

## Treponema+VDRL ViraBlot® IgM Test Kit

Stripe-Immunoblot zum **qualitativen** Nachweis von **IgM** Antikörpern gegen spezifische **Treponema pallidum** Antigene sowie zur **quantitativen** Bestimmung von **IgM** Antikörpern gegen spezifische **VDRL** Antigene im humanem Serum oder Liquor. Für die Durchführung des **Treponema+VDRL ViraBlot® IgM Test Kit** mit Liquor (CSF) als Probenmaterial ist die entsprechende separat erhältliche Arbeitsanleitung zu beachten.

Der **Treponema+VDRL ViraBlot® IgM Test Kit** ist ein Immunoblot auf Basis eines Enzym-Immunoassays im Line/Stripe Format, bei dem folgenden aufgereinigte Treponema-spezifische Antigene verwendet werden: **p47, p44.5, p17, p15** (1) und zusätzlich **VDRL** spezifisches Antigen (8).

### Testprinzip

Treponema-spezifische und VDRL-spezifische IgM Antikörper binden während der Seruminkubation an das fixierte Antigen auf dem Teststreifen. Während der Konjugatreaktion bindet das AP-Konjugat an den Antigen-Antikörper-Komplex. Die Alkalische Phosphatase setzt das Chromogen/Substrat um und färbt damit den Antigen-Antikörper-Komplex auf dem Teststreifen lila an. Die Waschschritte nach der Seruminkubation, der Konjugatinkubation und der Chromogen/Substrat-Inkubation entfernen ungebundene Antikörper und Reagenzien.

Die grüne Trennlinie teilt den Teststreifen in einen Kontrollabschnitt und einen Analytabschnitt. Im Kontrollabschnitt befinden sich die **Negativkontrollbande**, die **Serumkontrolle**, **drei Konjugatkontrollen** (IgG, IgA, IgM) und die **Cut off Kontrolle**.

Der Teststreifencode für die Treponema+VDRL ViraBlot® IgM Teststreifen ist **TM**. Die Teststreifen sind von **01** bis **25** nummeriert. Im Analytabschnitt befinden sich die Treponema-spezifischen und das VDRL Antigen.

Best.-Nr.:	<b>V-TPBMSK</b>	Best.-Nr.:	<b>V-TPBMXK (Penta Kit)</b>
Packungsgröße:	<b>1x 25 Teststreifen</b>	Packungsgröße:	<b>10x 25 Teststreifen</b>
Probenmaterial:	<b>20 µl Serum</b>	Probenmaterial:	<b>20 µl Serum</b>
Testdauer:	<b>ca. 90 Minuten</b>	Testdauer:	<b>ca. 90 Minuten</b>

### Kitinhalt

1x bzw. 10x 25 Teststreifen	<b>Treponema+VDRL ViraBlot® Antigen Strips (IgM)</b>	(Prod.-Nr.: V-TPBMAS)
	Teststreifen mit Kontrollabschnitt und Treponema-spezifischen Antigenen im Analytabschnitt, gebrauchsfertig	
1x bzw. 10x 4,5 ml	<b>ViraStripe® / ViraBlot® AP-Anti-Human IgM Conjugate</b>	(Best.-Nr.: V-UVNMKI45)
	Konjugat-Konzentrat, Ziege	
1x bzw. 10x 100 ml	<b>Treponema+VDRL ViraBlot® Diluent / Wash Buffer_Treponema</b>	(Best.-Nr.: V-TPNFWP)
	Treponema+VDRL ViraBlot® Proben-/Waschpuffer-Konzentrat, 10-fach	
1x bzw. 10x 5 g	<b>ViraStripe® / ViraBlot® Diluent / Wash Powder</b>	(Best.-Nr.: V-UVNUMP)
	Proben-/Waschpuffersalz	
1x bzw. 10x 90 ml	<b>ViraStripe® / ViraBlot® Chromogen / Substrate Solution</b>	(Best.-Nr.: V-UVNUCS)
	Chromogen/Substratlösung, gebrauchsfertig	
1 bzw. 10 Exemplare	<b>Auswerteprotokoll Treponema+VDRL ViraBlot® IgM Test Kit</b>	

### Zusätzlich separat lieferbar

330 µl	<b>Treponema+VDRL ViraBlot® IgM Positive Control</b>	(Best.-Nr.: V-TPBMPK)
	IgM positives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig	
330 µl	<b>Treponema+VDRL ViraBlot® IgM Weak Positive Control</b>	(Best.-Nr.: V-TPBMWK)
	IgM schwach positives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig	
330 µl	<b>Treponema+VDRL ViraBlot® IgG,M Negative Control</b>	(Best.-Nr.: V-TPBFNK)
	IgG, IgM negatives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig	
50 Exemplare	<b>Treponema+VDRL ViraBlot® IgM Auswerteprotokolle</b>	(Best.-Nr.: V-TPBUPE)
	für die automatisierte Auswertung mit der ViraScan® Software	

### Vorbereiten der Reagenzien und der Patientenproben

**Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.** Informationen zur Haltbarkeit finden Sie auf Seite 6.

**Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung:** **Proben-/Waschpuffer-Konzentrat 1:10** in destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen (100 ml Konzentrat + 900 ml Wasser). Anschließend Proben-/Waschpuffersalz komplett zugeben und solange mischen, bis sich das Pulver vollständig aufgelöst hat. Eventuell 10-15 Minuten auf einen Magnetrührer stellen. Der pH-Wert sollte um pH 7,5 bei 20°C liegen. **Achtung: Das Treponema+VDRL ViraBlot® Proben-/Waschpuffer-Konzentrat ist spezifisch für Treponema+VDRL ViraBlot® Test Kits und muss entsprechend eingesetzt werden.**

**Teststreifen:** Benötigte Teststreifen vorsichtig mit der **Pinzette** an der **Beschriftung** fassen, vom Steg lösen und in die vorbereitete Inkubationswanne legen (Arbeitsvorschrift Punkt 2). Nach Entnahme aus der Verpackung sofort verwenden. Teststreifen nicht mit den Fingern berühren. Nicht benötigte Teststreifen sofort wieder in die Originalverpackung zurückgeben, dicht verschließen und bei 2-8°C lagern.

**Patientenproben:** Pro Ansatz werden **20 µl Patientenserum** unverdünnt eingesetzt.

**Kontrollen:** Pro Ansatz werden je **100 µl** des **positiven Kontrollserums** sowie des **negativen Kontrollserums** unverdünnt eingesetzt.

**Konjugat-Gebrauchsverdünnung:** **Konjugat-Konzentrat 1:10** mit Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung ansetzen (siehe Tabelle 1). Vor jedem Testansatz frisch ansetzen. Nicht aufbewahren.

**Chromogen/Substratlösung:** Gebrauchsfertig.

## Treponema+VDRL Virablot® IgM Test Kit

- 2 -

**Herstellung der Konjugat-Gebrauchsverdünnung IgM**

Anzahl Streifen	Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung	Konjugat-Konzentrat	Endvolumen	Anzahl Streifen	Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung	Konjugat-Konzentrat	Endvolumen		
1	1,35 ml	+	0,15 ml	1,5 ml	26	35,10 ml	+	3,90 ml	39,0 ml
2	2,70 ml	+	0,30 ml	3,0 ml	27	36,45 ml	+	4,05 ml	40,5 ml
3	4,05 ml	+	0,45 ml	4,5 ml	28	37,80 ml	+	4,20 ml	42,0 ml
4	5,40 ml	+	0,60 ml	6,0 ml	29	39,15 ml	+	4,35 ml	43,5 ml
5	6,75 ml	+	0,75 ml	7,5 ml	30	40,50 ml	+	4,50 ml	45,0 ml
6	8,10 ml	+	0,90 ml	9,0 ml	31	41,85 ml	+	4,65 ml	46,5 ml
7	9,45 ml	+	1,05 ml	10,5 ml	32	43,20 ml	+	4,80 ml	48,0 ml
8	10,80 ml	+	1,20 ml	12,0 ml	33	44,55 ml	+	4,95 ml	49,5 ml
9	12,15 ml	+	1,35 ml	13,5 ml	34	45,90 ml	+	5,10 ml	51,0 ml
10	13,50 ml	+	1,50 ml	15,0 ml	35	47,25 ml	+	5,25 ml	52,5 ml
11	14,85 ml	+	1,65 ml	16,5 ml	36	48,60 ml	+	5,40 ml	54,0 ml
12	16,20 ml	+	1,80 ml	18,0 ml	37	49,95 ml	+	5,55 ml	55,5 ml
13	17,55 ml	+	1,95 ml	19,5 ml	38	51,30 ml	+	5,70 ml	57,0 ml
14	18,90 ml	+	2,10 ml	21,0 ml	39	52,65 ml	+	5,85 ml	58,5 ml
15	20,25 ml	+	2,25 ml	22,5 ml	40	54,00 ml	+	6,00 ml	60,0 ml
16	21,60 ml	+	2,40 ml	24,0 ml	41	55,35 ml	+	6,15 ml	61,5 ml
17	22,95 ml	+	2,55 ml	25,5 ml	42	56,70 ml	+	6,30 ml	63,0 ml
18	24,30 ml	+	2,70 ml	27,0 ml	43	58,05 ml	+	6,45 ml	64,5 ml
19	25,65 ml	+	2,85 ml	28,5 ml	44	59,40 ml	+	6,60 ml	66,0 ml
20	27,00 ml	+	3,00 ml	30,0 ml	45	60,75 ml	+	6,75 ml	67,5 ml
21	28,35 ml	+	3,15 ml	31,5 ml	46	62,10 ml	+	6,90 ml	69,0 ml
22	29,70 ml	+	3,30 ml	33,0 ml	47	63,45 ml	+	7,05 ml	70,5 ml
23	31,05 ml	+	3,45 ml	34,5 ml	48	64,80 ml	+	7,20 ml	72,0 ml
24	32,40 ml	+	3,60 ml	36,0 ml	49	66,15 ml	+	7,35 ml	73,5 ml
25	33,75 ml	+	3,75 ml	37,5 ml	50	67,50 ml	+	7,50 ml	75,0 ml

**Tabelle 1:** Konjugat-Konzentrat 1:10 mit Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung ansetzen

**Arbeitsvorschrift**

- Inkubationswanne mit jeweils ca. 1,5 ml Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung spülen, Puffer abgießen**  
Inkubationswanne mit einem wasserunlöslichen Stift beschriften. Das Spülen entfernt Staubpartikel.
  - Die gewünschte Anzahl an Teststreifen in die Inkubationswanne legen - ein Teststreifen pro Rinne**  
Pro Patienten- bzw. Kontrollserum je einen Teststreifen vorsichtig mit einer Pinzette an der Beschriftung fassen, vom Steg lösen und in die Inkubationswanne legen. **Die Seite mit der grünen Trennlinie und der Beschriftung muss nach oben weisen.**
  - Je 1,5 ml Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) auf dem Schüttler inkubieren**  
Sicherstellen, dass die Teststreifen vollständig bedeckt sind. Auf einen Schüttler mit einer Taktfrequenz von ca. 40/Minute stellen. Überlaufen vermeiden. **Puffer nicht abgießen.**
  - Je 20 µl Patientenserum bzw. 100 µl Kontrollserum zugeben**  
Seren direkt im Bereich der Beschriftung auf dem Teststreifen zugeben. Darauf achten, dass der Schüttler läuft, bzw. die Inkubationswanne nach jeder Serumzugabe schwenken.
  - 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren**  
Sicherstellen, dass die Teststreifen vollständig bedeckt sind. Auf einen Schüttler mit einer Taktfrequenz von ca. 40/Minute stellen.
  - Flüssigkeit abgießen**  
Restliche Flüssigkeit auf Filterpapier gut abklöpfen. **Beim Abgießen bleiben die Teststreifen am Inkubationswannenboden haften.**
  - 3 x waschen:**  
- je 1,5 ml Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung zugeben  
- 5 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren  
- Flüssigkeit abgießen  
Auf dem Schüttler. Restliche Flüssigkeit gut auf Filterpapier abklöpfen.
  - Je 1,5 ml frische Konjugat-Gebrauchsverdünnung zugeben**  
Darauf achten, dass die Teststreifen vollständig mit Konjugat-Gebrauchsverdünnung bedeckt sind.
  - 15 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubieren**  
Sicherstellen, dass die Teststreifen vollständig bedeckt sind. Auf einen Schüttler mit einer Taktfrequenz von ca. 40/Minute stellen.
  - Flüssigkeit abgießen**  
Restliche Flüssigkeit auf Filterpapier gut abklöpfen.
  - 3 x waschen wie in Punkt 7**  
Auf dem Schüttler.
  - Je 1,5 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser zugeben und 1 Minute bei RT auf dem Schüttler inkubieren**  
Sicherstellen, dass die Teststreifen vollständig bedeckt sind. Auf einen Schüttler mit einer Taktfrequenz von ca. 40/Minute stellen.
  - Flüssigkeit abgießen**  
Restliche Flüssigkeit auf Filterpapier gut abklöpfen.
  - Je 1,5 ml Chromogen/Substratlösung zugeben**  
Darauf achten, dass die Teststreifen vollständig bedeckt sind.
  - Bei RT auf dem Schüttler entwickeln**  
Sobald die Cut off Kontrolle sichtbar ist, muss die Reaktion abgestoppt werden. **Die Cut off Kontrolle befindet sich im Kontrollabschnitt auf jedem Teststreifen. Achtung:** Zu langes Entwickeln verursacht Hintergrundfärbung.
- Treponema+VDRL Virablot® IgM: ca. 5 bis 15 Minuten**
- Stoppen: Flüssigkeit abgießen**  
Restliche Flüssigkeit auf Filterpapier gut abklöpfen.
  - 3 x mit je 1,5 ml dest. oder deionisiertem Wasser spülen**  
Ohne Zwischeninkubation.
  - Teststreifen trocknen lassen und auswerten**  
Inkubationswanne gut abklöpfen. Teststreifen auf Filterpapier oder saugfähiges, ungebleichtes Papier legen und trocknen lassen.

## Auswertung

1. Auswerteprotokoll: Daten in das Auswerteprotokoll aufnehmen. Die entwickelten Teststreifen auf das Auswerteprotokoll kleben. Dabei die grüne Trennlinie der Teststreifen exakt auf die im Protokoll vorgedruckte Trennlinie legen.
2. Gültigkeit der Teststreifen: Ein Teststreifen ist gültig, wenn folgende Banden sichtbar sind:
  - Die **Serumkontrolle**.
  - Die **Konjugatkontrolle** der untersuchten Konjugatklasse. Falls mehr als eine der drei Konjugatkontrollen auftreten, muss die stärkste Bande der untersuchten Konjugatklasse entsprechen.
  - Die **Cut off Kontrolle**.

**und** wenn folgende Bande **nicht** sichtbar ist:

  - Die **Negativkontrollbande**.

Ungültige Teststreifen nicht auswerten!
3. Zuordnung der Antigenbanden: Die grüne Trennlinie des Teststreifens gibt die Orientierung für die Zuordnung der Antigenbanden zu dem Bandlocator auf dem Auswerteprotokoll an. Banden zuordnen und entsprechend Punkt 4 protokollieren.
4. Bandenbewertung: Entsprechend den Qualitätsrichtlinien im Labor soll pro Testansatz eine Cut off Kontrolle mitgeführt werden (11). **Die Cut off Kontrolle für den Treponema+VDRL ViraBlot® IgM befindet sich im Kontrollabschnitt auf jedem Teststreifen.** Die Intensität der Cut off Kontrolle gibt den Schwellenwert an, ab dem eine Bande gewertet wird:
  - a. Treponema spezifische Banden: Eine Bande wird als **deutlich** gewertet, wenn die Intensität **gleich** oder **größer** als die Intensität der Cut off Kontrolle ist. Entsprechende Banden werden im Auswerteprotokoll mit **X** gekennzeichnet.  
Eine Bande wird als **schwach** gewertet, wenn die Intensität **kleiner** als die Intensität der Cut off Kontrolle ist. Entsprechende Banden werden im Auswerteprotokoll mit **(X)** gekennzeichnet.  
**Achtung:** Banden, die nur ganz minimal zu erkennen sind, werden nicht gewertet.  
Eine Bande wird nicht gewertet, wenn sie **nicht vorhanden** ist.
  - b. VDRL Banden: Jede der **fünf VDRL Banden** wird nach den folgenden Richtlinien mit ViraBlot® Einheiten bewertet:  
**0:** Keine VDRL Bande sichtbar oder VDRL Bandenintensität **kleiner** als die als die Intensität der Cut off Kontrolle.  
**1:** VDRL Bandenintensität **gleich** oder **größer** als die Intensität der Cut off Kontrolle.  
**2:** VDRL Bandenintensität **viel größer** als die Intensität der Cut off Kontrolle.  
Die Summe der erhaltenen ViraBlot® Einheiten in das Auswerteprotokoll eintragen.
5. Beurteilung der Patientenbanden: Die Patientenbanden sind als Krankheitssymptome zu werten. Eine endgültige Diagnose sollte immer unter Wertung von Anamnese, Klinik und Labordaten erfolgen. Als **hochspezifisch** für **Treponema pallidum** gelten die Banden folgender Antigene: **47 kD, 44.5 kD, 17 kD, 15 kD.**

## IgM Interpretationskriterien

Allgemein gilt: Die Bandenintensitäten werden anhand der Cut off Kontrolle bestimmt. Diese befindet sich im Kontrollabschnitt auf jedem Teststreifen. Deutliche Banden haben eine Intensität  $\geq$  der Cut off Kontrolle. Schwache Banden haben eine Intensität  $<$  der Cut off Kontrolle

Auftretende Banden	Ergebnis	Beurteilung
Mindestens <b>zwei deutliche</b> Banden aus: <b>p47, p44.5, p17, p15</b> oder eine <b>deutliche</b> Bande <b>p47 plus ein bis drei schwache</b> Banden oder eine <b>deutliche</b> Bande <b>p17 plus ein bis drei schwache</b> Banden oder eine <b>deutliche</b> Bande <b>p15 plus ein bis drei schwache</b> Banden	<b>Positiv</b>	Spezifische IgM Antikörper gegen <b>Treponema pallidum</b> nachweisbar. Eine Infektion mit Treponema pallidum ist wahrscheinlich.
Eine <b>deutliche</b> Bande aus: <b>p47, p17, p15</b> oder eine <b>deutliche</b> Bande <b>p44.5 plus ein bis drei schwache</b> Banden	<b>Grenzwertig</b>	Hinweis auf eine <b>Treponema pallidum</b> Infektion. Zur Kontrolle nach 2-3 Wochen zweite Probe ansetzen. Bei Verdacht auf eine länger zurückliegende Treponema pallidum Infektion IgG-spezifische Antikörper untersuchen.
Eine <b>deutliche</b> Bande <b>p44.5</b> oder ein bis <b>vier schwache</b> Banden oder keine Bande(n)	<b>Negativ</b>	Keine oder nur geringe Mengen an spezifischen Antikörpern gegen <b>Treponema pallidum</b> nachweisbar.

Treponema+VDRL ViraBlot® IgM Test Kit

- 4 -

**Qualitative VDRL spezifische Bandenbeurteilung:**

VDRL ViraBlot® Einheiten	Ergebnis	Beurteilung
0	<b>Negativ</b> für VDRL	Keine spezifische Lipoidantikörper vorhanden. Bei klinischem Verdacht auf eine frische Treponema Infektion ist eine kurzzeitige Kontrolle empfohlen.
≥ 1	<b>Reaktiv</b> für VDRL	Ein reaktives VDRL Ergebnis kann auf eine frische oder zurückliegende Treponema pallidum Infektion hinweisen. Je nach Klinik deuten reaktive VDRL Ergebnisse auf eine Behandlungsbedürftigkeit hin.

**Quantitative VDRL spezifische Bandenbeurteilung:**

Der Treponema+VDRL ViraBlot® IgM bietet die Möglichkeit, Antikörperreaktionen gegen VDRL auf der Nitrozellulose zu quantifizieren. Dadurch ist eine Aussage zur Behandlungsbedürftigkeit oder zum Therapieerfolg möglich. Die VDRL ViraBlot® Einheiten korrelieren mit den bekannten VDRL oder Cardiolipin KBR Titern in der Regel wie folgt (5):

VDRL ViraBlot® Einheiten	Lipoid-antikörper-Aktivität	Titer VDRL Test	Titer Cardiolipin KBR Test	Ergebnis	Beurteilung
0	keine	<1:1	<1:1	<b>Negativ</b>	Keine spezifische Lipoidantikörper vorhanden. Bei klinischem Verdacht auf eine frische Treponema pallidum Infektion ist eine kurzzeitige Kontrolle empfohlen.
1-2	gering	1:1 - 1:8	1:1 - 1:8	<b>Reaktiv</b>	Ein reaktives VDRL Ergebnis kann auf eine frische oder zurückliegende, noch aktive Treponema pallidum Infektion hinweisen.
3-6	mittel	1:8 - 1:32	1:16 - 1:64	<b>Reaktiv</b>	
7-10	hoch	1:16 - 1:64	1:32 - 1:256	<b>Reaktiv</b>	

**Hinweis:** Aus dem VDRL IgG bzw. IgM Ansatz wird immer der höhere Wert der beiden berücksichtigt.

Ergebnis Treponema spezifische IgM Banden	Ergebnis Treponema spezifische IgG Banden	Ergebnis VDRL spezifische IgM Banden	Ergebnis VDRL spezifische IgG Banden	Beurteilung
∅	∅	∅	∅	Kein Hinweis auf eine Infektion mit Treponema pallidum. Bei klinischem Verdacht kurzfristige Kontrolluntersuchung empfohlen und differentialdiagnostisch Ulcus molle und Herpes genitalis abklären.
∅	∅	+	∅	Lipoidantikörper im VDRL Test deuten auf eine aktive Infektion mit Treponema pallidum hin. Isoliert auftretende Lipoidantikörper können auch unspezifisch bei anderen Infektionserkrankungen, Autoimmunerkrankungen, oder bei Schwangeren auftreten.
∅	∅	∅	+	
∅	∅	+	+	
+	∅	∅	∅	Hinweis auf eine frühe Infektion mit Treponema pallidum.
+	∅	+	∅	Hinweis auf eine frühe Infektion mit Treponema pallidum. Zusätzlich deuten Lipoidantikörper auf eine aktive Infektion hin.
+	∅	∅	+	
+	∅	+	+	
+	+	∅	∅	Hinweis auf eine Infektion mit Treponema pallidum. Je nach Klinik kann es sich auch um eine noch aktive sekundäre Syphilis handeln. Bei einer noch aktiven Infektion muss der Aktivitätsmarker VDRL nicht immer vorhanden sein. Bei Verdacht auf connatale Syphilis sprechen Treponema-spezifische IgM Antikörper und VDRL IgM Antikörper für eine Infektion des Kindes. Die IgG Antikörper können von der Mutter übertragen worden sein.
+	+	+	∅	
+	+	∅	+	
+	+	+	+	
∅	+	∅	∅	Hinweis auf eine länger zurückliegende Treponema pallidum Infektion oder auf eine Serumnarbe. IgG Antikörper können jahrelang persistieren.
∅	+	+	∅	Hinweis auf eine Infektion mit Treponema pallidum. Zusätzlich deuten Lipoidantikörper auf eine noch aktive Infektion hin.
∅	+	∅	+	
∅	+	+	+	

**Legende:** ∅ = negativ / + = positiv

**Tabelle 2:** Ergebnisse des Treponema+VDRL ViraBlot® IgM, IgG und labordiagnostische Bewertung.

Unter Berücksichtigung der Hinweise von Müller und Hagedorn (7): Schwach positive oder zweifelhafte Ergebnisse in den Tests bedürfen grundsätzlich der weiteren Abklärung.

Für eine abschließende Beurteilung sollte immer der Treponema+VDRL IgG und IgM Teststreifen gemeinsam beurteilt werden.

Rheumafaktoren können die Reaktivität der Antigenbanden im IgM beeinflussen. Bei unklaren Bandenkonstellationen RF-Absorbens (Virasorb, 5 ml, Best.-Nr. CB003) für die IgM Analysen verwenden.

## IgM Teststreifen

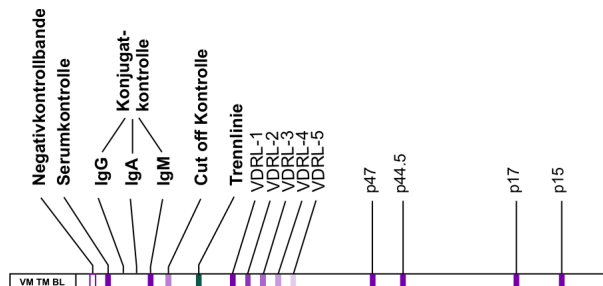


Abbildung 1: Schematische Abbildung eines Treponema+VDRL ViraBlot® IgM Teststreifens in Originalgröße.

## Nomenklatur und Beschreibung der Treponema Banden aus der Literatur

Bandennomenklatur:	Antigen:	Bemerkungen:
p47 47 kD	Hauptmembranprotein <b>Hochspezifisch</b>	Stark immunogenes Lipoprotein, das Endothelialzellen aktiviert (2).
p44.5 44,5 kD	Membranprotein <b>Hochspezifisch</b>	Lipoprotein mit einem Molekulargewicht von 44,5 kD (2).
p17 17 kD	Hauptmembranprotein <b>Hochspezifisch</b>	Lipoprotein, das die Aktivierung von Makrophagen induziert (2).
p15 15 kD	Protein <b>Hochspezifisch</b>	Lipoprotein, das bei der Zell-vermittelten Immunantwort von Bedeutung ist (2).

## Diagnostische Bedeutung von Treponema pallidum Antikörpern

**1. Treponema spezifische IgG, IgM Antikörper.** Nach ca. 2-3 Wochen nach der Syphilis Primärinfektion, werden zunächst IgM Antikörper gebildet (3,4). Nach sanierender Behandlung einer Syphilis im Primärstadium sinkt der IgM Antikörpertiter innerhalb von 6 Monaten unter die Nachweisgrenze. Nach einer sanierenden Behandlung im Sekundär- bzw. Tertiärstadium sind IgM Antikörper bis zu 24 Monate nachweisbar (4). Wenn keine oder nur eine unzureichende Behandlung durchgeführt wurde, können IgM Antikörper jahrelang persistieren, die Infektion kann hierbei in ein chronisch latentes Stadium übergehen (3,4). Bei chronischem Infektionsverlauf fehlen bei einigen unbehandelten Patienten (ca. 2%) Treponemen-spezifische IgM Antikörper, während hohe IgG Antikörper vorhanden sind. Man nimmt an, dass bei diesen chronischen Infektionen die IgM Antikörper-Synthese durch den hohen IgG Antikörpertiter in vivo blockiert wird (4). Sofern eine Erstinfektion rechtzeitig und sanierend behandelt wurde und auch immunologisch, d.h. ohne IgG Antikörpernarbe im Serum ausgeheilt ist, besteht im Ablauf der Antikörpersynthese zwischen Erst- und Zweitinfektion kein Unterschied (3).

Wurde jedoch nach Erstinfektion eine IgG Serumnarbe hinterlassen, kann man bei einer Zweitinfektion steil ansteigende IgG Titer beobachten, die auf einen Booster-Effekt zurückzuführen sind. Gleichzeitig kann eine Hemmung der Produktion von IgM Antikörpern auftreten. Erregerspezifisches

IgM wird somit erst zeitlich verzögert synthetisiert und ist häufig nur mit sehr niedrigen Titern nachweisbar. Zweit- und Mehrfachinfektionen sind deshalb oft nur am Titeranstieg von IgG Antikörpern und nicht am Auftreten von IgM Antikörpern zu erkennen.

**2. VDRL Antikörper:** Als einzelner Test ist die Sensitivität des VDRL Tests in der Frühphase der Syphilis gering und erst im Sekundärstadium bei allen Patienten reaktiv. Außerdem gibt es einen hohen Anteil unspezifischer Ergebnisse. Erst durch die Kombination mit den Treponema-spezifischen Antigenen wie auf dem Treponema+VDRL ViraBlot® IgG bzw. IgM kann die VDRL Reaktion für den Verlauf der Antikörperbildung und als Therapiekontrolle richtig beurteilt werden (7,10).

Die Bedeutung des VDRL Tests liegt in der Therapiekontrolle. Ein drei- bis vierfacher Titeranstieg bei einem Verlaufsserum spricht für eine Infektion, eine Reinfektion oder während der Therapie für eine erfolglose Behandlung. Ein drei- bis vierfacher Titerabfall beim Verlaufsserum während der Behandlung spricht für eine erfolgreiche Therapie (12).

Der Faktor des Titeranstieges bzw. -abfalles kann mit Hilfe der VDRL ViraBlot® Einheiten in der Beurteilung der quantitativen VDRL spezifischen Banden ermittelt werden.

**3. Medikamente und Immunglobulingaben** können unspezifische Antikörperreaktionen hervorrufen (7).



## IgG bzw. IgM Leistungsdaten

### Sensitivität: Treponema-spezifische Antigenbanden

IgG			IgM		
FTA-ABS 156/156 (100%)	Treponema+VDRL Virablot® (n=156) <b>Sensitivität:</b> 156/156 = <b>100%</b>		FTA-ABS 86/89 (97%)	Treponema+VDRL Virablot® (n=89) <b>Sensitivität:</b> 86/89 = <b>97%</b>	
	negativ	positiv*		negativ	positiv*
negativ	0	0	negativ	1	2
positiv*	0	156	positiv*	2	84

**Tabelle 3:** Sensitivität des Treponema+VDRL Virablot® bezüglich Treponema-spezifischer Antikörper

Zur Ermittlung der Sensitivität des Treponema+VDRL Virablot® bezüglich Treponema-spezifischer Antikörper wurden 156 (IgG) bzw. 89 (IgM), mit dem TPHA oder TPPA Test vorcharakterisierte, Patientenseren analysiert. Grenzwertige und positive Seren wurden mit dem FTA-ABS bzw. 19S FTA-ABS Test bestätigt.

### Spezifität: Treponema-spezifische Antigenbanden

IgG				IgM			
	Treponema+VDRL Virablot® <b>Spezifität:</b>				Treponema+VDRL Virablot® <b>Spezifität:</b>		
Kollektiv	negativ	grenzw.	positiv	Kollektiv	negativ	grenzw.	positiv
Blutspender n=147 <b>Spez.: 99%</b>	145	2	0	Blutspender n=147 <b>Spez.: 99%</b>	146	1	0
Schwangere n=100 <b>Spez.: 100%</b>	100	0	0	Schwangere n=100 <b>Spez.: 99%</b>	99	1	0

**Tabelle 4:** Spezifität des Treponema+ VDRLVirablot® bezüglich Treponema-spezifischer Antikörper

Zur Ermittlung der Spezifität des Treponema+ VDRLVirablot® bezüglich Treponema-spezifischer Antikörper wurden 147 Seren von Blutspendern und 100 Seren von Schwangeren (TPPA bzw. TPHA negativ) untersucht. Mit diesen insgesamt 247 Proben wurde kein positives Ergebnis gefunden.

### Sensitivität und Spezifität der VDRL Antigenbanden

Sensitivität			Spezifität		
VDRL konventionell 86/106 (81%)	VDRL IgG + IgM (n=106) <b>Sensitivität:</b> 89/106 = <b>84%</b>		VDRL konventionell 91/100 (91%)	VDRL IgG + IgM (n=100) <b>Spezifität:</b> 92/100 = <b>92%</b>	
	negativ	positiv*		negativ	positiv*
negativ	4	16	negativ	84	7
positiv*	13	73	positiv*	8	1

**Tabelle 5:** Sensitivität und Spezifität des Treponema+VDRL Virablot® bezüglich der VDRL Antikörper

Zur Ermittlung der Sensitivität des Treponema+VDRL Virablot® bezüglich der enthaltenen VDRL Banden wurden 106 Seren mit dem konventionellen VDRL Agglutinationstest vorcharakterisiert. Die Spezifität des Treponema + VDRL Virablot® wurde mit 100 Seren von Blutspendern ermittelt. \*) Grenzwertige und positive Ergebnisse wurden als positive zusammengefasst.

### Vorsichtsmaßnahmen / Sicherheitsvorkehrungen

1. Alle humanen Serumkomponenten wurden auf HCV-, HIV1,2-Antikörper und HBs-Antigen untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten alle humanen Kitkomponenten, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös betrachtet und mit entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen verwendet werden. Bei Arbeiten mit potentiell gefährlichen oder infektiösen Materialien sind die entsprechenden nationalen/internationalen Gesetze, Verordnungen und Vorschriften zu beachten. Dies gilt ebenfalls für die Lagerung und Entsorgung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

2. Die Schutzmaßnahmen für das Arbeiten mit Gefahr- und Biostoffen sind gemäß den aktuell gültigen länderspezifischen Richtlinien für Laboratorien zu beachten. Allgemein sollten beim Umgang mit biologischen und chemischen Arbeitsstoffen die Richtlinien zur „Guten Laborpraxis (GLP)“ angewendet werden. Allgemeine Hygienemaßnahmen sind unter anderem:

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Einweg-Handschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- Am Arbeitsplatz nicht essen, trinken oder rauchen.

### Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

1. **Teststreifen:** Verschllossen in der Originalverpackung bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

2. **Konjugat-Konzentrat:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

3. **Konjugat-Gebrauchsverdünnung:** Vor jedem Testansatz frisch ansetzen. Nicht aufbewahren.

4. **Proben-/Waschpuffer-Konzentrat, 10-fach:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

3. Die Chromogen/Substratlösung enthält BCIP und NBT. Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden. Bei Berührung mit Haut und Augen sofort mit viel Wasser nachwaschen.

4. Proben und alle möglicherweise kontaminierten Materialien sowie flüssige infektiöse Abfälle sind gemäß allgemein anerkannter Labortechniken zu dekontaminieren, z.B. durch ein mindestens 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C bei feuchter Hitze. Zur Entsorgung flüssiger Abfälle können diese z.B. mit Natriumhypochlorit in einem Volumenverhältnis gemischt werden, so dass das Endgemisch 1% Natriumhypochlorit enthält. Zur vollständigen Desinfektion 30 Minuten einwirken lassen.

5. Bitte beachten Sie die Angaben in den Sicherheitsdatenblättern über mögliche Gefahren, Erste-Hilfe-Maßnahmen, Maßnahmen bei unbeabsichtigter Freisetzung von größeren Mengen, Handhabung und Lagerung, persönliche Schutzausrüstung, Hinweise zur Entsorgung sowie Angaben zur Toxikologie.

5. **Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnung:** Bei 2-8°C ca. 2 Wochen haltbar. Bei längerer Aufbewahrung kann die Gebrauchsverdünnung aliquotiert bei -20°C eingefroren werden.

6. **Proben-/Waschpuffersalz:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum.

7. **Chromogen/Substratlösung:** Bei 2-8°C haltbar bis zum Verfallsdatum. Vor Lichteinfall schützen!

## Treponema+VDRL ViraBlot® IgM Test Kit

- 7 -

**Hinweise zum Probenmaterial**

1. Der **Treponema+VDRL ViraBlot® IgM Test Kit** ist mit Serum oder Liquor als Probenmaterial durchzuführen.
2. Es sind nur klare, nicht-hämolytierte und nicht mikrobiell kontaminierte Proben zu verwenden.
3. Proben, die mit Hitze vorbehandelt wurden, hämolytisch, ikterisch oder lipämisch sind, können zu falschen Ergebnissen führen.

**Einschränkungen des Verfahrens**

1. Um ein exaktes Testergebnis zu erhalten, müssen die Gebrauchsanweisung und „Good Laboratory Practice“ genau eingehalten werden.
2. Ein positives Testergebnis wird aufgrund erhöhter spezifischer Antikörpertiter erreicht und ist wie ein Symptom zu werten. Der Rückschluss auf eine Infektion ist nur bedingt möglich.
3. Ein negatives Testergebnis schließt einen Erregerkontakt bzw. eine Infektion nicht aus.
4. Dieser Test ist nur durchzuführen von Fachpersonal, das bezüglich des Testverfahrens geschult wurde.
5. Der Nachweis von spezifischen Antikörpern kann bei Untersuchungen









4. In der Regel können unverdünnte Proben bis zu 5 Tage bei 2-8°C aufbewahrt werden. Für eine längere Lagerung sind die Proben in Aliquots bei -20°C (oder kälter) einzufrieren.
5. Vor Beginn der Testdurchführung sollten die Proben auf Raumtemperatur gebracht werden. Proben nach dem Auftauen vorsichtig mischen und bei Bedarf sichtbare Partikel durch Zentrifugation entfernen.
6. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

- mit verschiedenen Testen bzw. von verschiedenen Herstellern aufgrund von unterschiedlichen Sensitivitäten, Spezifitäten und Testmethoden zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.
6. Teststreifen mit extrem starkem Hintergrund sind nicht auszuwerten, vor allem wenn Banden heller als der Hintergrund erscheinen.
  7. *In vitro*-Diagnostika dürfen nicht über das angegebene Verfallsdatum hinaus verwendet werden, da zuverlässige Ergebnisse dann nicht mehr gewährleistet sind.
  8. Gründliches Waschen ist essentiell für exakte Testergebnisse. Ungeügendes Waschen kann falsche Ergebnisse verursachen.

**Literatur**

1. BYRNE, R. et al.: Evaluation of a Treponema pallidum immunoblot assay as a confirmatory test for syphilis. J. Clin. Microbiol 30: 115-122 (1992)
2. NORRIS, S. and the Treponema pallidum Polypeptide Research Group: Polypeptides of Treponema pallidum: progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. Microbiol. Rev. 57: 750-779 (1993)
3. MÜLLER, F.: Lab. Med., 7: 12-16
4. MÜLLER, F.: MTA 1, 86-93 (1986)
5. HAGEDORN, H. J.: wissenschaftliches Gutachten zum Treponema+VDRL ViraBlot® (2003)
6. ABEL, U.: Die Bewertung diagnostischer Tests, S 7, Hippokrates Verlag, Stuttgart (1993)
7. THOMAS, L.: Labor und Diagnose, Med. Verlagsgesellschaft Marburg (2008)
8. MATTHEWS, H. M. et al.: Unique lipid composition of Treponema pallidum. Infect. Immun. 24: 713-719 (1979)
9. JANDA, W. M.: Immunology p. 9.7.1 - 9.7.20 In H.D. Isenberg (ed), Clinical microbiology procedures handbook, vol 2. American Society for Microbiology, Washington, D.C (1994)
10. HAGEDORN, H. J.: MIQ 16-2001, Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. Syphilis, Urban&Fischer, München, Jena (2001)
11. RILI-BÄK: Bäk-Richtlinie zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen, (01.04.2008), [www.bundesaeztekammer.de](http://www.bundesaeztekammer.de)
12. BURKHARDT, F.: Mikrobiologische Diagnostik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (2009)

**Symbolerklärungen**

	Hersteller	<b>REF</b>	Bestellnummer
	Gebrauchsanweisung beachten		Verwendbar bis / Mindesthaltbarkeitsdatum
<b>IVD</b>	<i>In-Vitro</i> Diagnostikum		Temperaturbegrenzung (Lagerung)
<b>LOT</b>	Testkit-Chargen-Nummer	<b>CONTROL+</b>	Positive Serumkontrolle
	Ausreichend für 50 Ansätze	<b>CONTROL-</b>	Negative Serumkontrolle
	Raumtemperatur in °C	<b>CONTROL</b>	Kontrolle
	Bearbeiter	<b>DATE</b>	Datum
<b>#</b>	Probennummer	 <b>SUBSTRATE</b>	Chromogen/Substratentwicklungszeit in Minuten
<b>PROTOCOL</b>	Auswerteprotokoll	<b>No</b>	Protokollnummer

**Patente:** US 7,691,581 B2 und EP 1,556,697 B1