

Abschlussbericht

Titel des Projektes: Weiterer Aufbau der Serothek für Antikörper gegen T. pallidum
Charakterisierung von Lipoidantikörpertests
(Fortführung des Projektes aus dem Jahre 2013)

Förderkennzeichen: ZV2.1.1.- 1369 – 370

Fördersumme: 10.200 €

Laufzeit: 1.1.2019 - 31.12.2019

Leitung der Studie: Prof. Dr. med. H.-J. Hagedorn,
Leiter des Konsiliarlabors Treponema
Diagnostik und Therapie
in Kooperation mit
MVZ Labor Krone GbR, Bad Salzuffen

Mitarbeiter im Projekt: Immunologische Abteilung MVZ Labor Krone GbR:
Dr. rer. nat. J. Fazio, Dr. K. Meyer-Schlinkmann,
S. Jorde, B. Hartmeier,
Dr. rer. nat. Dr. med. D. Münstermann

Ansprechpartner
für das Projekt: Prof. Dr. med. H.-J. Hagedorn
Dr. rer. nat. Dr. med. D. Münstermann
MVZ Labor Krone GbR
Siemensstr. 40
32105 Bad Salzuffen
Tel. 05222 80 76 – 143
E-Mail: info@laborkrone.de



Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung und Fragestellung	3
3. Methoden	3
4. Probenpanel	6
5. Ergebnisse	8
5.1 Hinweise zur Lipoidantikörperbestimmung mit dem Sekure®-RPR-Test (Fa. Sekisui).....	8
5.2 Spezifität der Lipoidantikörpertests in den nicht vorselektierten Proben des Routinepanels	9
5.3 Lipoidantikörperbefunde in T. pallidum-Antikörper positiven Proben	11
5.3.1 Vergleich der qualitativen Lipoidantikörperbefunde.....	11
5.3.2 Vergleich der quantitativen RPR-Befunde	12
5.3.3 VDRL-Blotbefunde in RPR-reaktiven Proben	15
5.3.4 Vergleich der 19S-IgM-FTA- und RPR-Antikörperbefunde	17
6. Abschließende Bemerkungen zu den Studienergebnissen	19
7. Literaturverzeichnis	22

1. Zusammenfassung

Der Lipoidantikörpernachweis mittels RPR- oder VDRL-Test ist im Rahmen der Syphilisdiagnostik von zentraler Bedeutung für die Beurteilung der Aktivität und ggf. Behandlungsbedürftigkeit einer T. pallidum-Infektion. Der in Deutschland häufig eingesetzte RPR reditest™ der Fa. Biokit (RPRBIO) soll nach Herstellerangaben Ende 2020 aus dem Markt genommen werden. Daher ergab sich die Frage, ob RPR-Tests anderer Hersteller vergleichbare Befunde ergeben.

Aus diesem Grunde wurde der RPRBIO mit einem anderen manuellen Test, dem Macro-Vue™ RPR der Fa. Becton Dickinson (RPRBD) und einem automatisierten RPR-Test auf Basis von Polystyrene-Latex-Partikeln, dem SEKURE® RPR Test der Fa Sekisui (RPRSEK) vergleichend untersucht.

Bei 98 Lipoidantikörper-positiven Proben wurde die Lipoidantikörpertestsung mittels Immunoblot (Treponema+VDRL-Immunoblot, Fa. Viramed) ergänzt. Die Studie umfasste insgesamt 1.155 Proben: 1.063 nicht vorselektierte Proben aus der STI-Routinediagnostik und Mutterschaftsvorsorge, 39 Plasmaproben von Blutspendern aus der Serumbank des Institutes und weitere 53 Proben mit bekanntem Treponemenantikörper-Status.

In den 1.004 Treponemantikörper-negativen Seren des Routinepanels wurde die Spezifität für den RPRBIO mit 99 %, den RPRBD mit 99,5 % und den RPRSEK mit 99,3 % ermittelt. Für 276 Proben von Schwangeren lagen die Spezifitätswerte geringfügig niedriger zwischen 98,6 % und 98,9 %.

Von 145 Treponemenantikörper-positiven Proben reagierten (qualitativ) positiv im RPRBIO 101, im RPRBD 99 und im RPRSEK 92. Bei allen diskrepanten qualitativen Befunden (positiv/negativ) handelte es sich um niedrige Lipoidantikörpertiter <1:4 und betraf in der Regel die Fallgruppe Lues satis curata. Bei der Titerbestimmung ergaben sich zwischen den drei RPR-Tests zum Teil deutliche Abweichungen. Die Übereinstimmung positiver Befunde (Abweichung ± 1 Titerstufe) war für den Vergleich RPRBIO/RPRSEK mit 90,5 % deutlich besser als für den RPRBD/RPBIO mit 77,4 % und den RPRBD/RPRSEK mit 71,6 %. Der RPRBD-Test zeigte in dieser Studie im Vergleich zu den anderen Tests niedrigere Titerwerte. Dies betraf insbesondere Proben mit RPRBIO-Titern im Bereich 1:32 bis 1:64.

Im VDRL-Blot werden unabhängig vom Infektionsstadium weitaus überwiegend IgM-Antikörper nachgewiesen. Bei 23 VDRL-Blot negativen Proben fanden sich RPR-Titer zwischen 1:1 und 1:32. Somit kann der Blot nicht als Bestätigungstest für RPR-Befunde eingesetzt werden. Eine Abschätzung des Lipoidantikörpertiters basierend auf den Blot-Befunden ist ebenfalls nur bedingt möglich. Aus diesem Grund ist die konventionelle Titerbestimmung für die Befundbeurteilung besser geeignet als die VDRL-Blotdiagnostik.

Ein RPR-/VDRL-Titer $\geq 1:8$ wird bei unbehandelter Treponemeninfektion als Hinweis auf eine aktive, behandlungsbedürftige Infektion angesehen. Legt man nur dieses Kriterium für die

Befundbewertung zugrunde, wären von den Proben dieser Studie im RPRBIO 69, im RPRSEK 71 und im RPRBD 67 als auffällig klassifiziert worden. Berücksichtigt man hingegen zusätzlich die quantitativen treponemenspezifischen IgM-Antikörperbefunde ergibt sich ein anderes Bild. Bei RPR-Titern $<1:8$ fanden sich im 19S-IgM-Test erhöhte Titer $\geq 1:40$ im Falle des RPRBIO-Test bei 20, des RPRSEK bei 22 und im Falle des RPRBD bei 25 Proben. Gesamt auffällig mit einem RPR-Titer $\geq 1:8$ und /oder einem 19S-IgM-Titer $\geq 1:40$ waren im RPRBD 92 Proben, in den beiden anderen Tests je 93 Proben. Somit sprechen die Befunde nicht gegen die Anwendung des RPRBD als Alternative zum RPRBIO. Aus Sicherheitsgründen sollten aber für den BD-Test Titer ab 1:4 als auffällig klassifiziert werden.

Der automatisierte RPRSEK zeigt den manuellen RPR-Tests weitgehend vergleichbare Befunde. Ein Nachteil ist jedoch, dass für viele Proben Nachtestungen in mehreren Verdünnungen erforderlich sind, die im Ablauf der Laborroutine nur schlecht unterzubringen sind und viel Erfahrung bei der Testauswertung voraussetzen.

2. Einleitung und Fragestellung

In Deutschland und vielen europäischen Ländern wird ein Stufenkonzept zur Serodiagnose der Syphilis praktiziert, bei dem zunächst ein Suchtest auf treponemenspezifische Antikörper (TPHA/TPPA, Chemolumineszenz-Assays oder ELISA-Tests) durchgeführt wird. Ist der Screeningtest negativ, entfallen weitere Untersuchungen. Bei positivem Suchtest-Resultat folgen dann ein weiterer treponemenspezifischer Antikörpertest zur Absicherung der Befundspezifität und treponemenspezifische IgM-Antikörper- und Lipoidantikörpertests zur Beurteilung der möglichen Aktivität und ggf. Behandlungsbedürftigkeit [1,4].

In den U.S.A wird nach wie vor überwiegend ein Lipoidantikörper-Screeningtest (VDRL, RPR-Test) als Basis für die Diagnosestellung eingesetzt [2,3,6,7]. Bei positivem Lipoidantikörpertest wird dann eine Absicherung der Befundspezifität mittels *T. pallidum*-spezifischer Antikörper-Testsysteme angeschlossen.

Unabhängig von dem Algorithmus zur Diagnosestellung kommt dem Lipoidantikörpernachweis mittels VDRL- oder RPR-Test zentrale Bedeutung zur Beurteilung der Aktivität und ggf. Behandlungsbedürftigkeit einer *T. pallidum*-Infektion zu.

In Deutschland wird aktuell von den meisten Laboratorien der RPR reitertest der Firma Biokit S.A. (Barcelona, Spanien) eingesetzt. Der Hersteller hat jedoch angekündigt, den Vertrieb des Tests zum Ende des Jahres 2020 einzustellen.

Aus diesem Grunde wird das Konsiliarlabor zunehmend mit der Frage konfrontiert, ob RPR-Tests anderer Hersteller vergleichbare Resultate ergeben und ob z. B. auch vollautomatisierte Tests auf Polysterene-Latex-Partikel-Basis, die in Deutschland bislang praktisch nicht angewendet werden, vergleichbare Resultate liefern können. Wir hatten uns daher entschlossen, kurzfristig eine Studie zu diesem Thema durchzuführen.

Geplant war der Vergleich von 2 konventionellen manuellen RPR-Kartentests, dem RPR reitertest (Fa. Biokit, Spanien) und dem BD Macro-Vue RPR-Test (Fa Becton Dickinson, USA) mit dem automatisierten SEKURE-RPR Test (Sekisui Diagnostics, UK).

Auch eine kurze Stellungnahme zur Lipoidantikörperbestimmung mittels Immunoblot (Treponema+VDRL-Blot, Fa Viramed, Deutschland) sollte in die Studie einbezogen werden.

3. Methoden

Als Grundlage für die Beurteilung des Probenstatus dienten die Testresultate aus der Routinediagnostik des Labors Krone. Hierfür wurden folgende Tests eingesetzt:

Syphilis-Suchtest: Architect® Syphilis TP Chemilumineszenz Mikropartikel-Assay (CMIA) (Fa. Abbott, Wiesbaden, Deutschland).

Testantigene: Rekombinante *T. pallidum*-Antigene Tp 47, Tp17, Tp15

Testdurchführung nach Herstellervorschrift.

Auswertung: Nach Herstellervorgaben sind S/Co-Werte $\geq 1,0$ als positiv und Werte $< 1,0$ als negativ zu klassifizieren. **Abweichend von dieser Vorgabe wurde ein Graubereich mit S/Co-Werten $\geq 0,3$ bis 0,99 eingeführt.**

Bestätigungstest: Treponema pallidum-Partikelagglutinations- (TPPA) Test

(Fujirebio/Mast, Reinfeld, Deutschland).

Testantigen: *T. pallidum* Vollantigen-Ultraschallhomogenat gebunden an Gelatine-Partikel. Integriertes *T. phagedenis*-Antigen zur Absorption kreuzreagierender Antikörper.

Testdurchführung und Auswertung nach Herstellervorgabe.

Auswertung: Titer <1:80 negativ, Titer ≥1:80 positiv.

Bestätigungstest: IgG-Fluoreszenz-Treponema-Antikörper-Absorptions- (IgG-FTA-ABS-) Test (Fa. Zeus Scientific, New Jersey, USA)

Testdurchführung unter Verwendung des Absorbens (Firma Mast) zur Absorption kreuzreagierender Antikörper. Methodische Details s. MIQ 16/2012 (21).

Testantigen: *T. pallidum* (Nichols-Stamm) fixiert auf Objektträgern)

Testauswertung: <1:5 negativ, 1:5 (=1+ Fluoreszenz) grenzwertig, nicht signifikant, 1:10 (2+ Fluoreszenz) fraglich spezifisch, 1:20 (3+ Fluoreszenz) positiv, >1:20 (4+ Fluoreszenz) stark positiv.

Nachweis treponemenspezifischer IgM-Antikörper. 19S-IgM-FTA-ABS-Test

Testantigen s. IgG-FTA-ABS-Test, Methodische Details s. MIQ16(2012).

Für den 19S-IgM-FTA-ABS-Test wurden die Proben, beginnend mit der Ausgangsverdünnung 1:10 titriert.

Testauswertung: <1:10 negativ, 1:10 grenzwertig, 1:20 schwach positiv, ≥1:20 positiv

Rapid Plasma Reagin (RPR) Test (Fa. Biokit, Barcelona, Spanien)

Semiquantitativer Test zum Nachweis von Lipoidantikörpern in Serum und Plasma.

Das Testantigen besteht aus Cardiolipin, Lecithin, Cholesterol, Kohlenstoffmikropartikeln und weiteren Zusatzstoffen. Für die Testdurchführung werden Probenverdünnungen und das Testreagenz auf Karten aufgebracht und nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 8 Minuten auf einem Rotationsschüttler abgelesen. Die Ablesung der Testergebnisse erfolgt unter einer starken Lichtquelle. Schwarze mehr oder wenig sichtbare Kohlenstoffausflockungen vor leicht durchsichtigem Hintergrund werden als positiv beurteilt. Homogene graue Suspensionen oder nur leichte Trübung des Testansatzes werden als negativ gewertet.

Testbewertung: Keine Agglutination im nativen Serum = negativ. Agglutination im unverdünnten Serum oder in vorverdünnter Probe (cave! Prozonophänomen) positiv, Befundangabe in Titern ab 1:1.

Macro-Vue™ RPR Card Test (Fa Becton, Dickinson and Company, 7 Loveton Circle, Sparks, MD 21152, USA)

Semiquantitativer Test zum Nachweis von Lipoidantikörpern in Serum und Plasma.

Das Testantigen ist dem des RPR-Tests der Fa. Biokit vergleichbar und besteht ebenfalls aus Cardiolipin, Lecithin, Cholesterol, Kohlenstoffmikropartikeln und weiteren Zusatzstoffen. Testdurchführung und Auswertung entsprechen derjenigen des RPR-Tests der Fa. Biokit.

SEKURE® RPR Test (Fa. Sekisui Diagnostics UK Ltd., Liphook Way, Allington Maidstone, Kent, ME16 0LQ, UK)

Der SEKURE RPR Test ist ein vollautomatisierter Test zum Nachweis von Lipoidantikörpern in Serum und Plasma. Als Testantigen werden mit Lipidantigenen (Cholesterin und Lecithin) beschichtete Polystyrene Latex Partikel eingesetzt. Die Testdurchführung erfolgte auf dem Beckman Coulter AU 5800 Analyzer. Die resultierenden Befunde werden als RU (RPR Units) angegeben. Werte $\geq 1,0$ RU werden als positiv klassifiziert. Nach Herstellerangaben verlaufen die Meßwerte des Tests in einem Bereich bis 9,4 RU (oberes Detektionslimit) linear. Proben mit nicht plausiblen Screeningtest wurden in einer 1:11 Verdünnung erneut getestet. Wurde das obere Detektionslimit erneut überschritten, erfolgte eine Untersuchung der Proben in weiteren Verdünnungen.

Lipoidantikörper-Nachweis mit dem Treponema+VDRL Test (Fa. Viramed, Planegg, Deutschland)

Treponema+VDRL ViraBlot® IgG Test

Antigene: Aufgereinigte *T. pallidum*-spezifische Antigene p47, p44.5 (TnpA), p17, p15, zusätzlich VDRL-spezifisches Antigen in fünf Konzentrationen.

Testdurchführung nach Herstellerangaben

Testauswertung:

- a) T. p.-spezifische Banden: mindestens zwei deutliche (\geq Cutoff) Banden = positiv, eine deutliche plus ein bis drei schwach positive ($<$ Cutoff) Banden oder vier schwache Banden = grenzwertig, eine deutliche Bande oder ein bis drei schwache Banden oder keine Bande = negativ.
- b) VDRL-Banden: keine Bande = negativ, ≥ 1 ViraBlot Einheit (VE) reaktiv,
- c) Lipoidantikörper-Aktivität 1-2 VE gering, 3-6 VE mittel, 7-10 VE hoch

Treponema+VDRL ViraBlot® IgM Test

Antigene und Testdurchführung wie bei IgG-Blot.

Testauswertung:

- a) T. p.-spezifische Banden: mindestens zwei deutliche (\geq Cutoff) Banden oder eine deutliche Bande p47 oder p17 oder p15 plus ein bis drei schwache ($<$ Cutoff) Banden = positiv, eine deutliche Bande aus p47, p17, p15 oder eine deutliche p44.5 (TnpA) plus ein bis drei schwache Banden = grenzwertig. Nur deutliche p44.5 oder ein bis vier schwache Banden oder keine Bande = negativ.
- b) VDRL-Banden und Aktivitätsbeurteilung s. IgG-Blot

Für die Klassifizierung der Lipoidantikörper-Aktivität in der jeweiligen Probe wurde entweder der IgM- oder der IgG-Scorewert verwendet, abhängig davon welches Resultat den höheren Wert anzeigte.

4. Probenpanel

In der Studie wurden insgesamt 1.155 Proben untersucht.

Zunächst wurden 1063 nicht vorselektierte Proben (Routinepanel) getestet, die dem Labor Krone zum Nachweis bzw. Ausschluß einer Treponemeninfektion eingesandt und nach den Maßgaben zur serologischen Stufendiagnostik der Syphilis untersucht wurden. Einsender waren Untersuchungs- und Beratungsstellen des öffentlichen Gesundheitswesens und NGO (n = 678), Gynäkologen im Rahmen der Mutterschaftsvorsorge (n = 276), niedergelassene Ärzte anderer Fachgruppen sowie Krankenhäuser und Fremdlaboratorien (n = 109). Die Alters- und Geschlechtsverteilung der untersuchten Personen zeigen die Tabellen 1 und 2. Die Testung auf Lipoidantikörper im Rahmen dieser Studie folgte zeitversetzt zur Probeneinsendung nach Lagerung bei +4°C für ca. 7 Tage und Anonymisierung der Proben.

Um die Aussagekraft der Studie hinsichtlich der Reaktivität der Lipoidantikörpertests zu optimieren, wurden zusätzlich zwei weitere Probenpanel untersucht: 39 bei -70°C gelagerte Plasmaproben von Blutspendern aus der Probenbank des Institutes, sowie weitere 53 bei -20°C gelagerte positive Proben.

Klinische Angaben waren für positive Proben nur in einem Teil der Fälle verfügbar. Sofern entsprechende Informationen nicht vorlagen, wurden die Proben ausgehend von der jeweiligen Befundkonstellation klassifiziert (s. Tabelle 3).

Tabelle 1		
Altersverteilung der Proben des Routinepanels		
Alter (Mittelwert) 33 (15 – 93) Jahre		
Altersgruppe	Anzahl	Prozent
<20 Jahre	43	4,0
20-24 Jahre	135	12,7
25-29 Jahre	244	23,0
30-39 Jahre	334	31,4
40-49 Jahre	96	9,0
50-59 Jahre	47	4,4
60-69 Jahre	18	1,7
70 Jahre und älter	15	1,4
Keine Angabe	131	12,3
Gesamt	1063	100,0

Tabelle 2		
Übersicht zur Geschlechtsverteilung im Routinepanel		
Geschlecht	Anzahl	Prozent
Männlich	487	45,9
Weiblich	496	46,6
Divers	1	0,1
Keine Angaben	131	12,3
Gesamt	1063	100,0

Tabelle 3				
Klassifizierung der positiven Proben der Gesamtstudie (n = 145)				
Diagnose	Routine-Panel	Blutspender	Sonstige positive Proben	Gesamtzahl
Erstinfektion Primärstadium	1	0	10	11
Erstinfektion Sekundärstadium	1	0	7	8
Erstinfektion Frühlatenz	0	0	5	5
Latente Syphilis	4	9	8	21
Reinfektion asymptomatisch	2	0	6	8
Reinfektion Primärstadium	1	0	0	1
Reinfektion Sekundärstadium	1	0	1	2
Neurosyphilis	0	0	1	1
Lues satis curata	38	13	1	52
Aktive Syphilis, keine Angaben	2	11	10	23
Therapie-Verlaufskontrollen	7	0	4	11
Verdacht auf Syphilis im Frühstadium	0	2	0	2
Gesamtzahl der Proben	57	35	53	145

5. Ergebnisse

Für die in dieser Studie untersuchten Proben wurde auf Grundlage der *T. pallidum*-Antikörper-spezifischen Such- und Bestätigungstestresultate der *T. pallidum*-Antikörperstatus in 1.006 Fällen als negativ, in 145 Fällen als positiv und in 4 Fällen als unspezifisch klassifiziert. Die Verteilung der positiven und negativen Befunde in den einzelnen Probengruppen zeigt die Tabelle 4.

	Anzahl	Negativ	Positiv	Unspezifisch	% positiv
Routinepanel gesamt	1063	1004	57	2	5,4
- Mutterschaftsvorsorge	276	276	0	0	0
- ÖGD Beratungsstellen	467	438	28	1	6,0
- NGO Beratungsstellen	211	189	21	1	10,0
- andere Einsender	109	101	8	0	7,9
Blutspender	39	2	35	2	71,4
Panel positive Proben	53	0	53	0	100
Probengesamtzahl	1155	1006	145	4	12,6

5.1 Hinweise zur Lipoidantikörperbestimmung mit dem Sekure®-RPR-Test (Fa. Sekisui)

Der RPR-Test der Firma Sekisui (RPRSEK) ist ein vollautomatisierter Test, der eine stufenlose Bestimmung der Lipoidantikörper-Konzentration in der Probe ermöglicht. Die Resultate werden in RPR-Units angegeben. Laut Hersteller-Angaben verlaufen die Testergebnisse in einem Bereich bis 9,4 RU linear, bei höherer Konzentration muß die Messung in weiteren Probenverdünnungen wiederholt werden, um ein korrektes quantitatives Testergebnis zu erzielen [8].

Nach den eigenen Erfahrungen war jedoch auch bei initialen Meßwerten < 9,4 RU das Testresultat nicht in allen Fällen plausibel im Vergleich zu den weiteren eingesetzten RPR-Tests.

Aus diesem Grunde wurde das initiale Testergebnis auch bei weniger als 9,4 RU in zahlreichen Fällen mittels Wiederholungsuntersuchungen in weiteren Probenverdünnungen überprüft.

Von 145 Proben mit positivem Treponemantikörperstatus wurden 57 in einer Verdünnung von 1:11 nachgetestet. Für diese Proben lagen die RPR Biokit-Titer (RPRBIO) zwischen 1:1 und 1:64, der RPRSEK ergab Messwerte zwischen 1 – 85 RU.

In 7 Proben mit RPRBIO-Titern von 1:64 – 1:256 wurden die Werte des RPRSEK in einer Probenverdünnung von 1:21 in einem Bereich von 58 bis 110 RU bestimmt.

Für weitere 15 Proben mit RPRBIO-Titern zwischen 1:64 und 1:1.024 wurden im RPRSEK in Verdünnungen von 1:50 bis 1:300 letztlich RU-Werte zwischen 53 und 1308 ermittelt.

Bei zwei Sera mit RPRBIO-Titern von 1:16 und 1:64 fanden sich im Nativansatz im RPRSEK-Test nur 2 bzw. 4 RU. Bei höherer Probenverdünnung ergaben sich keine abweichenden Testresultate.

Bei den verbleibenden 64 (44,1 %) Proben dieses Panels wurden die Nativansätze als Endergebnis akzeptiert.

In 44 Fällen waren die Ergebnisse der Lipoidantikörpertests übereinstimmend negativ, 20 Proben mit RPRBIO-Titern von 1:1 – 1:2 zeigten im RPRSEK Meßwerte zwischen 1 – 6 RU. Für die nachfolgenden Vergleichsuntersuchungen wurden die RPRSEK-Meßwerte durch Auf- und Abrunden der RU-Werte den Titerwerten der zwei anderen RPR-Tests angeglichen um die Auswertung zu vereinfachen [8].

5.2 Spezifität der Lipoidantikörpertests in den nicht vorselektierten Proben des Routinepanels

Insgesamt fanden sich in den 1004 Treponemenantikörper-negativen Proben des Routinepanels testabhängig zwischen 5 und 10 sogenannte biologisch falsch positive (BFP) Resultate in den RPR-Tests. Die Details sind in den Tabellen 5 und 6 aufgelistet.

Tabelle 5					
Routinepanel: Biologisch falsch positive RPR-Testresultate					
Probengruppe	Geschlecht	Gesamt n =	RPRBIO positiv n =	RPRBD positiv n =	RPRSEK positiv n =
Mutterschaftsvorsorge	wbl.	276	4	4	3
ÖGD Beratungsstellen	ml.	289	3	1	1
	wbl.	148	1	0	0
NGO Beratungsstellen	k.A.	1	0	0	0
	ml.	105	2	0	2
	wbl.	8	0	0	0
Andere Einsender	andere	1	0	0	0
	k.A.	75	0	0	1
	ml.	43	0	0	0
Gesamt	Wbl.	58	0	0	0
	k.A.	0	0	0	0
		1004	10 (1,0%)	5 (0,5%)	7 (0,7%)

RPRBIO = RPR-Test Biokit, RPRBD = RPR-Test Becton Dickinson, RPRSEK = RPR-Test Sekisui

Tabelle 6					
Biologisch falsch positive (BFP) RPR-Titer und VDRL-Blot Befunde					
Fallgruppe Einzelbefunde	Geschlecht	RPRBIO Titer	RPRBD Titer	RPRSEK Titer	VDRL-Blot Score
MUVO					
1	wbl.	4	4	4	2
2	wbl.	2	1	neg.	0
3	wbl.	1	2	neg.	1
4	wbl.	1	1	1	0
5	wbl.	neg.	neg.	1	n.d.
ÖGD					
6	ml.	4	4	4	1
7	ml.	1	neg.	neg.	n.d.
8	ml.	1	neg.	neg.	n.d.
9	wbl.	1	neg.	neg.	n.d.
NGO					
10	ml.	1	neg.	3	n.d.
11	ml.	1	neg.	neg.	n.d.
12	ml.	neg.	neg.	1	n.d.
13	k.A.	neg.	neg.	1	n.d.
Gesamt, reaktiv		n = 10	n = 5	n = 7	n = 3

Die BFP betreffen nicht nur Proben von Frauen aus der Mutterschaftsvorsorge sondern gleichermaßen Proben von Männern und Frauen aus den ÖGD- und NGO-Beratungstellen. In den meisten Fällen handelt es sich um schwach positive Befunde mit Titern von 1:1 bis 1:2. Zweimal fanden sich Lipoidantikörper-Titer von 1:4 übereinstimmend in allen drei RPR-Tests. Auch im VDRL-Blot war mit Scorewerten von 2 bzw. 1 eine geringe Lipoidantikörper-Konzentration in beiden Proben nachweisbar. Befunddiskrepanzen betrafen in der Regel grenzwertige Testreaktionen.

Fünfmal wurden RPRBIO-Titer von 1:1 in den anderen Testsystemen nicht reproduziert. In drei Fällen reagierte nur der Sekisui-RPR-Test. Im RPRBD-Test fanden sich keine isoliert positiven Befunde. Dies erklärt sich wahrscheinlich dadurch, dass für den Test eine Grenzwert-Kontrolle verfügbar ist, die eine bessere Abgrenzung einer positiven von einer nicht relevanten Hintergrundreaktion ermöglicht und somit die Testbeurteilung durch den Untersucher erleichtert. Für den RPRSEK-Test ist die objektive Testauswertung im Analyse-Automaten sichergestellt. Die Befunddiskrepanzen zwischen RPRBIO und RPRBD-Test sowie die in der Regel nicht signifikanten Titerabweichungen (+/- eine Titerstufe) sind in den meisten Fällen durch subjektive Bewertungsfaktoren bedingt.

In den 1004 *T. pallidum*-Antikörper negativen nicht vorselektierten Proben aus einem Routinelabor zeigten alle drei RPR-Tests eine sehr hohe Spezifität unabhängig davon, ob es sich um Proben aus der Mutterschaftsvorsorge, aus der STI-Routinediagnostik, aus Beratungsstellen des ÖGD oder NGO-Einrichtungen handelte.

Die Gesamtspezifitäten wurden für den RPRBIO mit 99,0 %, den RPRBD mit 99,5 % und den RPRSEK mit 99,3 % errechnet. Für Proben von schwangeren Frauen lag die Spezifität zwischen 98,6 % und 98,9 %, für Proben aus den ÖGD-Beratungsstellen zwischen 99,1 (RPRBIO) und 99,8 % (RPRBD, RPRSEK), für Proben aus NGO-Beratungsstellen zwischen 98,9 % (RPRBIO, RPRSEK) und 100 % (RPRBD). Bei Proben von anderen Einsendern (Dermatologen, Urologen, andere niedergelassene Ärzte, Klinikambulanzen etc.) fanden sich mit keinem Test BFP Resultate.

5.3 Lipoidantikörperbefunde in *T. pallidum*-Antikörper positiven Proben

5.3.1 Vergleich der qualitativen Lipoidantikörperbefunde

Die in dieser Studie untersuchten 145 Proben repräsentieren die in der Routinediagnostik vorkommenden relevanten Befundkonstellationen. Die Tabelle 7 zeigt eine Übersicht der positiven und negativen Lipoidantikörperbefunde in den drei RPR-Tests und im Treponema+VDRL Immunoblot in den verschiedenen Diagnosegruppen unabhängig von der Titerhöhe. Im VDRL-Blot wurden nur 98 der 145 Proben untersucht. Der Immunoblot wurde nur bei RPR-positiven Proben als ergänzender Test eingesetzt, sofern das Untersuchungsmaterial ausreichte.

Tabelle 7									
Qualitative Lipoidantikörperbefunde (n = 145)									
Diagnose	Anzahl n =	RPRBIO		RPRBD		RPRSEK		VDRL-Blot	
		pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg
Erstinfektion Primärstadium	11	10	1	10	1	10	1	9	1
Erstinfektion Sekundärstadium	8	7	1	7	1	6	2	6	1
Erstinfektion Frühlatenz	5	5	0	5	0	5	0	5	0
Latente Syphilis	21	19	2	19	2	19	2	16	3
Reinfektion asymptomatisch	8	8	0	8	0	8	0	5	3
Reinfektion Primärstadium	1	1	0	1	0	1	0	1	0
Reinfektion Sekundärstadium	2	2	0	2	0	2	0	2	0
Neurosyphilis	1	1	0	1	0	1	0	1	0
Aktive Syphilis, keine Angaben	23	23	0	23	0	23	0	20	3
Therapie-Verlaufskontrollen	11	9	2	9	2	8	3	6	3
V. a. Syphilis im Frühstadium	2	0	2	0	2	0	2	0	0
Syphilis satis curata	52	16	36	14	38	9	43	3	10
Gesamtzahl der Proben	145	101	44	99	46	92	53	74	24

RPRBIO = RPR-Test Biokit, RPRBD = RPR Becton Dickinson, RPRSEK = RPR Sekisui
VDRL-Blot Viramed: Zahl der untersuchten Proben 98

Im RPRBIO reagierten 101 Proben, im RPRBD 99 und im RPRSEK 92. Die meisten diskrepanten Resultate zwischen den RPR-Tests zeigten sich in der Fallgruppe Syphilis satis curata, also bei Restbefunden nach zurückliegender behandelter Treponemeninfektion. Für den RPRSEK fanden sich zwei weitere negative Resultate in anderen Fallgruppen (Erstinfektion Sekundärstadium und Therapie-Verlaufskontrollen). In allen Proben mit qualitativ abweichenden Resultaten (positiv/negativ) waren nur niedrige Lipoidantikörper-Titer von 1:1 bis 1:2 vorhanden.

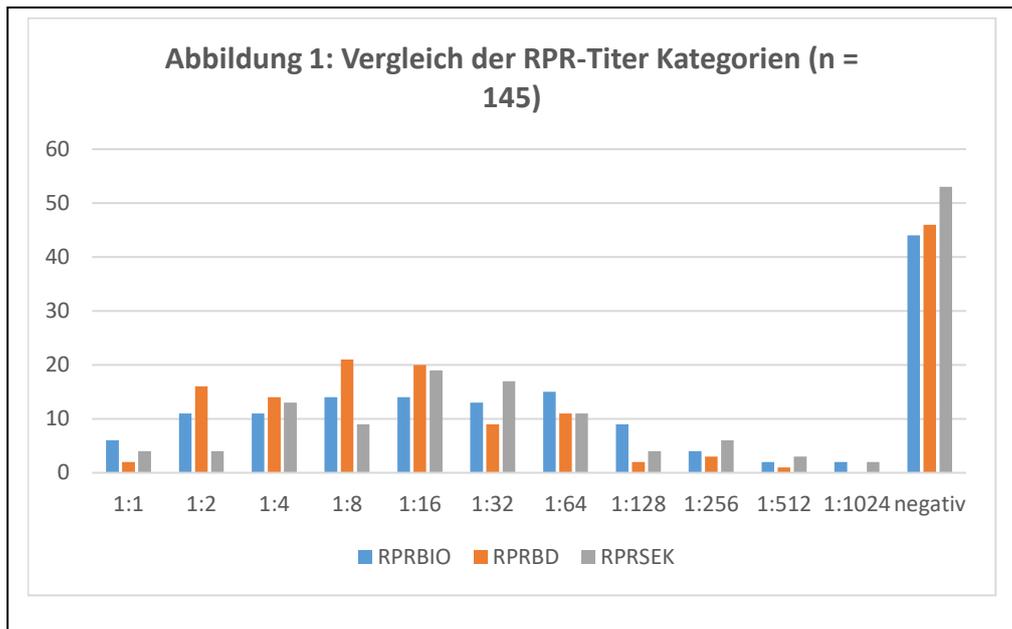
5.3.2 Vergleich der quantitativen RPR-Befunde

Für die Beurteilung der Lipoidantikörperbefunde wird der Titerhöhe wichtige Bedeutung beigemessen. Als Faustregel gilt, dass VDRL Titer $\leq 1:4$ als wenig aussagekräftig gelten. Titer ab 1:8 oder auch erst ab 1:16 werden bei unbehandelter Syphilis als Hinweis auf eine aktive behandlungsbedürftige Infektion gewertet [1,2,3,4,5]. VDRL/RPR-Titer $< 1:8$ schließen jedoch eine aktive behandlungsbedürftige Treponemeninfektion nicht grundsätzlich aus. Nicht zuletzt aus diesem Grund wird in Deutschland parallel zur Lipoidantikörper-Testung auch die Untersuchung auf treponemenspezifische IgM-Antikörper empfohlen.

In der Tabelle 8 und der Abbildung 1 ist die Verteilung der Lipoidantikörper nach Titerhöhen dargestellt.

Die größte Zahl niedriger RPR-Titer $\leq 1:4$ fand sich im RPRBD mit 32 gefolgt vom RPRBIO mit 28 Einzelbefunden. Im RPRSEK war die Anzahl niedriger Lipoidantikörper mit 21 deutlich geringer. Ein bezogen auf die klinische Relevanz grenzwertiger Lipoidantikörper-Titer von 1:8 fand sich im RPRBD in 21 Fällen, im RPRBIO aber nur in 14 und im RPRSEK in 9 Fällen. Dagegen war die Zahl hoher Lipoidantikörpertiter $>1:8$ im RPRSEK mit 62 und RPRBIO mit 59 eindeutig höher als im RPRBD mit 46 Befunden. Wertet man alle Befunde mit einem Titer $\geq 1:8$ als Hinweis auf eine aktive Infektion gleichen sich die Resultate mit 73 für den RPRBIO, 71 für den RPRSEK und 67 für den RPRBD weitgehend an.

Tabelle 8			
Verteilung der Lipoidantikörpertiter in 145 Proben, Anzahl pro Titerstufe			
RPR-Titer	RPRBIO	RPRBD	RPRSEK
negativ	44	46	53
1:1	6	2	4
1:2	11	16	4
1:4	11	14	13
1:8	14	21	9
1:16	14	20	19
1:32	13	9	17
1:64	15	11	11
1:128	9	2	4
1:256	4	3	6
1:512	2	1	3
1:1024	2	0	2



Die Daten der Tabelle 8 und Abbildung 1 zeigen, dass der RPRBIO und der RPRSEK tendenziell mehr hohe Titerwerte aufweisen, als der RPRBD. Hieraus ergibt sich die Frage, wieweit die Tests für individuelle Befunde vergleichbare Resultate hinsichtlich der klinischen Relevanz liefern.

Drei Proben reagierten isoliert positiv nur im RPRBIO mit Titerwerten von 1:1 bis 1:2. Im RPRBIO und RPRSEK fanden sich keine isoliert positiven Testresultate. Nur in einem der Tests negative Ergebnisse fanden sich für den RPRSEK sechsmal. Bei diesen Proben war der RPRBD-Titer jeweils 1:2, im RPRBIO einmal 1:1 und fünfmal 1:2. In zwei Fällen war der RPRBD negativ, die beiden anderen Tests zeigten jeweils einen Titerwert von 1:1. In keinem dieser Fälle wurde ein diagnostisch richtungsweisender Lipoidantikörper-Titer übersehen, unabhängig davon, ob es sich um ein positives oder negatives Testresultat handelte.

Die Tabelle 9 zeigt einen Titervergleich zwischen dem RPRBIO und RPRBD. Berücksichtigt wurden in der Tabelle nur Proben mit RPR-Titerwerten von mindestens 1:4. Bei den schwächer reagierenden Sera sind Befunddiskrepanzen möglich, wie sie zuvor dargestellt wurden. Als übereinstimmend wurden Testresultate ± 1 Titerstufe gewertet.

Tabelle 9				
Vergleich der Titerwerte für den RPR Biokit und den RPR Becton Dickinson				
RPRBIO-Titer	RPRBIO = RPRBD	RPRBIO > RPRBD	RPRBIO > RPRBD	RPRBD > RPRBIO
	Abweichung ±1 Titerstufe	Abweichung 2 Titerstufen	Abweichung >2 Titerstufen	Abweichung >1 Titerstufe
1:4	11	0	0	0
1:8	14	0	0	0
1:16	13	1	0	0
1:32	10	3	0	0
1:64	6	8	1	0
1:128	7	2	0	0
1:256	1	3	0	0
1:512	2	0	0	0
1:1024	1	1	0	0
Gesamt (n = 84)	65 (77,4 %)	18 (21,4 %)	1 (1,2 %)	0

Tabelle 10				
Vergleich der Titerwerte für den RPR Biokit und den RPR Sekisui				
RPRBIO-Titer	RPRBIO = RPRSEK	RPRBIO > RPRSEK	RPRBIO > RPRSEK	RPRSEK > RPRBIO
	Abweichung ±1 Titerstufe	Abweichung 2 Titerstufen	Abweichung >2 Titerstufen	Abweichung >1 Titerstufe
1:4	8	0	0	3
1:8	14	0	0	0
1:16	13	1	0	0
1:32	11	2	0	0
1:64	14	0	1	0
1:128	9	0	0	0
1:256	3	1	0	0
1:512	2	0	0	0
1:1024	2	0	0	0
Gesamt (n = 84)	76 (90,5 %)	4 (4,8 %)	1 (1,1 %)	3 (3,6 %)

Entsprechende Befunde ergaben sich für den RPR Biokit und den RPR Becton Dickinson nur bei 65 von 84 (77,4 %) der Proben. Nur in einem Fall war der RPRBD-Titer mit 1:32 eine Stufe (nicht signifikant) höher als der RPR-BIO-Titer. Identische Titerwerte beider Tests zeigten insgesamt 24 Proben. Bei niedrigen RPRBIO-Titerwerten von 1:4 bis 1:8 war die Übereinstimmung deutlich besser als bei höheren RPRBIO-Titern. Auffällig ist, dass sich vor allem bei RPRBIO-Titern ab 1:32 häufig um zwei Stufen niedrigere Werte im RPRBD fanden. In einem Fall war der RPRBD Titer mit 1:8 sogar um drei Stufen niedriger als der RPRBIO-Titer mit 1:64.

Tabelle 11				
Vergleich der Titerwerte für den RPR Becton Dickinson und den RPR Sekisui				
RPRBD-Titer	RPRBD = RPRSEK	RPRBD > RPRSEK	RPRBD > RPRSEK	RPRSEK > RPRBD
	Abweichung ±1 Titerstufe	Abweichung 2 Titerstufen	Abweichung >2 Titerstufen	Abweichung >1 Titerstufe
1:4	9	0	0	5
1:8	16	0	0	5
1:16	16	0	0	4
1:32	8	0	1	2
1:64	4	0	0	5
1:128	2	0	0	0
1:256	2	0	0	1
1:512	1	0	0	0
1:1024	0	0	0	0
Gesamt (n = 81)	58 (71,6 %)	0	1 (1,2 %)	22 (27,2 %)

Der RPRBIO und der RPRSEK zeigen in 90,5% der Fälle eine gute Übereinstimmung (s. Tab.10). In 4 Fällen ist der RPRBIO-Titer um zwei Stufen höher als der RPRSEK. Umgekehrt ist dreimal der RPRSEK Titer bei RPRBIO-Titern von 1:4 um zwei Stufen höher. Eine Probe zeigte im RPRSEK nur einen Titer von 1:2, hingegen im RPRBIO (1:64) und RPRBD (1:32) hochpositive Resultate.

Insgesamt stimmen die Befunde von RPRBIO und RPRSEK deutlich besser überein als die Befunde von RPRBIO und RPRBD. Entsprechend zeigt auch der Vergleich der RPRBD- und RPRSEK-Befunde (Tab. 11) weniger übereinstimmende Resultate.

Vergleichbare Resultate ergaben sich nur für 58 (71,6%) Proben. In 22 (27,2%) Proben zeigte der RPRSEK signifikant höhere Titerwerte als der RPRBD. In drei in dieser Tabelle nicht berücksichtigten Fällen mit RPRBD-Titern von 1:2 und RPRBIO-Titern von 1:4 wurden im RPRSEK die Titer zweimal mit 1:4 und einmal mit 1:8 bestimmt.

5.3.3 VDRL-Blotbefunde in RPR-reaktiven Proben

Für die Bestimmung der Lipoidantikörper sind im Treponema+VDRL-Blot VDRL-Antigene in fünf verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Die Reaktionsintensität über jeder Bande wird mit 0 (Reaktion < Cutoff), 1 (Reaktionsintensität der Cutoff-Bande vergleichbar) oder mit 2 (Reaktion deutlich stärker als Cutoff-Bande) bewertet. Der Befunde wird in ViraBlot-Einheiten (VE) ausgedrückt. Abhängig von der Zahl der positiven Banden und der Reaktionsintensität über der Einzelbande errechnet sich ein Score von 0 (alle Banden negativ) bis 10 (starke Reaktivität >Cutoff) über allen 5 Banden. Positive Befunde werden nach Herstellerangaben folgendermaßen kategorisiert:

1-2 VE = geringe Antikörperkonzentration, entsprechend einem RPR-Titer von 1:1 – 1:8,
 3-6 VE mittlere Antikörperkonzentration entsprechend einem RPR-Titer von 1:8 – 1:32,
 7-10 VE hohe Antikörperkonzentration entsprechend einem RPR-Titer von 1:16 – 1:64

oder höher).

Die Bestimmung der VDRL-Antikörper erfolgt sowohl im IgM- wie auch im IgG-Blot. Als Endergebnis gewertet wird der jeweils höhere Score im IgM- oder IgG-Blot.

Tabelle 12												
Virablot VDRL IgG/IgM Score (Virablot-Einheiten, VE) (n = 98)												
VDRL-Virablot IgG	VDRL-Virablot IgM											
Score	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Gesamt
0	24	2	6	3	2	5	3	11	1	4	3	64
1	4	3	2	0	2	1	5	5	2	1	4	29
2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	5
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gesamt	30	5	8	3	4	6	8	16	5	5	8	98

Aus der Tabelle 12 ist zu ersehen, dass bei der Untersuchung von 98 Proben aus allen Stadien der Syphilis weitaus überwiegend VDRL-IgM-Antikörper nachgewiesen werden. In 24 Sera waren die VDRL- IgG- und IgM-Antikörperbefunde übereinstimmend negativ. Sechs Proben zeigten schwach positive isolierte IgG-Antikörper mit 1-2 VE. In keiner Probe war die VDRL-IgG-Konzentration > 2 VE. Isolierte IgM-Antikörper-Befunde fanden sich in 40 Fällen. Bei den 28 IgG- und IgM-Antikörper-reaktiven Proben waren unabhängig von der IgM-Titerhöhe die IgG-Antikörpertiter in allen Fällen nur schwach ausgeprägt. Die Befunde sprechen dafür, dass aus VDRL-IgM-Antikörperbefunden kein Rückschluss darauf möglich ist, ob es sich um eine aktive Treponemeninfektion oder einen Restbefund nach zurückliegender Infektion handelt.

Die Tabelle 13 zeigt beispielhaft für den Vergleich der RPR-Testresultate mit den Virablot-VDRL-Befunden die Ergebnisse des RPRBIO.

Tabelle 13												
Vergleich der VDRL-Blot Score-Werte mit den RPRBIO-Titern (n = 98)												
VDRLBlot Score (VE) IgG/IgM	RPRBIO Titer											
	0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	≥1:512	
0	1	1	11	6	3	1	1					
1		1		1	3	3	1					
2				3	3	4						
3					2	1						
4					2	1	1					
5				1		3	2	1				
6					1		3	2	2			
7						1	5	8	2			
8								3	1			
9								1	2	2		
10									2	2	4	

Die Daten zeigen, dass eine Kategorisierung der VDRL-Blot-Befunde hinsichtlich der Größenordnung der RPR-Titerwerte tendenziell möglich ist, dies aber im Einzelfall keine verlässliche Information für die Entscheidung zu einer eventuell erforderlichen Therapie ermöglicht. Zum einem finden sich falsch negative Blotbefunde nicht nur bei RPR-Titern von 1:1 bis 1:4 sondern auch bei RPR-Titern im Bereich von 1:8 bis 1:32. In der Bewertungstufe "geringe Reaktionsintensität" mit Scorewerten von 1 bis 2 ist auch die als wichtig abzugrenzende Titerstufe 1:8 enthalten, andererseits finden sich auch in dieser Proben-Gruppe höhere RPR-Titerwerte >1:8. Dagegen ist die Kategorisierung der stärkeren Reaktionen im VDRL-Blot von 3-10 als mittlere oder hohe Reaktionsintensität weitgehend verlässlich. Letztlich ist der VDRL-Blot als Entscheidungskriterium für oder gegen eine Therapie nicht geeignet. Es sollte hier immer auf die etablierten Verfahren zur quantitativen Lipoidantikörperbestimmung und die dazu vorliegenden Entscheidungskriterien zurückgegriffen werden.

5.3.4 Vergleich der 19S-IgM-FTA-ABS- und RPR-Antikörperbefunde

Die parallele quantitative Bestimmung der *T. pallidum*-spezifischen IgM-Antikörper (19S-IgM-FTA-ABS-Test, IgM-ELISA) und der sogenannten nichttreponemalen Lipoidantikörper (VDRL-/RPR-Test) ist die Grundlage für die Beurteilung der möglichen Aktivität und ggf. resultierenden Behandlungsindikation einer durch Such- und Bestätigungstests nachgewiesenen Treponemeninfektion. In den nachfolgenden Tabellen 14, 15 und 16 sind die 19S-IgM-FTA-ABS Antikörperbefunde in drei Kategorien eingeteilt: ≤1:10 = negativ bzw. kein signifikanter Befund, 1:20 = schwach positiv, ≥1:40 positiv. Für die RPR-Titer wurde folgende Gruppierung gewählt: negativ, 1:1 – 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, ≥1:32.

Tabelle 14							
Vergleich der 19S-IgM-Titerkategorien mit dem RPRBIO							
	RPRBIO - Titer						
19S IgM Titer	negativ	<1:4	1:4	1:8	1:16	>1:16	gesamt
≤1:10	31	11	4	1	7	6	60
1:20	4	1	1	3	3	4	16
≥1:40	9	5	6	10	4	35	69
Gesamt	44	17	11	14	14	45	145

Tabelle 15							
Vergleich der 19S-IgM-Titerkategorien mit dem RPRBD							
	RPRBD - Titer						
19S IgM Titer	negativ	<1:4	1:4	1:8	1:16	>1:16	gesamt
≤1:10	34	8	5	4	5	4	60
1:20	4	2	0	6	3	1	16
≥1:40	8	8	9	11	12	21	69
Gesamt	46	18	14	21	20	26	145

Tabelle 16							
Vergleich der 19S-IgM-Titerkategorien mit dem RPRSEK							
19S IgM Titer	RPRSEK - Titer						gesamt
	negativ	<1:4	1:4	1:8	1:16	>1:16	
≤1:10	37	6	3	2	6	6	60
1:20	5	0	1	1	5	4	16
≥1:40	11	2	9	6	8	33	69
Gesamt	53	8	13	9	19	43	145

Grundsätzlich schließt ein negativer bzw. nicht signifikanter 19S-IgM-Antikörperbefund eine aktive Treponemeninfektion nicht aus. RPR-Titer $\geq 1:8$ bei einem 19S-IgM-Titer $\leq 1:10$ zeigten sich im RPRBIO und RPRSEK in jeweils 14/60 (23,3 %) Fällen, im RPRBD in 13/60 (21,7 %) Fällen. Bei schwach positivem 19S-IgM-Titer von 1:20 fanden sich in allen drei RPR-Tests 10/16 (62,5 %) Fälle mit klinisch relevanten Lipoidantikörper-Titern $\geq 1:8$. Umgekehrt finden sich vor allem bei der Treponemen-Erstinfektion im Frühstadium positive 19S IgM-Antikörperbefunde bei noch negativem bzw. nicht signifikantem Lipoidantikörperbefund. Entsprechende Befundkonstellationen mit 19S-IgM-Titern $\geq 1:40$ und negativem oder nur schwach positivem RPR-Titer von 1:1 bis 1:4 ergaben sich im RPRBIO in 20/69 (29,0 %), im RPRBD in 25/69 (36,2 %) und im RPRSEK in 22/69 (31,9 %) Fällen. Positive IgM-Antikörperbefunde $\geq 1:40$ bei einem noch nicht als signifikant erhöht zu wertenden RPR-Titer von 1:4 fanden sich im RPRBIO 6/69 (8,7 %), im RPRBD und RPRSEK je 9/69 (13,0 %) Proben.

Tabelle 17			
Hinweise auf mögliche aktive Treponemeninfektion bei der Untersuchung von insgesamt 145 Proben (s. a. Tabellen 13 – 15)			
Kategorie	RPRBIO n =	RPRBD n =	RPRSEK n =
RPR $\geq 1:8$ 19S IgM ≤ 20	24	23	24
RPR $< 1:8$ 19S IgM $\geq 1:40$	20	25	22
RPR $\geq 1:8$ 19S IgM $\geq 1:40$	49	44	47
Gesamt auffällig	93/145 (64,1%)	92/145 (63,5%)	93/145 (64,1%)

Die Gegenüberstellung der T. pallidum-spezifischen IgM-Antikörper- und der nicht treponemenspezifischen Lipoidantikörper-Befunde (Tabelle 17) demonstriert die Notwendigkeit, für die Abklärung der möglichen Behandlungsindikation bei gesicherter Treponemeninfektion beide Testparameter parallel anzuwenden. Gleichzeitig verdeutlichen die Befunde, dass RPR-Tests verschiedener Hersteller nicht in allen Proben identische Titer ergeben und dass somit unabhängig von der Titerhöhe eines einzelnen Tests immer die Gesamtbefundkonstellation für die abschliessende Beurteilung des Befundes berücksichtigt werden muss. Insbesondere ist die RPR-Titergrenze von 1:8 kein alleiniges sicheres Beurteilungskriterium für den Nachweis oder Ausschluß einer aktiven Treponemeninfektion.

6. Abschließende Bemerkungen zu den Studienergebnissen

Bei einem VDRL-/RPR-Screening reagieren der VDRL- und RPR-Test in Treponemenantikörper-negativen Proben in bis zu 2-5 % der Fälle [2,3]. Diese sogenannten biologisch falsch positiven (BFP) Testresultate finden sich z. B. bei Schwangeren, akut oder chronisch entzündlichen Prozessen, Autoimmunerkrankungen, anderen Grunderkrankungen, aber auch bei zunehmendem Lebensalter. Die BFP-Titer im VDRL/RPR-Test sind in der Regel niedrig in einem Bereich $\leq 1:4$. Entsprechende Befunde ergaben sich auch in dieser Studie für die drei geprüften RPR-Tests bei Untersuchung von 1004 negativen Serumproben. Die Spezifität wurde für den RPR Biokit (RPRBIO) mit 99 %, den RPR Becton Dickinson (RPRBD) mit 99,5 % und den RPR Sekisui (RPRSEK) mit 99,3 % ermittelt. Bei Schwangeren fanden sich BFP im RPRBIO und RPRBD bei jeweils 4/276 und RPRSEK bei 3/276 der Frauen, entsprechend einer Spezifität von 98,6 % bis 98,9 %. Alle RPR-Titer lagen im Bereich von 1:1 bis 1:4. Zweimal fanden sich übereinstimmend in den drei Tests BFP-Titer von 1:4, einmal bei einer Schwangeren und einmal bei einem Mann im Rahmen der STI-Screenings in einer Beratungsstelle. Die meisten diskrepanten Testresultate ergaben sich bei der Untersuchung der unverdünnten Serumproben (sogen. Titer 1:1) im RPRBIO. Hier spielen wahrscheinlich subjektive Bewertungsfaktoren bei der Testablesung die entscheidende Rolle. Ein Vorteil für den RPRBD ist die herstellenseits verfügbare Grenzwertkontrolle, die die Testbeurteilung erleichtert. Im RPRSEK ist die Testauswertung durch den Messvorgang im Analysegerät sichergestellt.

Für die Beurteilung der Aktivität und ggf. Behandlungsindikation einer durch den Nachweis T. pallidum-spezifischer Antikörper gesicherten Infektion ist die Lipoidantikörperdiagnostik von zentraler Bedeutung. Die nur qualitative Lipoidantikörperbestimmung ist wenig aussagekräftig, da Lipoidantikörper sowohl bei aktiver als auch zurückliegender Treponemeninfektion nachgewiesen werden können. In dieser Studie wurden 145 Treponemenantikörper positive Serum- bzw. Plasmaproben getestet. Im RPRBIO reagierten 101 (69,7 %), im RPRBD 99 (68,3 %) und im RPRSEK 92 (63,4 %) Proben. Die Befunddiskrepanzen (positiv/negativ) betrafen fast ausschließlich Restbefunde nach früherer Treponemeninfektion (Lues satis curata) mit Lipoidantikörpertitern $<1:4$.

Für die Bewertung der klinischen Relevanz von Lipoidantikörperbefunden mittels RPR oder VDRL wird grundsätzlich, nicht zuletzt auch wegen der Abgrenzung gegen niedrigtitrige BFP und wahrscheinliche Restbefunde nach zurückliegender Infektion, eine Titerbestimmung gefordert. Titer $\geq 1:8$ gelten bei unbehandelter Syphilis als Hinweis auf eine aktive behandlungsbedürftige Infektion [1,2,3,4,5,8].

Die Festlegung eines solchen testunabhängigen Grenztiters als Entscheidungskriterium für oder gegen eine Therapie setzt voraus, dass alle RPR- bzw. VDRL-Test vergleichbare quantitative Werte ergeben. Hinzu kommt, dass allgemein bei der Durchführung serologischer Tests Abweichungen von ± 1 Titerstufe als normale Variationsbreite akzeptiert sind. In Ringversuchen in Deutschland wird ein Resultat sogar als korrekt anerkannt, wenn es um zwei

Titerstufen vom Mittelwert der Teilnehmer abweicht. Bezogen auf einen Solltiter von z. B. 1:8 bedeutet dies, dass Werte von 1:4 bis 1:16 als korrekt angesehen werden müssen und erst Titer <1:2 oder >1:32 (< oder > zwei Titerstufen) als falsch zu werten wären.

Die Daten dieser Studie zeigen, dass die RPR-Titer von drei verschiedenen Tests keineswegs generell übereinstimmen.

Übereinstimmende Befunde (Abweichung ± 1 Titerstufe) ergaben sich in einer Größenordnung von 77,4% (RPRBIO/RPRBD) bis 90,5 % (RPRBIO/RPRSEK). Auffällig war insbesondere die Beobachtung, dass der RPRBD in 21,4 % der Fälle um zwei Verdünnungsstufen niedrigere Werte zeigte als der RPRBIO. Dies betraf vor allem Sera mit RPRBIO-Titern ab 1:32. Insgesamt waren die Titer des RPRBIO und des RPRSEK besser vergleichbar als die Befunde des RPRBD mit den beiden anderen Tests. Die gute Übereinstimmung konventioneller RPR-Kartentests und automatisierter RPR-Bestimmungsverfahren findet sich auch in Untersuchungen anderer Autoren [8,9]. Gegen den Einsatz des RPRSEK in der Routinediagnostik spricht jedoch, dass der Arbeitsaufwand für die Titerbestimmung relativ hoch ist, und eine sichere Endtiterbestimmung viel Erfahrung voraussetzt.

Insgesamt sind aus den Vergleichsdaten der RPR-Tests drei Folgerungen abzuleiten:

- 1) Bei Untersuchung von Proben mit den RPR-Tests verschiedener Hersteller sind Befundabweichungen bis zu zwei Titerstufen relativ häufig zu beobachten.
- 2) RPR-Test-Verlaufskontrollen sollten nach Möglichkeit mit dem gleichen Test im gleichen Labor untersucht werden.
- 3) Titerverläufe sollten im Parallelansatz mit dem Erstserum geprüft werden.

Zusätzlich zu den drei RPR-Test wurden in 98 RPR-positiven Proben VDRL-Antikörper auch im Treponema+VDRL-Blot der Firma Viramed untersucht. Im VDRL-Immunoblot werden weitaus überwiegend IgM-Antikörper nachgewiesen.

Wie wir bereits in früheren Studien zeigen konnten (RKI-Abschlussbericht für das Jahr 2010), kommt es im Verlauf der Syphilis nicht zu einem Switch der IgM- zu IgG-Antikörpern. Aus diesem Grunde ist kein Rückschluss aus einem VDRL-IgM-Antikörperbefund auf das potentielle Stadium der Syphilis abzuleiten. Der VDRL-Blot kann nicht als Bestätigungstest zur Abklärung von RPR-Befunden dienen, da falsch negative VDRL-Blot –Befunde nicht nur bei niedrigen RPR-Titern $\leq 1:4$ sondern auch bei höheren Titern von 1:8 bis 1:32 gefunden wurden.

Für die Abschätzung der klinischen Relevanz der Befunde ist die konventionelle RPR-Titerbestimmung besser geeignet, da die Bewertungskriterien klarer definiert sind. Aus den Blotbefunden ist dagegen lediglich ein Titerbereich abzuleiten.

Die Abschätzung der möglichen Aktivität einer Treponemeninfektion nur aufgrund der RPR-/VDRL-Titerwerte mit dem Kriterium $\geq 1:8$ wird vor allem in den U.S.A. und Ländern, die dem amerikanischen Diagnosekonzept folgen, praktiziert. In Deutschland erfolgt parallel

zur Lipoidantikörperbestimmung der quantitative Nachweis *T. pallidum*-spezifischer IgM-Antikörper z. B. mit dem 19S-IgM-FTA-ABS-Test. Dies hat den Vorteil, dass Infektionsstadien der Syphilis besser klassifiziert werden können. Bei der Erstinfektion mit *T. pallidum* sind die spezifischen IgM-Antikörper mehrere Wochen vor den Lipoidantikörpern nachweisbar. Nachfolgend kann dann bei schwach positiven Lipoidantikörpern bis 1:4 ebenfalls in der Regel aufgrund des deutlich erhöhten Treponemen-IgM-Antikörpertiters eine klare Aussage zur Behandlungsindikation getroffen werden.

Bei Reinfektionen ist der Lipoidantikörperbefund das entscheidende Kriterium (Titeranstieg um mindestens 2 Stufen bei bekannten Vorbefunden) oder hoher Lipoidantikörpertiter $\geq 1:8$).

Der IgM-Antikörperbefund ist variabel und kann negativ oder grenzwertig (19S-IgM-Titer $\leq 1:10$), schwach positiv (19S IgM-Titer 1:20) oder positiv (19S-IgM-Titer $\geq 1:40$) sein.

Die Tabellen 14 – 16 zeigen die Gegenüberstellung der 19S-IgM- und RPR-Antikörperbefunde für den jeweiligen RPR-Test.

Die Tabelle 17 demonstriert drei Fallgruppen zur Erkennung einer möglich aktiven Treponemeninfektionen. Bei der ersten Gruppe leitet sich der Verdacht nur aus dem Lipoidantikörperbefund (RPR $\geq 1:8$) ab. In der zweiten Gruppe gibt allein der erhöhte 19S-IgM-Titer $\geq 1:40$ einen entsprechenden Hinweis. In der dritten Gruppe sind beide Aktivitätsparameter deutlich erhöht. Da bei dem RPRBD die Titer etwas niedriger liegen als bei den beiden anderen Test finden sich in der Fallgruppe RPR $< 1:8$ /19S-IgM-Titer $\geq 1:40$ fünf Befunde mehr als in der RPRBIO-Gruppe und drei Befunde mehr als in der RPRSEK-Gruppe.

Die parallele Betrachtung sowohl der RPR- als auch der 19S-IgM-Befunde relativiert aber die Bedeutung der Signifikanzgrenze von 1:8 für die RPR-Tests. Fasst man alle auffälligen RPR- und 19S-IgM-Antikörperbefunde zusammen, ergeben sich unabhängig davon, welchen RPR-Test man zur Lipoidantikörperbestimmung eingesetzt hat, praktisch identische Informationen.

Für die Befundinterpretation zu beachten ist aber auch, dass nicht der Laborbefund allein das Kriterium für eine Behandlungsindikation darstellt. Leider fehlen für die Befundinterpretation in den meisten Fällen weiterführende Angaben zum aktuellen klinischen Befund und zur Infektions- und ggf. Behandlungsanamnese. Eine Therapieentscheidung muss aber alle verfügbaren Informationen für die abschliessende Beurteilung berücksichtigen.

Bad Salzuflen, den 29. April .2020

7. Literaturverzeichnis

1. AWMF-Leitlinie 059/002-S2K-Leitlinie. Diagnostik und Therapie der Syphilis. Stand 04/2020, im Druck
2. Seña AC, Pillay A, Cox DL, Radolf JD (2015) Treponema und Brachyspira, human host-associated spirochetes. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Landry ML, Funke G, Richter SS, Warnock DW (eds.) Manual of Clinical Microbiology 11th edition, ASM Washington, Chapt. 60, 1055 – 1081
3. Peeling RW, Mabey D, Kamb ML, Chen XS, Radolf JD, Benzaken AS (2017) Syphilis. Nat Rev Dis Primers:10773. doi:10.1038/nrdp.2017.73
4. MIQ 16 (2012) Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik: Syphilis (erarbeitet von Hagedorn HJ, Brockmeyer NH, Hunfeld KP, Münstermann D, Potthoff A, Schöfer H). Podbielski A, Herrmann M, Kniehl E., Mauch H, Rüssmann H (Hrsg.) Urban&Fischer. 2. Aufl.: 1-54
5. Cha SM, Matthias JM, Rahman M, Schillinger JA, Furness BW, Pugsley RA, Kidd S, Bernstein KT, Peterman TA (2018) Reactor grids for prioritizing syphilis investigations. Are primary syphilis cases being missed? Sex Transm Dis 45, 648-654
6. Rhoads DD, Genzen JR, Bashleben CP, Faix JD, Ansari MQ (2017) Prevalence of traditional and reverse algorithm Syphilis screening in laboratory practice. Arch Pathol Lab Med 141, 93-97
7. Rourk RA, Nolte FS, Litwin CM (2016) Performance characteristics of the reverse Syphilis screening algorithm in a population with a moderately high prevalence of Syphilis. Am J Clin Pathol 146, 572-577
8. Tsuboi M, Nishijima T, Aoki T, Teruya K, Kikuchi Y, Gatanaga H, Oka S (2018) Usefulness of automated latex turbidimetric Rapid Plasma Reagin test for diagnosis and evaluation of treatment response in Syphilis in comparison with manual card test: a prospective cohort study. J Clin Microbiol 56:e01003-18
9. Lee JH, Lim CS, Lee MG, Kim HS (2014) Comparison of an automated rapid plasma reagin (RPR) test with the conventional RPR card test in syphilis testing. BMJ open 4:e005664