

# MASTABLOT™ TP

Immunoblot zum Nachweis von humaner IgG- bzw. IgM-Antikörpern gegen *Treponema pallidum* in Serum oder Plasma

Immunoblot assay for the detection of IgG or IgM antibodies to *Treponema pallidum* in human serum and plasma

Immunoblot pour la détection des IgG ou IgM anti-*Treponema pallidum* dans le sérum ou le plasma humain

**Nur zur *in-vitro* Diagnostik**

**For *in vitro* diagnostic use only**

**Usage *in vitro* uniquement**



Deutsch:

Seiten 03–05



English:

Pages 06–08



Français

Pages 09–11

MASTABLOT™ TP IgG

REF 6653G08

8 Tests

MASTABLOT™ TP IgM






REF 6653M08

8 Tests

## Erläuterungen zu den auf den Etiketten verwendeten graphischen Symbolen /

## Explanations of abbreviations and icons used on labels /

## Explications des abréviations et des icônes utilisées sur les étiquettes:

<b>STRIPS</b>	Nitrocellulosestreifen	Nitrocellulose strips	Bandelettes
<b>DIL</b>	Probendiluent	Sample diluent	Diluant d' échantillon
<b>CONJ</b>	Konjugat (AP markiert)	Conjugate (AP labelled)	AP Conjugué
<b>SUBS</b>	BCIP / NBT Substrat	BCIP / NBT substrate	BCIP / NBT substrat
<b>WASH CONC</b>	Waschpuffer, konzentriert	Wash buffer, concentrated	Solution de lavage
<b>LOT</b>	Charge	Batch	Lot
<b>REF</b>	Bestellnummer	Order code	Référence
<b>RTU</b>	Gebrauchsfertig	Ready to use	Prêt à l'emploi
	Gebrauchsinformation beachten	Read instructions for use	Lire la notice d'utilisation
	Wichtige Hinweise beachten	Important notes	Remarque importante Re- marque importance
	Verfallsdatum	Expiry Date	Date de péremption Date de péremption
	Lagerung bei	Storage	Conservation Conservation
	Reagenzien nicht zur Wiederbenutzung geeignet	Reagents not reusable	Ne pas réutiliser les réactifs

## Einführung

Die Syphilis ist eine hoch ansteckende sexuell übertragbare Erkrankung, die durch die Spirochäte *Treponema pallidum* ausgelöst wird. Nach der Infektion tritt eine Läsion auf, der sog. Primäraffekt oder Schanker, der die Eintrittsstelle des Erregers markiert. Die Syphilis ist von Anfang an eine systemische Erkrankung, die im nicht behandelten Fall Jahrzehnte andauern kann.<sup>1</sup>

Zu den pathogenen Treponemen werden neben *T.pallidum*, *T.pertenue* der Erreger der Frambösie und *T.carateum* der Erreger der Pinta gezählt. Im EU-Raum ist vorwiegend *T.pallidum* der klinisch relevante Erreger. Jedoch gibt es eine Reihe von Kommensalen der Spezies *T.pallidum*, die differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden müssen, bevor man die Diagnose einer Primärsyphilis stellen sollte.

Die Kommensalen der Syphilis-Spirochäte lassen sich im Gegensatz zu dieser erfolgreich in entsprechenden Kulturmedien vermehren. Die *in-vitro* Kultur von *T.pallidum* verlief bislang noch nicht erfolgreich.

Die klinische Diagnose der Syphilis muss durch Labordaten bestätigt werden, entweder durch den direkten Nachweis der *T.pallidum*-Spirochäte aus Exudat von Läsionen oder durch den Nachweis von Serumantikörpern, die gegen den Erreger gerichtet sind. Man kann die Methoden, die die Antikörperantwort gegen die Treponemeninfektion bestimmen, grob in zwei Kategorien unterteilen:<sup>2</sup>

1. Tests, mit denen Antikörper gegen unspezifische Treponemen-Antigene bestimmt werden, z. B. gegen Cardiolipin oder lipoidale Antigene. Diese Tests werden unter der Bezeichnung „Reagin-Tests“ zusammengefasst.
2. Tests zur Bestimmung von Antikörpern gegen pathogene Treponema-Antigene, wie z. B. im Partikelagglutinationstest (TPPA), im Fluoreszenz-Treponema-Antikörper Absorptionstest (FTA-ABS) oder mittels Immunoblot.

Der Immunoblot ist durch den selektiven Auftrag hoch spezifischer und sensitiver *T.pallidum*-Antigene in allen Stadien der Syphilisinfektion ein geeigneter diagnostischer Nachweis. Der Test wird neben dem FTA-ABS-Test als Referenztest anerkannt und routinemäßig zur Bestätigung eines positiven Suchtests oder einer Syphilisinfektion verwendet.

## Verwendungszweck

Der MASTABLOT™ TP ist ein indirekter Immunoblot zum Nachweis spezifischer IgG- bzw. IgM-Antikörper gegen *T.pallidum*-Antigene.

## Testprinzip

Spezifische *T.pallidum* Antigene werden an definierten Positionen auf einem Nitrocellulosestreifen aufgetragen. Das Probenmaterial (Serum, Plasma) wird mit Serumdiluent verdünnt und zusammen mit den Nitrocellulosestreifen in einer geeigneten Inkubationswanne inkubiert. Spezifische Antikörper im Probenmaterial binden an die *T.pallidum* Antigene auf den Testfeldern und bilden mit diesen einen stabilen Antigen-Antikörper-Komplex. Unspezifisch gebundene oder nicht gebundene Antikörper werden in einem Waschschrift entfernt. An die spezifischen Komplexe binden dann mit alkalischer Phosphatase-gekoppelte Anti-human-IgG- bzw. Anti-human-IgM-Antikörper.

Unspezifische oder nicht gebundene Reaktionskomponenten werden wiederum durch einen Waschschrift entfernt. Durch Zugabe des präzipitierenden Substrats BCIP/NBT entsteht an solchen Antigenbanden, an die Serumantikörper gebunden haben, eine dunkel-violette Färbung. Die Intensität der Farbreaktion korreliert mit der Antikörperkonzentration in der Probe.

## Packungsinhalt

- 8 Nitrocellulose-Streifen**, beschichtet mit rekombinanten *T.pallidum* Antigenen (p15, p17, Tmp A, p47); die Tests sind je nach Kennzeichnung spezifisch für die IgG- bzw. IgM-Bestimmung.
- 15 mL Probenverdünnungspuffer**  
Grün gefärbte Lösung, gebrauchsfertig, das Diluent enthält Proclin als Konservierungsmittel.
- 13 mL Konjugat**  
Je nach Kit-Spezifikation anti-human-IgG, H+L-Kette (Ziege) mit alkalischer Phosphatase markiert.  
Anti-human-IgM,  $\mu$ -Kette (Ziege) mit alkalischer Phosphatase markiert.  
Rot gefärbte Lösung, gebrauchsfertig.  
Das Konjugat enthält 0,02 % Methylisothiazolon und 0,02 % Brom-Nitro-Dioxan als Konservierungsmittel.
- 13 mL Substrat**  
BCIP/NBT, gebrauchsfertig
- 15 mL Waschpufferkonzentrat** (10x)  
Der Puffer enthält Proclin als Konservierungsmittel.
- 1 Inkubationswanne**
- 1 Auswerte- / Dokumentationsblatt**
- 1 Gebrauchsinformation**

## Zusätzlich benötigte Materialien

1. Sterile Reaktionsgefäße
2. Mikropipetten und dazu passende Spitzen
3. Messkolben oder Messbecher
4. Destilliertes oder deionisiertes Wasser
5. Pinzette
6. (Taumel-) Schüttler
7. ggf. Spritzflasche (Wasch- bzw. Pufferflasche)

## Haltbarkeit und Lagerung

Der MASTABLOT™ TP kann ab Herstellung bis zu dem auf der Packung genannten Haltbarkeitsdatum verwendet werden, wenn er bei 2–8 °C aufbewahrt wird. Vor Gebrauch sind alle Reagenzien auf Raumtemperatur zu bringen.

Der Waschpuffer ist in der Gebrauchsverdünnung 30 Tage stabil, wenn er bei 2–8 °C aufbewahrt wird.

Proben (Serum, Plasma) können 3 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Für eine längere Aufbewahrung sollten sie bei -20 °C eingefroren werden. Allerdings sollten wiederholte Einfrier-/ Auftauzyklen vermieden werden.

## Warnhinweise

1. Das Kit dient nur zur *in-vitro*-Diagnostik.
2. Vor der Testdurchführung sorgfältig die Gebrauchsinformation lesen. Die Testdurchführung nicht ohne Validierung modifizieren.
3. Keine Reagenzien nach dem Verfallsdatum verwenden.
4. Die allgemeinen Arbeitsschutzrichtlinien für das Arbeiten mit potentiell infektiösen Materialien einhalten. Es wird empfohlen, entsprechende Schutzkleidung zu tragen. Den Test immer in geeigneten Laborräumen abarbeiten.
5. Nicht mit dem Mund pipettieren.
6. Wenn möglich sollten Einmalspitzen und Einmalreaktionsgefäße verwendet werden. Es dürfen nur gereinigte Laborgläser verwendet werden, die nach dem Spülen mit demineralisiertem oder destilliertem Wasser abgespült wurden.
7. Nur Wasser von hoher Qualität für die Verdünnung des Waschpuffer-Konzentrats verwenden (destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität).
8. Keine Reagenzien unterschiedlicher Chargen mischen.
9. Eine Kontamination der Reagenzien vermeiden; die Flaschen immer wieder mit den richtigen Deckeln verschließen. Zum Pipettieren immer eine neue Pipettenspitze für jeden Arbeitsschritt verwenden.
10. Ein Austrocknen der Nitrocellulosestreifen während der Testdurchführung vermeiden.
11. Die Reaktionsansätze nicht direktem Sonnenlicht oder anderen vergleichbar extremen Bedingungen aussetzen.
12. Probenmaterialien und Einmalartikel, die mit dem Probenmaterial in Kontakt gekommen sind, entsprechend gängiger Vorschriften zur Entsorgung potentiell infektiösen Materials vernichten. Arbeitsflächen mit einem geeigneten Flächendesinfektionsmittel gemäß der Anwendungsvorschrift dekontaminieren. Glasgefäße o. ä. können bei 121 °C autoklaviert werden.
13. Seren, die erkenntlich mikrobiologisch kontaminiert sind, nicht verwenden.
14. Hämolytische oder lipämische Seren können bei 56 °C inaktiviert werden.
15. Einige Reagenzien enthalten Proclin als Konservierungsmittel. Diese Reagenzien reagieren bei Inkorporation toxisch.

## Testdurchführung

1. Optional: Seren vor dem Testansatz 30 min bei 56 °C inaktivieren. Keine Plasmen inaktivieren
2. Vor dem Testansatz alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen (mindestens 20 °C).
3. Den Waschpuffer 1:10 mit dest. Wasser in einem Messkolben verdünnen.  
  
Beispiel: 25 mL Puffer mit dest. Wasser auf 250 mL auffüllen.
4. **Wichtig:** für den IgG-Nachweis nur die spezifischen IgG-Streifen, für den IgM-Nachweis die entsprechend gekennzeichneten IgM-Streifen verwenden!

Die Nitrocellulosestreifen müssen vor der Testdurchführung mit Serumdiluent angefeuchtet werden. Dazu die Streifen mit der Beschriftung nach oben in die Inkubationswannen legen.

Zu den Nitrocellulosestreifen 1,5 mL Serumdiluent pipettieren und die Inkubationswanne 10 min ( $\pm$  2 min) auf dem Schüttler bei niedriger Geschwindigkeit schütteln. Darauf achten, dass das Diluent die Streifen vollständig überschichtet.

5. Für die Seruminkubation wird das Probenmaterial zu dem Diluent und den Nitrocellulosestreifen direkt in die Inkubationswannen pipettiert

## IgG Bestimmung

**Probenvolumen für den IgG-Nachweis: 15  $\mu$ L**, entspricht einer 1:100 Verdünnung

- a. **IgG-Ansätze 60 min** bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubieren.
- b. Nach der Seruminkubation die Pufferlösung aus den Inkubationswannen mit einer Pipette / Wasserstrahlpumpe absaugen, oder den Puffer vorsichtig abgießen.  
  
Danach sofort 1,5 mL Waschpuffer zupipettieren und die Streifen 5 min auf dem Schüttler schütteln. Den Waschschrift 2-3 mal wiederholen.
- c. Zu den Streifen 1,5 mL Konjugat IgG-Konjugat zupipettieren  
  
Darauf achten, dass das Konjugat die Streifen vollständig überschichtet.
- d. **Ansätze 60 min** bei Raumtemperatur auf dem Schüttler schütteln.
- e. Die Streifen wie unter Punkt b. (IgG Bestimmung) beschrieben waschen.
- f. Zu den Streifen 1,5 mL BCIP/NBT-Substrat pipettieren  
  
Die Streifen 5-8 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler schütteln.  
  
Die Substratreaktion kann jederzeit durch mehrfache Zugabe von Leitungswasser gestoppt werden. Es empfiehlt sich, die Reaktionen zu stoppen, wenn sich auf dem Hintergrund eine zu starke Farbentwicklung abzeichnet.

## IgM Bestimmung

**Probenvolumen für den IgM-Nachweis: 30  $\mu$ L**, entspricht einer 1:50 Verdünnung

- a. **IgM-Ansätze 120 min** bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubieren
- b. siehe IgG
- c. Zu den Streifen 1,5 mL IgM-Konjugat zupipettieren.  
  
Darauf achten, dass das Konjugat die Streifen vollständig überschichtet.
- d. **Ansätze 60 min** bei Raumtemperatur auf dem Schüttler schütteln
- e. siehe IgG
- f. Zu den Streifen 1,5 mL BCIP/NBT-Substrat pipettieren  
  
Die Streifen 8-10 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler schütteln. Stoppen der Reaktion wie bei IgG.

## Interpretation der Reaktionen

### Validierung des Tests

Alle Streifen haben eine Reaktionskontrolle und eine Serumkontrolle. Die Serumkontrolle ist jeweils spezifisch für den IgG- bzw. IgM-Nachweis.

Ferner tragen die Blotstreifen eine spezifische Cut-off-definierende Bande am unteren Streifenende. Die Cut-off-Bande zeigt eine nur schwache Reaktion.

Die Reaktivität der Kontrollbänder verhält sich wie folgt:

	Erwartetes Ergebnis
Serumkontrolle IgG	1+ bis 2+
Serumkontrolle IgM	1+ bis 2+
Kontrollbände IgG	2+ bis 3+
Cut-off Bande IgG	Schwache Bande (+)
Kontrollbände IgM	2+ bis 3+
Cut-off Bande IgM	Schwache Bande (+)

Bei feuchten Streifen sind die jeweiligen Cut-off-Bänder nur sehr schwach ausgeprägt. Nach dem Trocknen der Streifen werden diese deutlicher und klarer in ihrer Intensität.

Ein Testergebnis kann nur dann als valide betrachtet werden, wenn der Blotstreifen die Serum-, Reaktions- und Cut-off-Kontrolle gemäß der in der Tabelle und dem QC-Zertifikat genannten Intensitäten aufweist.

### Interpretation der Patientenreaktionen

Die Streifen auf dem Protokollbogen aufkleben. Es empfiehlt sich die Streifen im noch feuchten Zustand zur Fixierung auf die Laminierung zu ziehen. Gegebenenfalls die gegenüberliegende Seite mit Tesafilm festkleben.

Die Proben lassen sich erst dann verlässlich auswerten, wenn die Streifen gänzlich trocken sind. Um den Trocknungsvorgang zu beschleunigen, können die Streifen mit einem Föhn oder in einem Trockenschrank getrocknet werden.

### Auswertung für IgG-Tests:

**Positive Proben** müssen mindestens **1 stark reaktive Bande** zeigen, die den Antigenen p15, p17 oder p47 zugeordnet werden kann. Die Reaktivität dieser einzigen Bande muss deutlich über der der Cut-off-Kontrolle liegen.

In den meisten Fällen sind zudem weitere Bänder reaktiv, die der Intensität der Cut-off-Bande entsprechen können, oder deutlich stärker als der Cut-off reagieren.

Die TmpA-Bande kann ein positives Ergebnis belegen, sie ist als einzig reaktive Bande aber nicht relevant für ein positives Ergebnis.

**Negative Proben** zeigen in der Regel keine Reaktivität der Bänder p15, p17, TmpA oder p47 auf, beziehungsweise es reagiert nur 1 dieser Bänder in der Intensität, der Cut-off-Bande.

### Auswertung für IgM-Tests:

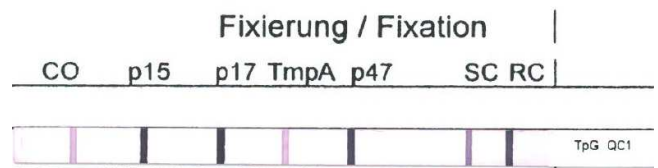
**Positive Proben** müssen mindestens **1 Bande** zeigen, die den Antigenen p15, p17 oder p47 zugeordnet werden kann. Die Intensität der Bande muss mindestens der der Cut-off-Bande entsprechen oder stärker sein.

Die TmpA-Bande kann ein positives Ergebnis belegen, sie ist als einzig sichtbare Bande aber nicht relevant für ein positives Ergebnis.

**Negative Proben** zeigen in der Regel keine Reaktivität der Bänder p15, p17, TmpA oder p47 auf, beziehungsweise liegt die Intensität der Antigene unter der der Cut-off-Bande.

### Beispiel eines IgG-Blots

Abkürzungen: CO = cut-off, SC = Serumkontrolle, RC = Reaktivkontrolle



### Korrelation der Ergebnisse zum S-TPPA und MASTAFLUOR FTA-ABS

1. Bei Screeningtitern im S-TPPA bis zu 1:160 (in wenigen Fällen auch bis 1:320) können die Bänder im MASTABLOT sehr schwach bis negativ sein. Das Ergebnis ist dann als negativ zu bewerten. Häufig zeigt der FTA-ABS dann auch ein negatives Ergebnis an.
2. Sehr schwache IgM-Reaktionen im Blot zeigen in der Regel auch eine negative oder sehr schwache Reaktion im 19S IgM-FTA-ABS ( $\leq 1:20$ ).

### Grenzen des Nachweisverfahrens

1. Theoretisch kann ein falsch-positives Testergebnis auftreten. Dies kann insbesondere bei einigen Schwangeren, bei Lepra und beim Systemischen Lupus erythematodes auftreten.
2. Der MASTABLOT TP ist hoch-sensitiv und hoch-spezifisch. **Dennoch sollte auch dieser Test, wie auch jeder andere Labortest, nicht allein zur Festlegung der Diagnose verwendet werden, sondern immer in Verbindung mit anderen Testverfahren, der Anamnese und dem klinischen Bild des Patienten.**

### Literatur

1. Robert-Koch-Institut: [www.rki.de](http://www.rki.de)
2. U.S. Food and Drug Administration: [www.fda.gov](http://www.fda.gov)
3. World Health Organization: [www.who.int/en](http://www.who.int/en)
4. Centers of Disease Control and Prevention: [www.cdc.org](http://www.cdc.org)
5. Thomas L., Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, 6. Auflage, 2005

## Introduction

Syphilis is a highly infectious sexually transmitted disease caused by the spirochaete, *Treponema pallidum*. After infection, a primary lesion or chancre appears on the genitalia at the site of entry of the infecting organism. The disease is systemic from the onset and the course of an untreated case of syphilis can span decades.<sup>1</sup>

Pathogenic treponemas include *T. pallidum*, the cause of syphilis, *T. pertenue*, the cause of yaws and *T. carateum*, the cause of pinta. The only treponeme of importance in Europe is *T. pallidum*. In addition many commensal species of treponemes exist and it is important to differentiate these from *T. pallidum* before a diagnosis of primary syphilis is given.

Commensal treponemas can be cultured in artificial media whereas attempts to culture pathogenic treponemas *in vitro* failed.

The clinical diagnosis of syphilis is confirmed in the laboratory by either demonstrating the presence of *T. pallidum* in the exudates from the lesions, or demonstrating the presence of serum antibodies against the organism. Methods used to measure antibody response to treponemal infection can be divided into two major categories:

1. Tests to measure antibodies against non-specific treponemal antigens i.e. cardiolipin or lipoidal antigen tests. These were formerly called 'Reagin' tests.
2. Tests to measure antibodies against antigens specific for pathogenic treponemas i.e. *T. pallidum* particle agglutination assay (TPPA), the fluorescent treponemal antibody absorbance test (FTA-ABS) or the immuno line / dot blots.

The immuno blot is characterised by the recombinant antigens p15, p17, TmpA and p47, which are highly specific and sensitive for a syphilitic infection. *T. pallidum* blot assays are an accepted reference method as a confirmatory test for diagnosis of syphilis infection.

## Description

MASTABLOT TP is an indirect immunoblot for the detection of IgG and IgM antibodies, respectively, in human serum or plasma. Antibodies bind to purified immobilised antigens which are highly specific for a *T. pallidum* infection.

## Test Principle

Antigens specific for *T. pallidum* are coated onto nitrocellulose strips at defined positions. Each strip contains a cut-off control and one reaction control. Patient serum or plasma specimens are applied together with the strips in the incubation chamber and incubated. If specific antibodies are present in the serum / plasma they will bind to the fixed antigens on the strips forming a stable antigen-antibody complex. Strips are then washed to remove any unbound materials and complexed antibodies are detected by the addition of an alkaline phosphatase labelled anti-human immunoglobulin conjugate. After a further washing step to remove any unbound conjugate, strips are incubated with BCIP/NBT substrate to form a visible dark bluish precipitate. Adding water to this substrate reaction will stop the formation of the precipitating colour.

## Packaging and Ordering Details

MASTABLOT™ TP is presented as complete kits for the performance of 8 tests. Kits are available for the IgG and IgM antibody determination.

### Contents of the kit

- 8 Nitrocellulose strips** coated with recombinant *T. pallidum* antigens (p15, p17, TmpA, p47); depending on the intended use of the kit the strips are specific for IgG or IgM detection.
- 15 mL Sample diluent**  
Green coloured solution, ready to use; contains proclin for conservation.
- 13 mL Conjugate, according to kit specification:**  
Anti-human-IgG H+L chain (goat), labelled with alkaline Phosphatase.  
Anti-human-IgM  $\mu$ -chain (goat) labelled with alkaline Phosphatase.  
Red coloured solution, ready for use.  
The buffer contains 0,02 % methylisothiazolone and 0,02 % bromnitrodioxane.
- 13 mL Chromogenic substrate**  
BCIP/NBT solution, ready to use.
- 15 mL Wash buffer**, 10x concentrated  
The buffer contains proclin for conservation.
- 1 Incubation chamber**
- 1 Interpretation / documentation sheet**
- 1 Instruction leaflet**

### Materials Required but not Provided

1. Sterile test tubes.
2. Micropipettes and tips.
3. Distilled water or water of higher quality.
4. Volumetric flask for dilution of wash buffer concentrate.
5. Forceps.
6. Shaker.
7. Wash bottle.

### Stability and Storage

MASTABLOT™ TP can be used until end of expiry date as indicated on kit label.

All kits components and reagents should be stored at 2–8 °C and brought to room temperature before use.

Diluted wash buffer should be stored at 2–8 °C for up to 30 days.

Serum / plasma specimens may be stored at 2–8 °C for up to 3 days prior to use or for longer storage at -20 °C. Repeated freezing and thawing of specimens should be avoided.

## Warnings and Precautions

1. The reagents supplied in this kit are for *in vitro* diagnostic use only.
2. Read instructions carefully before conducting the assay. Do not modify the procedure.
3. Do not use kit beyond the expiry date.
4. Wear appropriate protective clothing and use appropriate facilities.
5. Do not mouth pipette.
6. Use disposable plastic ware where ever possible. Reusable glassware should be washed thoroughly and rinsed free of detergents before use.
7. Use distilled water or water of higher quality.
8. Do not mix reagents between different lots, as reagents have been calibrated for each batch.
9. Do not cross-contaminate reagents or interchange caps on bottles. Use a separate pipette or pipette tips for each sample and reagent.
10. Do not allow nitrocellulose strips to dry out during the assay procedures.
11. Do not expose slides to intense sunlight or similar adverse conditions while incubating.
12. Contaminated plastic ware should be disposed of and incinerated. Contaminated glassware should either be autoclaved at 121 °C for 1 hour or decontaminated with a solution of 2.5 % sodium hypochlorite. All liquid waste should be decontaminated appropriately e.g. using sodium hypochlorite.
13. Microbial contaminated serum samples should not be used.
14. In the event that haemolysed or lipaemic serum must be used, heat inactive at 56 °C before use.
15. Some reagents contain Proclin as a conservative. Proclin may be toxic if incorporated.

## Test Procedure

1. Optional: Inactivate all sera by heating for 30 min at 56 °C. Do not inactivate plasma.
2. Allow all materials to reach room temperature (at least 20 °C) prior to use.
3. Dilute the wash buffer concentrate 1:10 with distilled water:  
Example:  
25 mL wash buffer + 225 mL of distilled water
4. Important note: Always use the IgG labelled strips for IgG determinations, and IgM-labelled strips for the IgM determinations.  
  
Only touch the strips at the label end. Always use clean disposable gloves when touching the nitrocellulose strips! Alternatively use forceps for touching strips.  
  
Strips must be soaked in the incubation chamber with serum diluent before use. The nitrocellulose side of the strips with the label on top should be upward. For soaking add 1.5 mL of serum diluent to the strip in the incubation chamber. Incubate the strips with the diluent for 10 min ± 2 min.
5. For serum incubation directly add the specimen to the diluent into the incubation chamber.

## Identification of IgG

Sample dilution for **IgG 1:100**

Add 15 µL of serum / plasma to the diluent

- a. **Incubate IgG assays for 60 min** at room temperature on a shaker.
- b. Carefully discard the serum diluent solutions of each incubation chamber. The use of appropriate pipettes or a vacuum pump is helpful.  
  
Immediately add 1.5 mL of 1x wash buffer to each strip. Gently shake for 5 min, discard the wash buffer then repeat the washing step 2–3 times.
- c. After the washing step add 1.5 mL of IgG conjugate to each strip.  
  
The conjugate should cover the strips completely.
- d. Incubate the **assay 60 min** while gently shaking.
- e. After the conjugate reaction wash the strips as described in step b. (Identification of IgG).
- f. Add 1.5 mL of BCIP/NBT substrate solution to each strip.  
  
Gently shake the IgG reactions for 5–8 min at room temperature.  
  
The substrate reaction can be stopped at any time by repeatedly adding tap water or distilled water. It is recommended to stop the reaction immediately after a bluish background colour starts to develop heavily.

## Identification of IgM

Sample dilution for **IgM 1:50**

Add 30 µL of serum / plasma to the diluent

- a. **Incubate IgM assays for 120 min** at room temperature on a shaker.
- b. Carefully discard the serum diluent solutions of each incubation chamber. The use of appropriate pipettes or a vacuum pump is helpful.  
  
Immediately add 1.5 mL of 1x wash buffer to each strip. Gently shake for 5 min, discard the wash buffer then repeat the washing step 2–3 times.
- c. After the washing step add 1.5 mL of IgM conjugate to each strip.  
  
The conjugate should cover the strips completely.
- d. Incubate the **assay 60 min** while gently shaking.
- e. After the conjugate reaction wash the strips as described in step b. (Identification of IgM).
- f. Add 1.5 mL of BCIP/NBT substrate solution to each strip.  
  
Gently shake the IgM reactions for 8-10 min at room temperature.  
  
The substrate reaction can be stopped at any time by repeatedly adding tap water or distilled water. It is recommended to stop the reaction immediately after a bluish background colour starts to develop heavily.

## Interpretation of Results

### 1. Test Validation

A reaction control band as well as a serum control band are coated onto each strip. The reaction control band must show a clear intense signal.

Each strip is coated with a specific cut-off defining control band, too, which is at the lower end of the strip.

The cut-off band is of low reactivity in both IgG and IgM assay versions.

Control band reactivities shall be as follows:

	Expected Result
Serum control band IgG	1+ to 2+ intensity
Serum control band IgM	1+ to 2+ intensity
Reaction control band IgG	2+ to 3+ intensity
Cut-off band IgG	Weak intensity (+)
Reaction control band IgM	2+ to 3+ intensity
Cut-off band IgM	Weak intensity (+)

As long as strips have not dried completely cut-off bands appear to be very weak. With drying the intensity of the cut-off band increases and is best after strips are completely dried through.

A result is only valid if the serum, reaction and cut-off bands are visible. The intensity of each band should be within the specifications listed in the table above or QC document.

### Interpretation of Specimen Results

It is advisable to remove the strips while still wet to fix them onto the lamination. If necessary, apply clear tape over the labeled end to ensure adhesion to the page.

After completely drying the band on the strips can be easily read and interpreted. Drying can be fastened by using a hairdryer or a placing the strips into a drying incubator.

### IgG positive reactivity

**IgG positive** specimens must show at least **1 strong reactive antigen band**, which should belong to one of the antigen specificities: p15, p17, or p47, respectively. The intensity of that strongly reacting band must be far beyond the strength of the cut-off control band.

In most cases further bands are visible, too. These bands must have an intensity equal to or greater than the cut-off band.

The TmpA band may confirm a positive result. However, a TmpA band on its own is not sufficient to be considered a positive result.

Blots with **negative specimens** do not show any reactive antigen bands of the p15, p17, TmpA and p47 specificity. Strips with just 1 single band in the intensity of the cut-off band are considered as positive.

### IgM positive reactivities

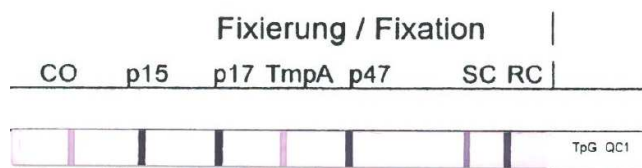
**IgM positive** specimens must show at least **1 band** of either the p15, p17 or p47 antigen specificity. The intensity of the band must be equal to or greater than the cut-off control.

The TmpA band may confirm a positive result. However, a TmpA band on its own is not sufficient to be considered a positive result.

Blots with **negative specimens** do not show any reactive antigen bands of the p15, p17, TmpA and p47 specificity. Any antigen band reactivity less than the cut-off band must be read as negative.

### IgG-Blot example

abbreviation: CO = cut-off, SC = Serum control, RC = reactive control



### Correlation of SERODIA TPPA, MASTAFLUOR FTA-ABS and MASTABLOT TP results

1. Weak antigen bands on MASTABLOT TP may occur with samples showing S-TPPA titres of 1:160 and in some case even 1:320. Some of such samples may even give a negative result in MASTABLOT TP. Those samples are negative in an FTA-ABS assay as well.
2. Low reactivity in MASTABLOT IgM does correlate with low reactivity in 19S IgM FTA-ABS (titre ≤ 1:20).

### Limitations

1. The MASTABLOT TP test may occasionally give a false positive result under certain patient conditions or diseases e.g. pregnancy, leprosy and systemic lupus erythematosus.
2. The MASTABLOT test has been demonstrated to be highly sensitive and specific, however results should be considered along with all serological tests, clinical history and other aspects of patient management to be considered diagnostically significant.

### References

1. Robert-Koch-Institut: [www.rki.de](http://www.rki.de)
2. U.S. Food and Drug Administration: [www.fda.gov](http://www.fda.gov)
3. World Health Organization: [www.who.int/en](http://www.who.int/en)
4. Centers of Disease Control and Prevention: [www.cdc.org](http://www.cdc.org)
5. Thomas L., Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, 6. Auflage, 2005



## Introduction

La syphilis est une maladie sexuellement transmissible causée par le spirochète *Treponema pallidum*. L'apparition d'une lésion primaire ou d'un chancre sur les organes génitaux est caractéristique d'une infection par ce microorganisme. La maladie est systémique dès le début de l'infection et au cours de plusieurs décennies chez les patients non traités [1].

Les tréponèmes pathogènes comprennent ; *T. pallidum*, l'agent responsable de la syphilis, *T. pertenue*, l'agent responsable du Pian et *T. carateum*, agent responsable du Pinta. Il existe plusieurs espèces de tréponèmes c'est pourquoi il est important de les différencier de *T. pallidum* avant de faire le diagnostic de la syphilis.

Les tréponèmes commensaux peuvent être cultivés sur milieu artificiel contrairement aux tréponèmes pathogènes où les essais *in vitro* ont toujours échoué.

Le diagnostic clinique de la syphilis est confirmé en laboratoire soit par la mise en évidence *T. pallidum* à partir des écoulements des lésions soit la mise en évidence d'anticorps dans le sérum dirigés contre le micro-organisme. Les méthodes utilisées pour doser les anticorps se répartissent en 2 groupes [2] :

1- le dosage des anticorps dirigés contre les antigènes non spécifiques du tréponème, par exemple les tests cardiolipine ou lipoïde. Ce sont les tests de "réagine".

2- le dosage des anticorps dirigés contre les antigènes spécifiques du tréponème pathogène ; le test d'agglutination (TPHA) et le test de fluorescence absorbée (FTA-ABS).

L'immunoblot est caractérisé par les antigènes recombinants p15, p17, TmpA et p47 très sensibles et spécifiques d'une infection à syphilis. L'immunoblot pour *T. pallidum* est considéré comme test de référence pour la confirmation du diagnostic d'une infection à syphilis.

## Description

MASTABLOT TP est un test d'immunoblot indirect pour la détection des anticorps IgG et IgM, dans le sérum humain ou le plasma. Les anticorps se lient aux antigènes purifiés très spécifiques d'une infection à *T. pallidum*.

## Principe

Les antigènes spécifiques de *T. pallidum* sont fixés sur des zones spécifiques de la bandelette de nitrocellulose. Chaque bandelette contient un contrôle seuil et un contrôle de la réaction. Le sérum ou le plasma du patient est appliqué à la bandelette qui est ensuite incubée. Si des anticorps spécifiques sont présents dans le sérum ou le plasma ils se lient pour former un complexe antigène-anticorps. Les bandelettes sont ensuite lavées pour éliminer le matériel en excès. Les complexes formés sont liés au conjugué couple à la phosphatase alcaline. Après plusieurs lavages pour éliminer le conjugué en excès les bandelettes sont incubées avec le substrat BCIP/NBT pour donner un précipité noir bleuâtre. La réaction est stoppée par ajout d'eau sur les bandelettes.

## Présentation

MASTABLOT™ TP est un coffret complet pour 8 tests, pour la détection des IgG et des IgM.

## Composition des coffrets 8 tests

**8 Bandelettes de Nitrocellulose** coatées avec les antigènes recombinant de *T. pallidum* (p15, p17, TmpA, p47); et spécifiques des IgG ou des IgM en fonction du coffret.

**15 mL Diluant d'échantillon**, solution verte prête à l'emploi avec du Proclin comme conservateur.

**13 mL Conjugué IgG ou IgM selon le coffret:**

Anti-IgG humaine chaîne H+L (chèvre), couplée à la phosphatase alcaline.

Anti-IgM humaine chaîne  $\mu$  (chèvre), couplée à la phosphatase alcaline.

Solution de couleur rouge, prête à l'emploi.

Le tampon contient 0,02 % méthylisothiazolone et 0,02 % bromonitrodioxane.

**13 mL Substrat chromogène**

Solution BCIP/NBT prête à l'emploi.

**15 mL Tampon de lavage, 10X**

Le tampon contient du Proclin comme conservateur.

**1** Chambre d'incubation

**1** Feuille d'interprétation / Documentation

**1** Notice d'emploi

## Matériels nécessaires non fournis

1. Tubes test stériles.
2. Micropipettes et embouts.
3. Eau distillée ou ultra pure.
4. Eprouvette graduée pour la dilution de la solution de lavage.
5. Pincettes.
6. Agitateur.
7. Flacon de lavage.

## Conservation

MASTABLOT™ TP peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Tous les composants et réactifs du coffret doivent être stockés à 2–8 °C puis ramenés à température ambiante avant utilisation.

Le tampon de lavage dilué peut être stocké à 2–8 °C au maximum pendant 30 jours.

Les échantillons de plasma/ sérum doivent être stockés à 2–8 °C 3 jours au plus avant utilisation ou à -20 °C pour une utilisation prolongée. Congélations et décongélations répétées sont à éviter.

## Précaution d'emploi

1. Les réactifs du coffret sont uniquement à usage de diagnostic *in vitro*.
2. Lire soigneusement la notice d'utilisation avant de commencer le test. Ne pas modifier la procédure.
3. Ne pas utiliser le coffret au-delà de la date de péremption indiquée sur le coffret.

4. Porter des vêtements adaptés à ce type de manipulation et utiliser un équipement de protection approprié.
5. Ne pas pipeter avec la bouche.
6. Utiliser du matériel en plastique dans la mesure du possible. La verrerie doit être lavée soigneusement et rincée sans détergent avant utilisation.
7. Les sérums fournis ont été testés et se sont avérés négatifs pour la présence d'anticorps anti-HIV et d'antigène HBs. Cependant, ils doivent être considérés comme potentiellement dangereux et infectieux. Il est recommandé d'être extrêmement vigilant lors de la manipulation d'échantillon d'origine humaine.
8. Utiliser de l'eau distillée ou de qualité supérieure.
9. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots car les réactifs sont calibrés pour chaque lot.
10. Ne pas intervertir les réactifs ou les bouchons des flacons. Changer de pipettes ou d'embouts entre chaque échantillon.
11. Ne pas laisser sécher les puits entre les différentes étapes.
12. Protéger les lames des rayons du soleil ou de la lumière directe pendant l'incubation.
13. Le matériel en plastique contaminé doit être éliminé par incinération. La verrerie contaminée doit être stérilisée à l'autoclave à 121° C pendant 30 minutes ou décontaminée avec une solution d'eau de Javel à 2,5% (v/v). Les éclaboussures doivent être éliminées à l'aide d'un matériel absorbant et la zone de manipulation désinfectée avec de l'eau de Javel à 5% (v/v). Tous les liquides contaminés doivent être désinfectés de manière appropriée à l'aide d'eau de Javel ou par autoclavage.
14. Éliminer les échantillons de sérums contaminés par des micro-organismes.
15. Chauffer à 56°C pour inactiver les sérums hémolysés ou lipidiques à tester.
16. Certains réactifs contiennent du Proclin comme conservateur pouvant être toxique si ingéré.

#### Procédure

1. Option: Inactiver tous les sérums à 56° C pendant 30 min. Ne désactiver pas le plasma.
2. Ramener tout le matériel à température ambiante (au moins à 20° C).
3. Diluer le tampon concentré 10X au 1:10 dans de l'eau distillée: Exemple: 25 mL tampon de lavage dans 225 mL H<sub>2</sub>O distillée
4. Remarque importante: Toujours utiliser les bandelettes étiquetées IgG pour la recherche des IgG et celles étiquetées IgM pour la recherche des IgM.

Ne toucher les barrettes que par l'extrémité de leur étiquette. Toujours utiliser des gants propres et jetables lors de la saisie des bandelettes de nitrocellulose! Sinon utiliser des pinces pour saisir les bandelettes.

Les bandelettes sont trempées dans le diluant du sérum contenu dans la chambre d'incubation avant utilisation. Le côté de la bandelette contenant la nitrocellulose avec l'étiquette face à soi et en haut. Pour le trempage, ajouter 1,5 mL de diluant de sérum sur la bandelette dans la chambre d'incubation. Incuber les

bandelettes avec le diluant du sérum pendant 10 ± 2 minutes.

5. Pour l'incubation du sérum, ajouter directement le diluant dans la chambre d'incubation.

#### Identification des IgG

Dilution au **1:100** de l'échantillon pour la recherche des **IgG**. Ajouter 15 µL de sérum /plasma dans le diluant.

- a. **Incuber pendant 60 min** à température ambiante sous agitation.
- b. Éliminer le diluant de chaque chambre d'incubation chambre. L'utilisation d'une pipette adaptée ou d'un système d'aspiration est conseillée.  
Ajouter immédiatement 1,5 mL de tampon de lavage sur chaque bandelette. Agiter doucement pendant 5 minutes éliminer le tampon de lavage et répéter cette étape deux à trois fois.
- c. Ajouter ensuite 1,5 mL de conjugué sur chaque bandelette. Le conjugué doit recouvrir entièrement les bandelettes.
- d. Incuber le conjugué **pendant 60 min** sous agitation douce.
- e. Effectuer le lavage comme à l'étape b. (Identification des IgG).
- f. Ajouter 1,5 mL de substrat BCIP/NBT sur chaque bandelette et incuber à température ambiante sous agitation douce pendant 5 à 8 minutes.

La réaction du substrat peut être plusieurs fois stoppée à par ajout d'eau du robinet ou d'eau distillée. Il est recommandé d'arrêter la réaction immédiatement après que le bruit de fond bleuâtre commence à devenir très foncé.

#### Identification des IgM

Dilution au **1:50** de l'échantillon pour la recherche des **IgM**. Ajouter 30 µL de sérum /plasma dans le diluant.

- a. **Incuber pendant 120 min** à température ambiante sous agitation.
- b. Éliminer le diluant de chaque chambre d'incubation chambre. L'utilisation d'une pipette adaptée ou d'un système d'aspiration est conseillée.  
Ajouter immédiatement 1,5 mL de tampon de lavage sur chaque bandelette. Agiter doucement pendant 5 minutes éliminer le tampon de lavage et répéter cette étape deux à trois fois.
- c. Ajouter ensuite 1,5 mL de conjugué sur chaque bandelette. Le conjugué doit recouvrir entièrement les bandelettes.
- d. Incuber le conjugué **pendant 60 min** sous agitation douce.
- e. Effectuer le lavage comme à l'étape b. (Identification des IgM).
- f. Ajouter 1,5 mL de substrat BCIP/NBT sur chaque bandelette et incuber à température ambiante sous agitation douce pendant 8 à 10 minutes.

La réaction du substrat peut être stoppée à tout moment par ajout d'eau du robinet ou d'eau distillée. Il est recommandé d'arrêter la réaction immédiatement après que le bruit de fond bleuâtre commence à devenir très foncé.

## Interprétation

### 1. Validation du test

Une bande de contrôle de la réaction et un sérum de contrôle sont fixés sur chaque bandelette. Le contrôle de la réaction doit donner un signal clair et intense.

Chaque bandelette contient une bande de contrôle spécifique du seuil située à l'extrémité inférieure de celle-ci.

La bande Seuil est de réactivité faible pour les test IgG et IgM.

Les réactions des bandes de contrôle sont définies ci-dessous:

	Résultat attendu
Bande Sérum de contrôle IgG	Intensité 1+ à 2+
Bande Sérum de contrôle IgM	Intensité 1+ à 2+
Bande Contrôle Réaction IgG	Intensité 2+ à 3+
Bande Seuil IgG	Intensité faible (+)
Bande Contrôle Réaction IgM	Intensité 2+ à 3+
Bande Seuil IgM	Intensité faible (+)

Tant que les bandelettes ne sont pas complètement sèches les bandes Seuil apparaissent très faiblement et deviennent intenses dès qu'elles sont complètement sèches.

Le résultat n'est valide que si les bandes du sérum, du seuil et de contrôle de la réaction sont visibles. L'intensité de chaque bande doit être conforme aux spécifications listées dans le tableau ci-dessus ou dans le document de Contrôle de Qualité.

### Interprétation des résultats

Il est conseillé de coller les bandes encore humides de la lamination. Si nécessaire, fixer le côté opposé avec du ruban adhésif.

Après un séchage complet des bandelettes, les bandes peuvent être lues facilement et interprétées. Le séchage peut être accéléré en utilisant un sèche cheveux ou en mettant les bandelettes dans un chambre de séchage.

### Réaction positive en IgG

Les échantillons IgG positifs doivent avoir au moins une bande avec une réaction intense correspondant à un des antigènes spécifiques : p15, p17, ou p47. L'intensité de la bande de l'antigène spécifique doit être nettement supérieure à celle de la bande de contrôle du seuil.

Dans la plupart des cas plusieurs bandes sont visibles. Ces bandes doivent avoir une intensité égale ou supérieure à celle du seuil.

La bande TmpA devrait confirmer un résultat positif. Cependant, une bande TmpA positive seule n'est pas suffisante pour confirmer un résultat positif.

Les blots **d'échantillons négatifs** ne présentent pas de bandes d'antigènes spécifiques p15, p17, TmpA et p47. Les bandelettes avec uniquement une bande d'intensité égale au seuil sont considérées comme positives.

### Réaction positive en IgM

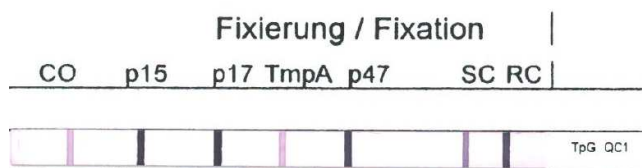
Les échantillons IgM positifs doivent avoir **au moins** une bande avec une réaction intense correspondant à un des antigènes spécifiques: p15, p17, ou p47. L'intensité de la bande de l'antigène spécifique doit être égale ou supérieure à celle de la bande de contrôle du Seuil.

La bande TmpA devrait confirmer un résultat positif. Cependant, une bande TmpA seule n'est pas suffisante pour confirmer un résultat positif.

Les blots **d'échantillons négatifs** ne présentent pas de bandes d'antigènes spécifiques p15, p17, TmpA et p47. Les bandelettes avec uniquement une bande d'intensité inférieure au seuil sont considérées comme négatives.

### Exemple de Blot IgG

Abréviation: CO= Cut-Off (seuil) SC=Sérum de Contrôle RC=Contrôle de la Réaction



### Corrélation des résultats des tests SERODIA TPPA, MASTAFLUOR et MASTABLOT

- Des bandes faibles d'antigène spécifique du MASTABLOT TP peuvent apparaître avec des échantillons ayant des titres en S-TPPA de 1:160 et dans certains cas de 1:320. Certains de ces échantillons peuvent même donner des résultats négatifs en blot MASTABLOT TP. Ces échantillons sont aussi négatifs par la technique d'immunofluorescence FTA-ABS.
- La faible réactivité du MASTABLOT IgM ne corrèle pas avec la faible réactivité de l'IgM 19S de la technique FTA-ABS (titre  $\leq$  1:20).

### Limites

- MASTABLOT TP peut occasionnellement donner des résultats faussement positifs dans certaines conditions ou maladies : grossesse, lèpre et Lupus Erythémateux Disséminé (LED).
- Le test est très sensible et spécifique, cependant les résultats sont à considérer en fonction des autres tests sérologiques, du contexte clinique pour avoir une valeur diagnostique significative.

### Références

- Institut Robert-Koch: [www.rki.de](http://www.rki.de).
- U.S. Food and Drug Administration: [www.fda.gov](http://www.fda.gov).
- Organisation Mondiale de la Santé: [www.who.int/en](http://www.who.int/en).
- Centers of Disease Control and Prevention: [www.cdc.org](http://www.cdc.org).
- Thomas L., Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, 6. Auflage, 2005.

**United Kingdom**

**Mast Group Ltd.  
MAST House Derby Road,  
Bootle, Mersey Side L20 1EA**

**Tel.: +44 151 933 7277  
Fax: +44 151 944 1332  
sales@mastgrp.com**



**Deutschland**

**Mast Diagnostica GmbH  
Feldstraße 20  
D 23858 Reinfeld**

**Tel.: +49 4533 2007-0  
Fax: +49 4533 2007-68  
mast@mast-diagnostica.de**

**France**

**Mast Diagnostic  
115, Rue Jules Barni  
CS 91106  
80011 AMIENS CEDEX 1  
Tel.: + 33 3 22 80 80 67  
Fax: + 33 3 22 80 99 22  
info@mast-diagnostic.fr**

**[www.mastgrp.com](http://www.mastgrp.com)**