips incubated with the weak positive serum control show the following band patterns.

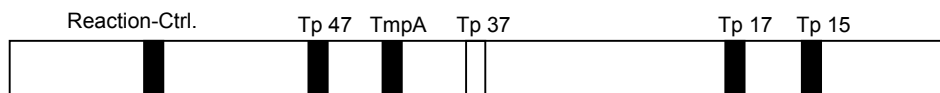
- **IgG weak positive control:**



The following bands should be visible: Reaction control, Tp47, TmpA, Tp17 and Tp15.

To assess the intensity of the bands, all bands except for the Tp37 band, are compared to the respective band of the weak positive control. The intensity of the Tp37 band, however, is compared to the intensity of the Tp15 band of the weak positive control.

- **IgM weak positive control:**



The following bands should be visible: Reaction control, TmpA and Tp15 (Tp47 and Tp17 may be visible)

The reference band for all bands – except for the TmpA band – is the Tp15 band of the weak positive control. For assessment for the TmpA band the corresponding TmpA band of the weak positive control is used.

**Table 3:** Band intensity

Bands	Intensity
No reaction	0
Intensity weaker than the weak positive control	1
same intensity or stronger intensity as the weak positive control	2

### 11.3 Test results and test interpretation

The evaluation of the band reactivities is to be performed as shown in Table 3.

Add up the intensities of the individual antigens. Subsequently, the result of the sample then can directly be determined from Table 4.

Depending on the number and intensity of bands, the following results are possible:

**Table 4:** Test evaluation

Sum of band intensities IgG	Sum of band intensities IgM	Evaluation
≤ 2	≤ 2	Negative
3 - 4	3	Borderline
≥ 5	≥ 4	Positive

### 11.4 Notes on interpretation of the results

A discussion of possible cross reactions is important for the interpretation of the test results. The genus *Treponema* as well as the genus *Borrelia* belong to the family of *Spirochaetaceae*. Cross reacting antibodies against partial antigens common to the *Spirochaetaceae* family have been described in the literature (4). The following points should be considered:

1. Cross reacting antibodies against the antigens Tp47, TmpA, Tp17, and Tp15 used in *recomBlot* Treponema have not been described. These are characteristic *Treponema pallidum* antigens which are not observed in sera from Lyme borreliosis patients.
2. The antigen Tp37 is a flagellin protein. Although anti-flagellin antibodies frequently cross react, no cross reactions could be detected in our studies (see also 12).

Attention must also be paid to the following directions:

A negative result in the *recomBlot* Treponema test cannot exclude an infection with *Treponema pallidum*. If an infection with *Treponema pallidum* is clinically suspected and the serological result is negative, sample withdrawal and testing should be repeated after one week.

A positive IgG and/or IgM result does not indicate an active pathological process in any case.

Serological test results should always be considered in connection with the clinical picture.

#### Dark test strips:

A few sera of patients may generate a dark general or patterned coloration on the whole nitrocellulose strip (e.g. sera of patients with milk protein allergies). Different factors of the individual patient sera account for these effects. The evaluation of these strips is usually possible only with some restrictions. E.g. "inverse" bands (white bands on dark background) are assessed as negative. The corresponding serum should strictly be retested by use of other serological methods.

## 12. Clinical results

In collaboration with an European expert for *Treponema pallidum*, Prof. Dr. H.-J. Hagedorn, more than 300 serum samples with defined TPHA status were analysed with recomBlot Treponema IgG/IgM. TPHA negative serum samples were used for calculation of specificity ( Table 5) and TPHA and IgG FTA-ABS positive serum samples were used for calculation of sensitivity (Table 6).

**Table 5: Specificity**

	<i>recomBlot Treponema</i>							
	IgG				IgM			
	total	negative	equiv.	positive	total	negative	equiv.	positive
<b>Blood donors</b> (TPHA negative)	205	202	3	0	205	205	0	0
<b>Potentially cross reactive sera</b> (Borreliosis, leptospirosis, auto immune disease., pregnant women)	51	50	1	0	49	47	2	0
<b>Specificity</b>								
Calculation of positive findings only	100 %				100 %			
Calculation of equivocal findings as positive	98,4 %				99,2 %			

**Table 6: Sensitivity**






	<i>recomBlot Treponema</i>							
	IgG				IgM			
	total	negative	equiv.	positive	total	negative	equiv.	positive
<b>TPHA positive, FTA-ABS positive</b>	84	0	3	81				
<b>IgM antibody positive (19S-IgM-FTA)</b>					46	0	7	39
<b>Sensitivity</b>								
Calculation of positive findings only	96,4 %				84,8 %			
Calculation of equivocal findings as positive	100 %				100 %			

## 13. Literature

- (1) Hagedorn HJ **Treponemen**. *Laboratoriums Medizin, Diagnostische Bibliothek* 1997, 49, 1-8
- (2) Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH **Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis**. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995, 8(1), 1-21
- (3) Norris SJ and the *Treponema pallidum* Polypeptide Research Group **Polypeptides of *Treponema pallidum*: Progress toward Understanding Their Structural, Functional, and Immunologic Roles**. *Microbiol. Rev.* 1993, 57(3), 750-79
- (4) Alfen I, Wellensiek HJ **Die Bedeutung kreuzreagierender Antikörper für die Serodiagnostik der Lyme-Borreliose und der Syphilis**. *Lab. Med.* 1994, 18, 12-19
- (5) Sambri V., et al, **Western Immunoblotting with Five *Treponema pallidum* Recombinant Antigens for Serologic Diagnosis of Syphilis**, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2001 (8), Nr. 3: 534-539

We will be pleased to send you further literature on diagnosis of syphilis at your request.

## 14. Explanations of the symbols

	Contains sufficient for < n > tests amount of tests	Inhalt ist ausreichend für < n > Ansätze Anzahl der Ansätze
<b>EVALFORM</b>	Evaluation form	Auswertebogen
<b>INSTRU</b>	Instructions for use	Gebrauchsinformation
	Consult instructions for use	Gebrauchsinformation beachten
<b>CONT</b>	Contains	Inhalt, enthält
<b>IVD</b>	in vitro diagnostic device	In vitro Test
<b>LOT</b>	Batch code	Chargen-Nummer
	Do not freeze	Nicht einfrieren
<b>REF</b>	Catalogue number	Bestell-Nummer
	Use by expiry date	verwendbar bis Mindesthaltbarkeitsdatum
	Temperature limitation Store between x°C and y°C	Lagerung bei x°C bis y°C

**recomBlot Treponema IgG** Artikel-Nr./ Article No.: **5102**  
**recomBlot Treponema IgM** Artikel-Nr./ Article No.: **5103**

Gebrauchsinformation/ Instructions for use: GIRBTP009ADE.DOC  
gültig ab/ valid from: Juli/July 2005

**MIKROGEN GmbH** Tel: +49 (0)89 54 80 1-0  
Floriansbogen 2-4 Fax: +49 (0)89 54 80 1-100  
D-82061 Neuried  
Germany  
www.mikrogen.de mikrogen@mikrogen.de

QM-SYSTEM zertifiziert durch:  
QM System certified according to:





