

recomWell Treponema IgG

recomWell Treponema IgM

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

1. Allgemeines

Der recomWell Treponema ist ein quantitativer in vitro Test zum Nachweis und zur sicheren Identifizierung von IgG- oder IgM-Antikörpern gegen *Treponema pallidum* in humanem Serum oder Plasma. Der recomWell Treponema ist ein Screening-Test nach dem Prinzip eines indirekten Sandwich-ELISAs.

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. Humanpathogene Treponemen gelten bis heute als nicht anzüchtbar.

2.1. Epidemiologie

Die Syphilis (Lues) kommt nur beim Menschen vor. Obwohl *T. pallidum* über die letzten vier Jahrzehnte keine Resistenzen gegen Penizillin 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 1997 zurückgegangen. In den Nachfolgestaaten der Sowjetunion stieg die Zahl der Neuerkrankungen von 1988 mit 4,2 Fällen pro 100.000 Einwohnern auf 263 pro 100.000 Einwohner im Jahr 1996. Infolge der Bevölkerungswanderung von Ost nach West ist wahrscheinlich auch für Westeuropa mit zunehmenden Syphiliszahlen zu rechnen (1).

2.2. Pathogenese und Klinik (1)

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. Hauptvorteile des *recomWell Treponema IgG / IgM* sind die Möglichkeit IgG- und IgM-Antikörper getrennt zu erfassen sowie die einfache und automatische Abarbeitung bei großen Stückzahlen. Bei positiven und grenzwertigen Ergebnissen 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 Lipid-antikörpernachweis 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.

4. Testprinzip - *recomWell Treponema*

Für den *recomWell Treponema* werden die spezifischen *Treponema pallidum* Antigene Tp 47, Tp 17 und Tp 15 mit Hilfe rekombinanter *E. coli* Zellen hergestellt (3). Dadurch kann eine optimale Darreichung ohne andere störende und kreuzreagierende Proteine erreicht werden.

5. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.

Jeder Reagenziensatz enthält:

WASHBUF 10 X	100 ml	Waschpuffer (zehnfach konzentriert) Enthält Phosphat-Puffer, NaCl und Detergenz. Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxypyron.
DILUBUF	125 ml	Verdünnungspuffer (gebrauchsfertig) Enthält Protein, Detergenz und blauen Farbstoff. Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxypyron.
SUBS TMB	12 ml	Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB, gebrauchsfertig)
SOLN STOP	12 ml	Stopplösung 25% Phosphorsäure
INSTRU	1	Gebrauchsinformation
EVALFORM	1	Auswertebogen
TAPE	2 Stück	Abdeckfolien

5.1. recomWell Treponema IgG

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

MTP	12 x 8 Kavit.	Mikrotiterplatte (Riegel rot markiert) beschichtet mit rekombinanten T. pallidum Antigenen im Vakuum-Druckverschlußbeutel
CONTROL + IgG	150 µl	Positive Kontrolle (Violette Verschlusskappe) Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxyprion.
CONTROL ± IgG	150 µl	Cutoff Kontrolle (Gelbe Verschlusskappe) Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxyprion.
CONTROL - IgG	150 µl	Negative Kontrolle (Weiß e Verschlusskappe) Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxyprion.
CONJ IgG	250 µl	Anti-human IgG Konjugat (101fach konzentriert, Rote Verschlusskappe) Konservierungsstoff: Methylisothiazolon, Natriumazid, Chlorazetamid

5.2. recomWell Treponema IgM

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

MTP	12 x 8 Kavit.	Mikrotiterplatte (Riegel grün markiert) beschichtet mit rekombinanten T. pallidum Antigenen im Vakuum-Druckverschlußbeutel
CONTROL + IgM	150 µl	Positive Kontrolle (Schwarze Verschlusskappe) Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxyprion.
CONTROL ± IgM	150 µl	Cutoff Kontrolle (Farblose Verschlusskappe) Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxyprion.
CONTROL - IgM	150 µl	Negative Kontrolle (Weiß e Verschlusskappe) Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxyprion.
CONJ IgM	250 µl	Anti-human IgM Konjugat (101fach konzentriert, Grüne Verschlusskappe) Konservierungsstoff: Methylisothiazolon, Natriumazid, Chlorazetamid

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

Deionisiertes Wasser, Teströhrchen, Mikropipetten, Inkubationsschrank 37°C, Mikrotiterplatten-Photometer

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 eine Patientenprobe.
- ☞ Während des gesamten Testablaufs müssen geeignete Einmalhandschuhe getragen werden.
- ☞ Die Konjugate, die Kontrollen, der Verdünnungspuffer und der Waschpuffer enthalten Konservierungsstoffe. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- ☞ Phosphorsäure ist reizend. Kontakt mit Haut und Schleimhäuten unbedingt 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.

7.2. Hinweise zur Handhabung

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

Die Nachweisreagenzien reichen für 96 IgG- oder IgM-Bestimmungen. Die unten genannten Mengenangaben beziehen sich jeweils auf die Bearbeitung von einem Mikrotiterplattenstreifen mit 8 Kavitäten. Bei der Verwendung von mehreren Mikrotiterplattenstreifen gleichzeitig müssen die angegebenen Mengen jeweils mit der Anzahl der verwendeten Mikrotiterplattenstreifen multipliziert werden.

Substrat und Stopplösung sind gebrauchsfertig.

7.3.1. Herstellung des gebrauchsfertigen Waschpuffers

Das Waschpuffer-Konzentrat wird **1 + 9** mit H₂O deion. verdünnt. Pro einem Mikrotiterplattenstreifen mit 8 Kavitäten werden 5 ml Konzentrat mit 45 ml H₂O deion. gemischt.

7.3.2. Herstellung der Konjugatlösung

Pro einem Mikrotiterplattenstreifen mit 8 Kavitäten werden 1 ml Verdünnungspuffer mit je 10 µl anti-human IgG Peroxidase-Konjugat (Rote Verschlusskappe) oder IgM Peroxidase-Konjugat (Grüne Verschlusskappe) in einem sauberen Gefäß versetzt und gut gemischt (Verdünnung **1 + 100**).

7.4. Lagerung und Haltbarkeit

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

Der gebrauchsfertige Waschpuffer kann auch in größerer Menge hergestellt werden. Der gebrauchsfertige Waschpuffer kann für die Verwendung bei weiteren Testen eine Woche bei Raumtemperatur gelagert werden.

Die Verdünnung der Proben, der Kontrollen sowie die Konjugatlösung müssen immer frisch zubereitet werden.

8. Probenmaterial

Das Probenmaterial kann Serum oder Plasma sein, das nach Entnahme möglichst rasch vom Blutkuchen getrennt wurde. Hitzeinaktivierte Proben führen zu erhöhten Hintergrundreaktionen, und dürfen daher nicht verwendet werden. Eine mikrobielle Kontamination der Probe ist unbedingt zu vermeiden. Unlösliche Stoffe sind vor der Inkubation durch Zentrifugation aus der Probe zu entfernen.

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. Testvorbereitung

Vor Gebrauch sollen alle Reagenzien etwa 30 Minuten auf Raumtemperatur (18°C - 25°C) gebracht werden. Zur Vermeidung von Kondenswasserbildung in der Mikrotiterplatte muss diese **im verschlossenen Beutel** auf Raumtemperatur gebracht werden. Nach der Entnahme der benötigten Riegel soll die Platte im Beutel wieder verschlossen werden und in den Kühlschrank gegeben werden.

Vor Gebrauch die Kontrollseren und Patientenseren, sowie die konzentrierten Konjugate gut durchmischen und soweit möglich anschließend kurz abzentrifugieren, um die Flüssigkeit am Boden der Gefäße zu sammeln.

9.2. Vorbereitung der Proben und Kontrollen

In 1 ml Verdünnungspuffer werden jeweils 10 µl Probe bzw. Kontrolle pipettiert und gut gemischt (Verdünnung **1 + 100**). Bei jedem Testansatz müssen eine negative Kontrolle, eine Cutoff Kontrolle und eine Positive Kontrolle mitgeführt werden, die ebenso wie die Patientenproben verdünnt werden.

9.3. Inkubation der Proben

Die Mikrotiterplatte wird dem Druckverschlußbeutel entnommen.

Von den verdünnten Proben und verdünnten Kontrollen werden **100 µl** pro Kavität pipettiert. Dabei wird von der Negativen Kontrolle, der Positiven Kontrolle und den Patientenproben mindestens ein Wert angelegt, während die Cutoff Kontrolle doppelt angelegt werden muss. Vorzugsweise wird je eine Cutoff Kontrolle am Anfang der Serie und am Ende der Serie pipettiert.

Die Mikrotiterplatte wird bei manueller Abarbeitung **sorgfältig** mit Abdeckfolie **abgeklebt** und **1 Stunde** bei **37°C** inkubiert.

9.4. Waschen

Die Kavitäten werden vollständig geleert und anschließend **viermal** mit je 300 µl gebrauchsfertigem Waschpuffer pro Kavität gewaschen. Es wird empfohlen, diesen Schritt mit einem entsprechenden ELISA-Waschgerät durchzuführen. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass der Waschpuffer zwischen den Waschschritten vollständig entfernt wird.

Nach Beenden des letzten Waschschrilles (auch bei Verwendung eines Waschgerätes) die Platte auf einem Papiertuch ausschlagen, um letzte Flüssigkeitsreste in den Kavitäten zu entfernen.

9.5. Inkubation mit Peroxidase-Konjugat

Von der verdünnten Konjugatlösung (s.7.3.2) werden **100 µl** pro Kavität pipettiert.

Die Mikrotiterplatte wird bei manueller Abarbeitung **sorgfältig** mit Abdeckfolie **abgeklebt** und **30 Minuten** bei **37°C** inkubiert.

9.6. Waschen

Die Kavitäten werden geleert und wie unter 9.4 gewaschen.

9.7. Substratreaktion

Die Substratlösung ist gebrauchsfertig.

Es werden **100 µl** pro Kavität pipettiert.

Die Mikrotiterplatte wird **30 Minuten** bei **Raumtemperatur** unter Schutz vor direkter Sonneneinstrahlung inkubiert. Die Zeit wird ab Pipettieren der ersten Kavität gerechnet.

9.8. Abstoppen der Reaktion

Zum Abstoppen der Reaktion werden **100 µl** Stopplösung pro Kavität pipettiert. Dabei ist dasselbe Pipettierschema wie beim Pipettieren der Substratlösung einzuhalten.

9.9. Messung der Extinktionen

Die Extinktionen der einzelnen Kavitäten werden in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei **450 nm** und der Referenzwellenlänge **650 nm** (620 bis 650 nm zulässig) gemessen. Der Nullabgleich erfolgt gegen Luft. Die Messung muss innerhalb von 60 Minuten nach Abstoppen der Reaktion erfolgen.

10. Kurzanleitung der Testdurchführung

Verdünnungen:

- | | | |
|--|-----------------------------------|--|
| • Verdünnung von Proben und Kontrollen | 1 + 100 mit Verdünnungspuffer | 10 µl + 1 ml
je Probe bzw. Kontrolle |
| • Konjugatverdünnung: | 1 + 100 mit Verdünnungspuffer | 10 µl + 1 ml
je Mikrotiterplattenstreifen |
| • Waschpufferverdünnung: | 1 + 9 mit H ₂ O deion. | 5 ml + 45 ml
je Mikrotiterplattenstreifen |

Testschritte:

- | | | |
|-----------------------|--------------------|---------------------------|
| • Probeninkubation: | 100 µl pro Kavität | 60 min bei 37°C |
| • Waschschrift: | 300 µl pro Kavität | viermal |
| • Konjugatinkubation: | 100 µl pro Kavität | 30 min bei 37°C |
| • Waschschrift: | 300 µl pro Kavität | viermal |
| • Substratinkubation: | 100 µl pro Kavität | 30 min bei Raumtemperatur |
| • Abstoppen: | 100 µl pro Kavität | |
| • Photometrieren: | 450 / 650 (620) nm | |

11. Validierung und Auswertung

11.1. Validierung

Cutoff Kontrolle: Von den Extinktionswerten der beiden Cutoffs (am Anfang und am Ende der Serie) wird der Mittelwert gebildet.

Der Test ist unter folgenden Bedingungen auswertbar:

Die einzelnen Extinktionswerte der Doppelbestimmung der Cutoff Kontrolle weichen nicht mehr als 20% von ihrem Mittelwert ab.

- | | | |
|--|---------------------------------|--------------|
| • Extinktion negative Kontrolle | $\leq 0,150$ | |
| • Extinktion Cutoff Kontrolle
($E_{\text{Cutoff}} - E_{\text{neg. Kontr.}} \geq 0,050$) | - Extinktion negative Kontrolle | $\geq 0,050$ |
| • Extinktion positive Kontrolle
($E_{\text{pos. Kontr.}} - E_{\text{Cutoff}} \geq 0,300$) | - Extinktion Cutoff Kontrolle | $\geq 0,300$ |

11.2. Auswertung

11.2.1. Qualitative Auswertung

Cutoff (Grenzwert): Extinktionsmittelwert der Cutoff Kontrolle

Graubereich: untere Grenze = Cutoff
 obere Grenze = Cutoff + 20% (Cutoff x 1,2)

- Proben mit Extinktionswerten oberhalb des Graubereiches sind als **positiv** zu betrachten.
- Proben mit Extinktionswerten unterhalb des Graubereiches sind als **negativ** zu betrachten.
- Proben mit Extinktionswerten im Graubereich sind **grenzwertig**. Sie sollten erneut getestet werden. Sind sie nach dem zweiten Test wiederum grenzwertig, empfiehlt es sich, nach einiger Zeit eine weitere Probe zu nehmen und zu testen (vgl. 11.3).

11.2.2. Quantitative Auswertung

Den Extinktionswerten wird mit Hilfe einer Formel die entsprechende Antikörperaktivität in Units pro ml zugeordnet.

$$U/ml \text{ Probe} = (\text{Extinktion Probe} / \text{Extinktion Cutoff}) \times 20$$

Graubereich: untere Grenze = 20 U/ml
 obere Grenze = 24 U/ml

- U/ml Probe > 24 **positives** Testergebnis
- U/ml Probe < 20 **negatives** Testergebnis
- $20 \leq U/ml \text{ Probe} \leq 24$ **grenzwertiges** Testergebnis

11.3. Hinweise zur Interpretation der Testergebnisse

Ein negatives *recomWell* Treponema Testresultat kann eine Infektion mit *Treponema pallidum* nicht ausschließen. Bei klinischem Verdacht auf eine Infektion mit *Treponema pallidum* und negativem serologischem Befund sollte nach vier Wochen eine weitere Probenentnahme und Testung erfolgen.

Ein positives *recomWell* Treponema Testresultat bedeutet nicht in jedem Fall, dass ein aktives Krankheitsgeschehen vorliegt.

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

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 ist aber folgendes zu beachten: Kreuzreagierende Antikörper gegen die im *recomWell* Treponema verwendeten Antigene Tp47, Tp17 und Tp15 sind nicht beschrieben. Es handelt sich vielmehr um charakteristische *Treponema pallidum* Antigene, die von Seren von Lyme Borreliose Patienten nicht erkannt werden. Bei *Borrelia*-positiven und *Leptospiriosis*-positiven Seren waren keine unbegründeten Reaktionen festzustellen (siehe 12.1.3 und 12.2.2).

Bei Vorliegen einer Infektion mit humanen Herpesviren (EBV, CMV, HSV) kann eine unspezifische Reaktion beim Nachweis von Antikörpern der IgM-Klasse auftreten (siehe 12.2.2). Es wird empfohlen, bei positiven oder grenzwertigen Resultaten neben einer Bestätigung im Western-Blot eine Virus-Infektion mit humanen Herpesviren differentialdiagnostisch auszuschließen.

Bei anderen Proben wurden vereinzelt unbegründete Reaktionen festgestellt (siehe siehe 12.1.3 und 12.2.2).

Wir empfehlen daher generell, positive und grenzwertige ELISA-Resultate in einem Bestätigungstest (z.B. Western-Blot) nachzuprüfen.

12. Klinische Ergebnisse

12.1. IgG

12.1.1. Sensitivität

Die Sensitivität errechnet sich als der prozentuale Anteil, mit dem jeweiligen Testsystem positiv bestimmter Proben von allen untersuchten definiert positiven Proben.

Tabelle 1: Externe Evaluierung 2000 in Bologna, Italien

	Anzahl	IgG
Primäre Syphilis	19	17 (89,5%)
Sekundäre Syphilis	24	24 (100%)
Frühe latente Syphilis	67	67 (100%)
Späte Syphilis	4	4 (100%)

12.1.2. Screening - Seren

Tabelle 2: Externe Evaluierung 2000 in Bologna, Italien (Unselektierte Proben für Routine-Labor-Screening Syphilis, Krankenhaus)

Anzahl 400	IgG	
negativ	387 (97%)	
positiv oder grenzwertig	13 (3%)	
Bestätigung: Western-Blot	8 bestätigt positiv (2%) Prävalenz 2%	2 negativ (Tp47: 1, Tp17: 1) (0,5%) 3 negativ (Tp47: 1) (0,75%)
Spezifität	98,7%	

Bewertungskriterien *recomWell* Treponema: U/ml Probe > 24

U/ml Probe < 20

20 ≤ U/ml Probe ≤ 24

positives Testergebnis

negatives Testergebnis

grenzwertiges Testergebnis

Bewertungskriterien *recomBlot* Treponema:

Banden

keine Reaktion

geringere Intensität als bei der Schwachpositiv Kontrolle

gleiche Intensität wie bei der Schwachpositiv Kontrolle oder stärkere Intensität

Intensität

0

1

2

Je nach Summe der auftretenden Banden mit ihren entsprechenden Intensitäten ergibt sich folgende Beurteilung:

IgG: ≤ 2 negativ
3 – 4 fraglich
≥ 5 positiv

IgM: ≤ 2 negativ
3 fraglich
≥ 4 positiv

12.1.3. Spezifität

Tabelle 3: Spezifität Evaluierung MIKROGEN 2005

	Anzahl	IgG positiv/ grenzw.	IgG U/ml	ELISA A (polyvalent)	IgG recomBlot Treponema
Blutspender					
Plasmen Deutschland #001-200	200	9 (4,5%)	30 40, 22, 24 53, 22 28, 29, 40	grenzwertig positiv n.b. n.b.	negativ (Tp47: 1) keine Banden negativ (Tp47: 1) negativ (Tp17: 2)
Plasmen Deutschland #201-300	100	6 (6%)	35 20 23, 20, 21, 23	grenzwertig negativ positiv	negativ (Tp17: 1) negativ (Tp17: 1) keine Banden
Seren Deutschland #401-500	100	5 (5%)	21, 22, 26 49 40	n.b.	keine Banden negativ (Tp17: 1) negativ (Tp47: 1)
Seren Italien*	200	0 (0%)	-	-	-
Plasmen Deutschland #875-974	100	4 (4%)	34, 31, 42 41	n.b.	negativ (Tp17: 1) negativ (Tp17: 1; Tp15: 1)
Potentielle Störfaktoren / Kreuzreaktive					
Borrelia Anti- körper- positive (klinisch definiert)	20	1 (5%)	29		negativ (Tp47: 1)
Leptospirosis- positive	10	0 (0%)	-	-	-
Rheumafaktor- positive	20	4 (20%)	20 20, 20, 22	n.b.	negativ (Tp47: 2) keine Banden
ANA-positive	31	2 (6,5%)	21, 24	n.b.	keine Banden
Frische EBV- Infektionen	30	1 (5%)	22	n.b.	negativ (Tp47: 1)
Schwangere Frauen	107	4 (4%)	44, 40, 22 24	n.b.	keine Banden negativ (Tp17: 1)

*Externe Evaluierung 2000 in Bologna, Italien

n.b.: nicht bestimmt

12.2. IgM**12.2.1. Sensitivität****Tabelle 4:** Externe Evaluierungen in Frankfurt (Ort A) und in Herford (Ort B) 2005

	Ort A		Ort B		Gesamt	
	Anzahl	IgM positiv/ grenzw.	Anzahl	IgM positiv/ grenzw.	Anzahl	IgM positiv/ grenzw.
Stadium I (aktive behandlungs- bedürftige Infektion)	-	-	5	5 (100%)	5	5 (100%)
Stadium I (HIV-positiv)*	36	26 (72%)	-	-	36	26 (72%)
Stadium II	45	42 (91%)	1	1 (100%)	46	43 (93,5%)
Stadium II-III	46	39 (85%)			46	39 (85%)
Latente Treponemen- Infektion	2	1 (50%)	7	0 (0%)	9	1 (11%)
Syphilis satis curata	-	-	14	0	14	0 (0%)

*Proben von HIV-positiven Patienten mit klinischen Symptomen einer Luesinfektion Stadium I. In diesem Patientenkollektiv ist mit einer hohen Re-Infektionsrate zu rechnen. Zur Bewertung der IgM-Diagnostik muß beachtet werden, daß sich die Immunantwort nach Erstinfektion von der nach Reinfektion unterscheiden kann.

12.2.2. Spezifität**Tabelle 5:** Spezifität, Externe Evaluierung Frankfurt 2005

	Anzahl	IgM positiv / grenzw.	IgM U/ml	IgM recomBlot Treponema
Blutspender	149	3 (2,0%)	25, 25, 31	keine Banden
Potentielle Störfaktoren / Kreuzreaktive				
Salmonellen	30	1 (3,3%)	37	positiv
FSME	20	0 (0%)	-	-
Leptospirose	26	0 (0%)	-	-
HSV	30	3 (10%)	32 21,28	negativ (Tp47: 1) keine Banden
VZV	27	0 (0%)	-	-
CMV	30	4 (13%)	53 106 32, 32	positiv negativ (Tp17: 2) keine Banden
EBV	30	3 (10%)	28, 40, 42	keine Banden
HIV	29	5 (17%)	157, 64, 60, 50, 68	nicht bestimmt
ANA	33	1 (3%)	21	negativ (Tp15: 2)
AMA	5	0 (0%)	-	-
Rheumafaktor-positive	20	1 (5%)	117	keine Banden
E.coli	12	1 (8%)	26	keine Banden
Yersinien	20	0 (0%)	-	-

Tabelle 6: Spezifität, Evaluierung MIKROGEN 2005

	Anzahl	IgM positiv/ grenzw.	IgM U/ml	IgM recomBlot Treponema
Blutspender				
Plasmen Deutschland #1075-1174	100	0 (0%)	-	-
Plasmen Deutschland #875-974	100	2 (2%)	37 35	negativ (Tp17: 1) negativ (Tp17: 1)
Seren Deutschland #401-500	99	0 (0%)	-	-
Frauen				
Seren von Frauen, 50-59 Jahre	44	0 (0%)	-	-
Seren von Frauen, 20-29 Jahre	43	1 (2%)	21	negativ (TmpA:1, Tp17: 1)
Potentielle Störfaktoren / Kreuzreaktive				
Borrelia Antikörper- positive (klinisch definiert)	16	0 (0%)	-	-
Borrelia Antikörper- positive (Blutspender)	25	0 (0%)	-	-
Leptospirosis-positive	2	0 (0%)	-	-
Rheumafaktor-positive	22	0 (0%)	-	-
ANA-positive	21	0 (0%)	-	-
Frische EBV- Infektionen	21	2 (9,5%)	26 23	Hintergrundreaktivität negativ (TmpA: 1, Tp17: 1)
Yersinia Antikörper- positive	59	3 (5%)	37, 35	negativ (Tp17: 1)
Schwangere Frauen	95	3 (3 %)	23 22 31	negativ (TmpA: 1, Tp17: 1) keine Banden negativ (Tp17: 1)

13. Literatur

Die ausführliche Literaturliste finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation ab Seite 13.
Auf Anforderung senden wir Ihnen gerne weiterführende Literatur zur Syphilis-Diagnostik zu.

14. Erklärung der Symbole

Die Tabelle mit der Erklärung der Symbole finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation auf Seite 14.

recomWell Treponema IgG

recomWell Treponema IgM

Enzyme immunoassay with recombinant antigens for the detection of IgG or IgM antibodies against *Treponema pallidum* in human serum or plasma.

1. General Aspects

recomWell Treponema is a quantitative in vitro test for the detection and safe identification of IgG or IgM antibodies against *Treponema pallidum* in human serum or plasma. **recomWell Treponema** is a screening test based on the principle of an indirect sandwich ELISA.

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. Human pathogen Treponemes are considered as not culturable 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, in 1995 world-wide ca. 12 million new infections in adults were reported. In Germany, the number of new infections per 100 000 citizens has decreased from 85 in 1950 to 1.4 in 1997. In the succession states of the former Soviet Union the number of new infections increased from 1988 with 4.2 infections to 263 in 1996 (per 100.000 citizens). Insight of population migration and tourism even in Western Europe, increasing syphilis numbers are to be expected (1).

2.2. Pathogenesis and clinical picture (1)

Infection occurs by direct contact with infected lesions via microtraumas 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 focus.

The secondary stage (lues II) develops 3 - 6 weeks later. This stage is characterised by (1) the hematogenic 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 fetus 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 accompanied by an automated readout. 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 clinical results).

4. Test Principle - recomWell Treponema

For recomWell Treponema IgG/IgM the specific *Treponema pallidum* antigens Tp 47, Tp 17 and Tp 15 are made with the help of recombinant *E. coli* cells (3). In this way, an optimal presentation without other interfering and cross reacting proteins can be achieved.

5. Package contents

The reagents in one pack are sufficient for 96 determinations.

Each reagent set contains:

WASHBUF 10 X	100 ml	Wash buffer (ten times the concentration) Contains phosphate buffer, NaCl and detergent, Preservatives: methylisothiazolone and oxyprione
DILUBUF	125 ml	Dilution buffer (ready-for-use) Contains protein, detergent and blue dye Preservatives: methylisothiazolone and oxyprione
SUBS TMB	12 ml	Chromogenic substrate tetramethylbenzidine (TMB, ready-for-use)
SOLN STOP	12 ml	Stop solution 25 % Phosphoric acid
INSTRU	1	Instructions for use
EVALFORM	1	Evaluation form
TAPE	2 pieces	Sealing tape

5.1. recomWell Treponema IgG

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

MTP	12 x 8 wells	Microplate (section marked in red) coated with recombinant <i>T. pallidum</i> antigens in vacuum-pressure sealed bag
CONTROL + IgG	150 µl	Positive control (violet screw cap) Preservatives: methylisothiazolone and oxyprione
CONTROL ± IgG	150 µl	Cutoff control (yellow screw cap) Preservatives: methylisothiazolone and oxyprione
CONTROL - IgG	150 µl	Negative control (white screw cap) Preservatives: methylisothiazolone and oxyprione

CONJ IgG	250 µl	Anti-human IgG conjugate (101 times the concentration, red screw cap) Preservatives: methylisothiazolone, sodium azide and chloroacetamide
-------------------	--------	--

5.2. recomWell Treponema IgM

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

MTP	12 x 8 wells.	Microplate (section marked in green) coated with recombinant T. pallidum antigens in vacuum-pressure sealed bag
------------	---------------	---

CONTROL + IgM	150 µl	Positive control (black screw cap) Preservatives: methylisothiazolone and oxypyrione
------------------------	--------	--

CONTROL ± IgM	150 µl	Cutoff control (colourless screw cap) Preservatives: methylisothiazolone and oxypyrione
------------------------	--------	---

CONTROL - IgM	150 µl	Negative control (white screw cap) Preservatives: methylisothiazolone and oxypyrione
------------------------	--------	--

CONJ IgM	250 µl	Anti-human IgM conjugate (101 times the concentration, green screw cap) Preservatives: methylisothiazolone, sodium azide and chloroacetamide
-------------------	--------	--

6. Additional reagents and accessory equipment required

Deionised water, test tubes, micro pipettes, incubator 37°C, microplate photometer

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 sample.
- ☞ Suitable single-use gloves must be worn during the entire test procedure.
- ☞ The conjugates, controls, dilution buffer and wash buffer contain preservative agents. Avoid contact with skin or mucosa.
- ☞ Phosphoric acid is an irritant. Avoid all 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.

7.2. Handling information

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 the solutions

The test reagents are sufficient for 96 IgG or IgM tests. The amounts indicated below refer to processing of a microplate strip with 8 wells. If several microplate strips are used at the same time, the amounts indicated must be multiplied by the number of microplate strips used.

Substrate and stop solution are ready to use.

7.3.1. Preparation of ready-to-use wash buffer

The wash buffer concentrate is diluted **1 + 9** with deionised H₂O. 5 ml concentrate are mixed with 45 ml deionised H₂O per microplate strip with 8 wells.

7.3.2. Preparation of conjugate solution

Per each microplate strip with 8 wells, 10 µl anti-human IgG peroxidase conjugate (red cap) or. IgM peroxidase conjugate (green cap) are added to 1 ml dilution buffer in a clean vessel and mixed well (dilution **1 + 100**).

7.4. Storage and stability

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

The ready-to-use wash buffer can be prepared in larger amounts. Ready-to-use wash buffer may be stored at room temperature for one week for use in further tests.

The sample dilutions, controls and conjugate solution must always be prepared 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 will result in raised background reaction levels and are therefore unsuitable for use. A microbial contamination of the sample has to be avoided at all costs. Insoluble substances must be removed from the sample prior to incubation by centrifugation.

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 below. Repeated freezing and thawing of the samples is not recommended because this may affect the quality of the results.

9. Test procedure

9.1. Test preparations

Temper all reagents to room temperature (18°C - 25°C) before use for about 30 minutes. To avoid condensation of water in the microplate, it must be brought up to room temperature **in the closed bag**. After the required section is removed, the bag containing the plate must be reclosed and placed in the refrigerator.

Before use, the control and patient sera and concentrated conjugates must be mixed well and briefly centrifuged if practicable to collect the liquid at the bottom of the tubes.

9.2. Preparation of samples and controls

Pipette 10 µl of sample or control into 1 ml dilution buffer each and mix well (dilution **1 + 100**). A negative control, cutoff control and positive control must be run parallel to each test run and diluted just like the patient samples.

9.3. Incubation of the samples

The microplate is removed from the pressure-sealed bag.

Pipette **100 µl** per well of the diluted samples and diluted controls. One value is tested for each negative control, positive control and patient sample, whereas the cutoff control must be double-tested. It is preferable to pipette one cutoff control at the beginning and again at the end of the series.

In manual processing, the microplate is **carefully taped** over with sealing tape and incubated for **1 hour** at **37°C**.

9.4. Washing procedure

The wells are emptied completely, then washed **four times**, each time with 300 µl ready-to-use wash buffer per well. We recommend performing this step with the appropriate ELISA washing equipment. Make absolutely sure that the wash buffer is removed completely between the washing steps.

After the last washing step is completed (even if washing equipment is being used) tap the plate over a paper towel to remove any residual liquid from the wells.

9.5. Incubation with peroxidase conjugate

Pipette **100 µl** per well.

In manual processing, the microplate is **carefully taped** over with sealing tape and incubated for **30 minutes at 37°C**.

9.6. Washing procedure

The wells are emptied and washed as described under 9.4.

9.7. Substrate reaction

The substrate solution is ready to use.

Pipette **100 µl** per well.

The microplate is incubated for **30 minutes at room temperature** while protecting it from direct sunlight. The time is counted from pipetting of the first well.

9.8. Stopping the reaction

To stop the reaction, pipette **100 µl** of stop solution per well, using the same pipetting scheme as for the substrate solution.

9.9. Measurement of the extinctions

The extinction in the individual wells are measured in a microplate photometer at **450 nm** and at the reference wavelength **650 nm** (620 to 650). Blank on air. Measurement should be performed within 60 minutes after stopping the reaction.

10. Summary of the test procedure

Dilutions:

- | | | |
|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| • Dilution of samples and controls | 1 + 100 with dilution buffer | 10 µl + 1 ml per sample resp. control |
| • Conjugate dilution: | 1 + 100 with dilution buffer | 10 µl + 1 ml per microplate strip |
| • Wash buffer dilution: | 1 + 9 with deionised H ₂ O | 5 ml + 45 ml per microplate strip |

Test steps:

- | | | |
|-------------------------|--------------------|----------------------------|
| • Sample incubation: | 100 µl per well | 60 min at 37°C |
| • Washing step: | 300 µl per well | four times |
| • Conjugate incubation: | 100 µl per well | 30 min at 37°C |
| • Washing step: | 300 µl per well | four times |
| • Substrate incubation: | 100 µl per well | 30 min at room temperature |
| • Stopping: | 100 µl per well | |
| • Photometry: | 450 / 650 (620) nm | |

11. Validation and evaluation

11.1. Validation

Cutoff control: The average value of the extinction values for the two cutoffs (at the beginning and end of the series) is obtained.

The test can be evaluated under the following conditions:

The individual extinction values for double-testing of the cutoff control deviate from their average value not more than 20%.

- | | | |
|--|---------|-------------------------------------|
| • Extinction negative control | ≤ 0.150 | |
| • Extinction cutoff control
($E_{\text{cutoff}} - E_{\text{neg. contr.}} \geq 0.050$) | - | Extinction negative control ≥ 0.050 |
| • Extinction positive control
($E_{\text{pos. contr.}} - E_{\text{cutoff}} \geq 0.300$) | - | Extinction cutoff control ≥ 0.300 |

11.2. Evaluation

11.2.1. Qualitative evaluation

Cutoff (boundary value): Extinction average for cutoff control

Grey range: Lower limit = Cutoff
 Upper limit = Cutoff + 20% (cutoff x 1.2)

- Samples with extinction values above the grey range are to be considered **positive**.
- Samples with extinction values below the grey range are to be considered **negative**.
- Samples with extinction values in the grey range are **borderline** and should be retested. If they are still borderline after the second test, it is recommended that an additional sample should be taken after a period of time and retested (cf. 11.3).

11.2.2. Quantitative evaluation

The antibody activity levels in units per ml are assigned to the extinction values using a formula.

U/ml sample = (extinction sample / extinction cutoff) x 20

Grey range: Lower limit = 20 U/ml
 Upper limit = 24 U/ml

- U/ml sample > 24 **positive** test result
- U/ml sample < 20 **negative** test result
- $20 \leq$ U/ml sample \leq 24 **borderline** test result

11.3. Directions for the Interpretation of Test Results

A negative result in the *recomWell* 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 four weeks.

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

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

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 should be considered: Cross reacting antibodies against the antigens Tp47, Tp17, and Tp15 used in *recomWell* Treponema have not been described. These are characteristic *Treponema pallidum* antigens which are not observed in sera from Lyme borreliosis patients.

During infection by human Herpes viruses (EBV, CMV, HSV) unspecific reactions may occur in IgM antibody detection (see 12.2.2). It is advised to confirm positive or borderline results in Western Blot and to exclude an infection by the human Herpes viruses.

In other sample collectives only few, none-confirmed reactivities were found (see 12.1.3 and 12.2.2).

We thus recommend to generally verify positive and borderline Elisa results in a confirmatory assay (e.g. a Western Blot)

12. Clinical Results

12.1. IgG

12.1.1. Sensitivity

The sensitivity is calculated as the percentage proportion, with the respective test system of positively defined samples of all examined positive defined samples.

Table 1: External Evaluation 2000 in Bologna, Italy

	Number	IgG
Primary syphilis	19	17 (89,5%)
Secondary syphilis	24	24 (100%)
Early latent syphilis	67	67 (100%)
Late syphilis	4	4 (100%)

12.1.2. Screening - Sera

Table 2: External Evaluation 2000 in Bologna, Italy (unselected samples for routine-laboratory-screening syphilis, hospital in Bologna, Italy)

Number 400	IgG	
negative	387 (97%)	
positive or borderline	13 (3%)	
Confirmation: Western Blot	8 confirmed positive (2%) Prevalence 2%	2 negative (Tp47: 1, Tp17: 1) (0,5%) 3 negative (Tp47: 1) (0,75%)
Specificity	98,7%	

Evaluation criteria *recomWell* Treponema: U/ml sample > 24 **positive** test result
 U/ml sample < 20 **negative** test result
 20 ≤ U/ml sample ≤ 24 **borderline** test result

Evaluation criteria *recomBlot* Treponema:

Bands	Intensity
no reaction	0
lower intensity like the weak-positive-control	1
same or stronger intensity than the weak-positive-control	2

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

IgG: ≤ 2	negative	IgM: ≤ 2	negative
3 – 4	indeterminate	3	indeterminate
≥ 5	positive	≥ 4	positive

12.1.3. Specificity

Table 3: Specificity Evaluation MIKROGEN 2005

	Number	IgG positive/ borderline	IgG U/ml	ELISA A (polyvalent)	IgG recomBlot Treponema
Blood donors					
Plasma from Germany #001-200	200	9 (4,5%)	30 40, 22, 24 53, 22 28, 29, 40	borderline positive n.d. n.d.	negative (Tp47: 1) no bands negative (Tp47: 1) negative (Tp17: 2)
Plasma from Germany #201-300	100	6 (6%)	35 20 23, 20, 21, 23	borderline negative Positive	negative (Tp17: 1) negative (Tp17: 1) no bands
Sera from Germany #401-500	100	5 (5%)	21, 22, 26 49 40	n.d.	no bands negative (Tp17: 1) negative (Tp47: 1)
Sera from Italy*	200	0 (0%)	-	-	-
Plasma from Germany #875-974	100	4 (4%)	34, 31, 42 41	n.d.	negative (Tp17: 1) negative (Tp17: 1; Tp15: 1)
Potentially interfering samples					
Borrelia antibody positive (clinically defined)	20	1 (5%)	29		negative (Tp47: 1)
Leptospirosis positive	10	0 (0%)	-	-	-
rheumatoid factor-positive	20	4 (20%)	20 20, 20, 22	n.d.	negative (Tp47: 2) no bands
ANA positive	31	2 (6,5%)	21, 24	n.d.	no bands
fresh EBV-infections	30	1 (5%)	22	n.d.	negative (Tp47: 1)
pregnant women	107	4 (4%)	44, 40, 22 24	n.d.	no bands negative (Tp17: 1)

*External Evaluation 2000 in Bologna, Italy

n.d.: not determined

12.2. IgM**12.2.1. Sensitivity****Table 4:** External Evaluations in Frankfurt (Site A) and in Herford (Site B) 2005

	Site A		Site B		Total	
	Number	IgM positive/ borderline	Number	IgM positive/ borderline	Number	IgM positive/ borderline
Stage I (active infection)	-	-	5	5 (100%)	5	5 (100%)
Stage I (HIV-positive)*	36	26 (72%)	-	-	36	26 (72%)
Stage II	45	42 (91%)	1	1 (100%)	46	43 (93,5%)
Stage II-III	46	39 (85%)			46	39 (85%)
latent Treponema infection	2	1 (50%)	7	0 (0%)	9	1 (11%)
Syphilis satis curata	-	-	14	0	14	0 (0%)

*Samples from HIV positive patients with clinical symptoms of a Syphilis infection in stage I. In these patients the probability of re-infection is high. The immune response in primary infection and in re-infection may differ with respect to the IgM.

12.2.2. Specificity**Table 5:** Specificity, External Evaluation Frankfurt 2005

	Number	IgM positive / borderl.	IgM U/ml	IgM recomBlot Treponema
Blood donors	149	3 (2,0%)	25, 25, 31	no bands
Potentially interfering sera				
Salmonella	30	1 (3,3%)	37	positive
FSME	20	0 (0%)	-	-
Leptospirosis	26	0 (0%)	-	-
HSV	30	3 (10%)	32 21,28	negative (Tp47: 1) no bands
VZV	27	0 (0%)	-	-
CMV	30	4 (13%)	53 106 32, 32	positive negative (Tp17: 2) no bands
EBV	30	3 (10%)	28, 40, 42	no bands
HIV	29	5 (17%)	157, 64, 60, 50, 68	not determined
ANA	33	1 (3%)	21	negative (Tp15: 2)
AMA	5	0 (0%)	-	-
rheumatoid factor- positive	20	1 (5%)	117	no bands
E.coli	12	1 (8%)	26	no bands
Yersinia	20	0 (0%)	-	-

Table 6: Specificity, Evaluation MIKROGEN 2005





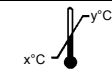
	Number	IgM positive/ borderl.	IgM U/ml	IgM recomBlot Treponema
Blood donors				
Plasma from Germany #1075-1174	100	0 (0%)	-	-
Plasma from Germany #875-974	100	2 (2%)	37 35	negative (Tp17: 1) negative (Tp17: 1)
Sera from Germany #401-500	99	0 (0%)	-	-
Women				
Sera from women, 50-59 years old	44	0 (0%)	-	-
Sera from women, 20-29 years old	43	1 (2%)	21	negative (TmpA:1, Tp17: 1)
Potentially interfering samples				
Borrelia antibody positive (clinically defined)	16	0 (0%)	-	-
Borrelia antibody positive (Blood donors)	25	0 (0%)	-	-
Leptospirosis positive	2	0 (0%)	-	-
rheumatoid factor- positive	22	0 (0%)	-	-
ANA positive	21	0 (0%)	-	-
fresh EBV-infections	21	2 (9,5%)	26 23	background reactivity negative (TmpA: 1, Tp17: 1)
Yersinia antibody positive	59	3 (5%)	37, 35	negative (Tp17: 1)
pregnant women	95	3 (3 %)	23 22 31	negative (TmpA: 1, Tp17: 1) no bands negative (Tp17: 1)

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, Marangoni A, Simone MA, Dántuono A, Negosanti M, Cevenini R **Evaluation of recomWell Treponema, a novel recombinant antigens based enzyme immunosorbent assay for the diagnosis of syphilis**. *CMI* 2001, 7(4), 200 - 205

We will be pleased to send you further literature on the diagnosis of syphilis.

14. Explanation of the symbols

	Contains sufficient for < n > tests (number of tests)	Inhalt ist ausreichend für < n > Ansätze (Anzahl der Ansätze)
	Consult instructions for use	Gebrauchsinformation beachten
CONT	Contains	Inhalt, enthält
IVD	in vitro diagnostic device	In vitro Test
LOT	Batch code	Chargen-Nummer
	Do not freeze	Nicht einfrieren
REF	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

recomWell Treponema IgG	Artikel-Nr./ Article No.:	5104
recomWell Treponema IgM	Artikel-Nr./ Article No.:	5105
Gebrauchsinformation/ Instructions for use:		GIRETP008DE.DOC
gültig ab/ valid from:		November/November 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:		
