

Rekombinant Antijenler Kullanan Bir Enzim “Immunassay” Testinin Sifiliz Taraması İçin Değerlendirilmesi

EVALUATION OF AN ENZYME IMMUNASSAY USING RECOMBINANT ANTIGENS FOR SYPHILIS SCREENING

Özgen Alpay ÖZBEK¹, Yavuz DOĞAN¹, İlknur Ebru AKÇAKANAT (AKYÜZ)²

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

²Giresun Kadın Doğum ve Çocuk Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, anti-*Treponema pallidum* antikorlarını saptamak için rekombinant antijen kullanan ve enzim “immunoassay” (EIA) prensibi ile çalışan bir testin (Trep-Screen ELISA) sifiliz taramasındaki performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Çalışmada, 2 örnek grubu kullanıldı. Birinci grupta kemilüminesan mikropartikül enzim “immunoassay” (CMIA) yöntemi ile yapılan taramada pozitif bulunan ve *Treponema pallidum* hemagglütinasyon, Western Blot IgM ve IgG testleri ile doğrulanan 79 örnek yer aldı. İkinci grupta CMIA taramasında pozitif bulunan ancak diğer testlerle doğrulanmayan 71 örnek değerlendirildi. Örneklerin tümü değerlendirilen EIA testi ile çalışıldı.

Bulgular: Testin duyarlılığı %97,5 (%95 güvenlik aralığı, %90,3-%99,6) olarak bulundu. EIA testinin ikinci gruptaki örneklerin %73,2’sinde negatif, %26,8’inde pozitif sonuç verdiği belirlendi.

Sonuç: Değerlendirmeye alınan EIA testinin kullanımını kolay ve sifiliz taraması için yeterli duyarlılığa sahip olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: Trep-Screen ELISA, sifiliz, test değerlendirilmesi

SUMMARY

Objective: The aim of this study is to evaluate the performance of an enzyme immunoassay (Trep-Screen ELISA) using recombinant antigens for determining anti-*Treponema pallidum* antibodies in screening syphilis.

Material and method: Two group of samples were used in the study. The first group composed of 79 samples which were positive in the chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) screening and were confirmed with *Treponema pallidum* haemagglutination assay, Western Blot IgM and IgG. The second group included 71 samples which were assessed to be positive in the CMIA screening but were not confirmed by the other tests. All of the samples were tested by evaluated EIA.

Results: the sensitivity of the test was calculated as 97.5% (95% confidence interval, 90.3%-99.6%). With the EIA, 73.2% of the results were negative and 26.8% of the re-

Özgen Alpay ÖZBEK

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji AD

35340, İnciraltı İZMR

Tel: (232) 4124512

Çep: (532) 7955115

e-posta: Alpay.ozbek@deu.edu.tr

sults were positive when second group samples were tested.

Conclusion: It was concluded that evaluated EIA test is easy to use and sensitive enough for syphilis screening.

Key words: Trep-Screen ELISA, syphilis, test evaluation

Sifiliz infeksiyonu, dünya çapında, özellikle de gelişmekte olan ülkelerde, yaygın önemli bir sağlık sorunudur. Etkeni bir spiroket olan *Treponema pallidum*'dur. Sadece insanda infeksiyon yapan bu hastalık, sıklıkla cinsel yolla olmak üzere, maternal yolla, kan nakli ile primer ve sekonder dönemlerdeki lezyonlardan direkt temasta bulaşabilir (1). Sifilizin görülme sıklığı tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de artış göstermektedir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre, 1991 yılında %0,047 olan sifiliz görülme sıklığı, 2002 yılında %0,052'ye çıkmıştır (2).

Sifilizin kan donörlerinde taranması, birçok ülkede olduğu gibi, ülkemizde de devam eden bir uygulamadır. Bu sayede, yalnızca kan alıcıları korunmakla kalmayıp, aynı zamanda aktif cinsel yaşamı olan genç erişkinlerde hastalık taraması da yapılmaktadır. Sifiliz taramasında uygulanan geleneksel yaklaşım, önce "nontreponemal" bir testle (Rapid Plasma Reagin; Venereal Disease Research Laboratory, VDRL) donörün taranması, pozitif çıkan olguların treponemal bir testle doğrulanmasıdır. Ancak, 2009 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün "Kan Donörlerinde Transfüzyonla Bulaşabilen İnfeksiyonların Taranması" adı ile yayınlamış olduğu rehberde taramanın öncelikle treponemal testlerle yapılması önerilmektedir (3). Rehberde "nontreponemal" testlerle taramanın yalnızca yüksek prevalansı olan ülkeler için uygun olduğu belirtilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün bu önerileri doğrultusunda ülkemizde de treponemal testlerin kullanımında bir artış beklenmektedir.

Treponemal esaslı ve enzim "immunoassay" (EIA) prensibi ile çalışan testlerin bir avantajı aynı zamanda otomasyona uygun olmalarıdır. Bu nedenle, sifiliz taraması için önümüzdeki dönemde yüksek kapasiteli kan merkezleri tarafından tercih edilecekleri düşünülmektedir. Treponemal esaslı EIA testlerinin performansı, tüm infeksiyon tanı testlerinde olduğu gibi, infeksiyonun prevalansından, hasta topluluğunun özelliklerinden, kullanılan antijenlerin yapısından (rekombinant yada doğal) ve çeşitliliğinden farklı şekillerde etkilenmektedir. Bu nedenle,

EIA testlerinin tarama amacına uygun koşullarda değerlendirilmesi gerekmektedir. Literatürde, hizmete sunulan testlerin sifiliz tanısında gösterdikleri performansları değerlendiren çok sayıda çalışma yayınlanmıştır (4-12). Bu çalışmada da, rekombinant TpN15, TpN17, TpN44.5 ve TpN47 antijenlerini kullanarak, anti-*Treponema pallidum* antikolarını saptayan bir EIA testinin (Trep-Screen ELISA, IBL International, Hamburg, Almanya) sifiliz taramasında gösterdiği performansın değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın grubu ve tasarımı

Bu çalışmada kullanılan örnekler 20.07.2006 / 10.11.2008 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezine başvuran toplam 35597 kan donörünün kemilüminesan mikropartikül enzim "immunoassay" (CMIA) yöntemi kullanan "Architect Syphilis TP" (Architect i2000; Abbott Japan Co., Tokyo, Japonya) testi ile taranması sonucu pozitif bulunan 177 serum örneği arasından seçildi. Örnek seçme ölçütü olarak serum miktarının çalışılacak testler için yeterli olması ve örneğin doğrulama testleri ile gerçek pozitif veya negatif olduğunun gösterilmesidir. Dışlama ölçütleri ise, yetersiz serum miktarı ve donörlerin klinik durumları izlenemediği için, her 3 doğrulama testinin ortak sonucunun belirsiz ("indeterminate") bulunmasıdır.

Kan donörlerinde yapılan ilk taramada tekrarlayan pozitif bulunan örneklerin doğrulanması için Uluslararası Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar Birliği tarafından 2008 yılında yayınlanan rehberdeki öneriler esas alındı (13). Bu rehberde, EIA testlerinin *Treponema pallidum* hemagglütinasyon (TPHA) testi ile doğrulanması, uyumsuz çıkan sonuçlar için örneklerin "immunoblot" yöntemi ile yeniden çalışılması önerilmektedir. Ayrıca, bu çalışmada birleşik altın standart yöntemi kullanıldı. Bunun nedeni, EIA testinin diğer enzim "immunoassay" esaslı testlerde olduğu gibi doğrulama testlerinden daha duyarlı olabilme olasılığıdır (14).

Bu öneriler doğrultusunda CMIA tekrarlayan pozitif örneklerin doğrulanması için TPHA, Western Blot IgM ve IgG (WB IgM, WB IgG) testleri çalışıldı. Doğrulama ölçütü olarak her üç doğrulama testinden birinde pozitiflik saptanması yeterli bulundu. Her üç test sonucu negatif çıkan örnekler de gerçek negatif kabul edildi. Bunların yanında, TPHA sonucu negatif; WB IgM ve IgG sonuçlarından herhangi birisi belirsiz diğeri negatif veya belirsiz ("indeterminate") örneklerin doğrulanma sonucu belirsiz kabul edildi ve çalışma dışı bırakıldı.

Performans değerlendirmesi 2 farklı çalışma grubu ile yapıldı. Çalışmadaki ilk grupta kan donörlerinde tarama amacıyla çalışılan CMIA yöntemi ile pozitif bulunan ve doğrulama testleri ile gerçek pozitif olduğu doğrulanan 79 örnek yer aldı. Bu grup ile yapılan çalışmada özgül anti-*Treponema pallidum* antikorlarını taramayı hedefleyen EIA testinin duyarlılık düzeyi belirlendi. İkinci grupta, CMIA yöntemi ile kan donörlerinde yapılan taramalarda pozitif bulunan, ancak doğrulama testleri ile doğrulanmamış 71 yalancı pozitif örnek çalışıldı. İkinci grupta yapılan değerlendirmenin amacı, EIA testinin CMIA yöntemi ile yalancı pozitif bulunan örneklerdeki performansının değerlendirilmesidir. Çalışmada EIA testinin özgüllüğü hesaplanmadı. Bunun nedeni, büyük bir toplulukta CMIA yöntemi ile yapılan ön taramanın EIA testlerinde yalancı pozitif sonuç veren serumları seçmiş olması, dolayısıyla çalışma grubunun toplumun gerçek durumunu yansıtmamasıdır.

Toplam 150 örnek ile EIA testi çalışıldı. Örnekler çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı. Çalışma öncesi oda ısısına getirilen tüm örnekler tekrar santrifüjlendi. EIA test sonuçlarına ait duyarlılık değeri %95 güven aralığında (GA) Epi Info Sürüm 6 programı kullanılarak hesaplandı.

Laboratuvar Testleri

EIA testi üretici firmanın yönergesi doğrultusunda, örneklerin doğrulama sonuçlarından habersiz kişilerce çalışıldı. Öncelikle, kontrol ve serum örneklerinden 100'er mikrolitre rekombinant *T. pallidum* antijenleri (TpN15, TpN17, TpN44.5 ve TpN47) ile kaplı çukurcularda 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Yıkama işlemi ile bağlanmamış antikorlar uzaklaştırıldıktan sonra çukurların tümüne 100'er mikrolitre peroksidadla işaretleme rekombinant *T. pallidum* antijenleri (konjugat) pipetlendi.

Testin birinci basamağında oluşan immunkompleksle bağlanmayan konjugat antijenleri yıkama ile uzaklaştırıldı. Son basamakta, ortama 100'er mikrolitre TMB substrat solüsyonu eklenmesi ile özgül antikor pozitif örneklerde renklenme gözlemlendi. Reaksiyon 100'er mikrolitre asit solüsyonla durduruldu ve örneklerin optik densiteleri 450-620 (referans) nm'de ölçüldü. Test sonuçlarını değerlendirmesinde, çalışma örnekleri ve kontrol serumlarına ait ölçüm değerlerinin "cut-off" değerine bölünmesi ile ortaya çıkan oran esas alındı. Bu oranın 1.2 ve daha yüksek olması pozitif, 0.8'den küçük olması negatif ve bu iki değer arasında olması belirsiz olarak kabul edildi.

"Architect Syphilis TP" testinde insan serum veya plazmasında rekombinant *T. pallidum* antijenlerine (TpN15, TpN17 ve TpN47) karşı oluşmuş özgül antikorların varlığı kemilüminesan reaksiyonu yardımı ile ortaya çıkarılmaktadır. Bu test üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda çalışıldı ve değerlendirildi.

TPHA testi Immutrep TPHA, (Omega, Scotland, İngiltere) ticari kiti ile üretici firma yönergesine göre çalışıldı. Testin prensibi hasta serumlarının duyarlılaştırılmış ve duyarlılaştırma işlemi yapılmamış eritrositlerin U tabanlı mikro çukurcularda karşılaştırma esasına dayanmaktadır. Hasta serumunda *T. pallidum*'a karşı oluşan özgül antikor varlığında duyarlılaştırılmış hücrelerde aglütinasyon gözlenmektedir. Hasta serumlarının 1/80 dilüsyonunda aglütinasyonun gözlenmesi pozitif olarak değerlendirildi.

WB testi Euroimmun WesternBlot IgG ve IgM (Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Almanya) testleri ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı. Hasta örnekleri test stripleri içeren kanalcıklara pipetlendikten sonra yıkama, inkubasyon ve reaksiyonu durdurma işlemleri Euroblotmaster cihazı ile otomatik, strip okuma işlemleri Eurolinescan cihazı ile dijital olarak gerçekleştirildi. Test stripleri *T.pallidum*'a özgül TpN15, TpN17, TmpA, TpN47 ve özgül olmayan p22 antijenini içermektedir. Hasta serumunda özgül antikor varlığında *T.pallidum* antijenlerinde renklenme oluşmaktadır. WB IgM testi için özgül antijenlerin en az birinde güçlü reaksiyon gözlenmesi pozitif, zayıf reaksiyon gözlenmesi belirsiz olarak yorumlandı. WB IgG testinde örneğin pozitif olabil-

mesi için en az iki özgül antijende güçlü reaksiyon arandı, bir antijen bandında güçlü reaksiyon veren örnekler ise belirsiz olarak değerlendirildi.

BULGULAR

EIA testi doğrulama testleri ile birinci gruba ait gerçek pozitif 79 örneğin 77'sinde pozitif, 2'sinde negatif sonuç verdi (Duyarlılık %97,5; %95 GA %90,3 - %99,6). Bu örneklerin doğrulama test sonuçları ile karşılaştırılması Tablo 1'de gösterildi. Negatif bulunan 2 örneğin (örnek / eşik değerleri; 0,19 ve 0,18) TPHA testleri negatif, WB IgG testleri belirsiz ve WB IgM testleri pozitif olarak saptandı. WB IgM pozitif bantlar incelendiğinde, her iki örneğin Tpn17 bantlarında pozitiflik olduğu belirlendi. Örneklerin WB IgG stripleri değerlendirildiğinde örneklerin birinde Tpn15 diğesinde Tpn47 bandında güçlü renklenme olduğu saptandı. Bunun yanında, EIA testinin diğer WB IgM pozitif 5 örnekte pozitif sonuç verdiği belirlendi. Bu 5 örneğin aynı zamanda TPHA ve WB IgG testleri de pozitif.

Tablo. 1. I. Grup örneklerin EIA sonuçlarının doğrulama testleri sonuçlarının karşılaştırılması

Örnek Sayısı n (%)	EIA	TPHA	WB IgG	WB IgM
55 (69,7)	P	P	P	N
9 (11,4)	P	P	B	N
5 (6,3)	P	P	N	N
5 (6,3)	P	P	P	P
3 (3,8)	P	N	P	N
2 (2,5)	N	N	B	P

P= Pozitif, N= Negatif, B= Belirsiz

İkinci gruptaki 71 örnekle, yani CMIA yöntemi ile pozitif ancak her 3 doğrulama testi ile negatif, EIA testi 52 (%73,2) negatif, 19 (%26,8) pozitif sonuç verdi. Yalancı pozitif bulunan örneklerin örnek /eşik değerlerinin 1,53 - >8,55 arasında değiştiği gözlemlendi.

EIA testi ile örneklerin hiç birinde belirsiz sonuç saptanmadı.

TARTIŞMA

Bir tarama testinde aranan en önemli performans ölçütü geniş topluluklar içindeki gerçek hastaları saptaya-

bilmesi, yani duyarlılığının yüksek olmasıdır. Genel olarak tarama testlerinde duyarlılığının %95'den yüksek olması istenirken, özgüllüğünün doğrulama testlerinden düşük olması olağan karşılanmaktadır (15). Treponemal tarama testlerinde duyarlılığı azaltan yalancı negatif sonuçların nedenleri araştırılmış ve infeksiyonun başlamasından sonra yaklaşık 2-4 hafta süren, yetersiz antikor üretimi ile karakterize pencere döneminin varlığı ile açıklanmıştır (16,17). Treponemal testlerde görülen yalancı pozitif sonuçların nedenleri ise otoimmün hastalıklar, HIV infeksiyonu, hamilelik ve intravenöz uyuşturucu kullanılması olarak sıralanmıştır (13).

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, EIA testinin duyarlılığı %97,5 olarak hesaplandı ve bir tarama testi olarak kullanıldığında yeterli olduğu düşünüldü. Testin yalancı negatif sonuç verdiği 2 hastanın doğrulama sonuçları incelendiğinde, her iki örneğin WB IgM testinin pozitif, WB IgG testinin belirsiz ve TPHA testinin negatif olduğu görüldü. Literatürde bazı yazarlar anti-treponemal IgM test sonuçlarının 1-2 hafta sonra tekrarlanmasını önermektedir (9). Çalışmamızın bir kısıtlılığı bu donörlere ulaşamamasıdır. Dolayısıyla, WB IgM testleri tekrar çalışılmamış ve WB IgG testinin pozitifleştiği gösterilememiştir. Bununla birlikte, WB IgM pozitifliği ve yine bir treponemal EIA testi olan Architect Syphilis TP'nin bu örneklerde pozitif sonuç vermesi örneklerin infeksiyonun erken primer döneminde alındığını düşündürmektedir. EIA yöntemi ile çalışan treponemal testlerin primer sifiliz olgularındaki duyarlılıkları literatürde değişkenlik göstermektedir. Schmidt ve ark. 52 primer sifiliz olgusunun serum örneklerini 9 farklı EIA kiti ile çalışmışlar ve testlerin duyarlılıklarının %48,5 - 76,9 arasında değiştiğini bulmuşlardır (10). Yazarlar, bu oranların düşük olduğunu, ancak nontreponemal testlerin performansları ile karşılaştırıldığında EIA testlerinin daha başarılı bulunduğunu vurgulamışlardır. Bir başka çalışmada, Young ve ark 79 primer dönem hastasında iki farklı EIA testinin duyarlılıklarını %97,5 ve %77,2 bulmuşlardır (11). Bizim çalışmamızda, primer dönem olgularına ait olabilecek (WB IgM pozitif) örnek sayısı yalnızca 7'dir. Bu sayı testin primer sifiliz olgularındaki performansının değerlendirilmesi için yeterli değildir.

Değerlendirilen EIA testi CMIA yöntemi ile pozitif bulunan, ancak doğrulama testleri ile doğrulanmayan ikinci

gruptaki 71 örneğin 52'sinde negatif, 19'unda pozitif sonuç verdi. Çalışma grubu CMA yöntemi ile 35597 örnek arasından negatiflerin elenmesi ve yalancı pozitiflerin seçilmesi sonucu oluşturulmuştur. Bu büyüklükteki bir topluluk içinde yalancı pozitifliğe neden olabilecek yukarıda sayılan klinik tabloların %0,1 oranında görülmesi olağan bir durum olarak değerlendirilmiştir. Kan merkezi laboratuvar kayıtları incelendiğinde yalancı pozitiflik nedenlerinden biri olan HIV enfeksiyonunun örneklerin hiç birinde saptanmadığı görülmüştür. Bununla birlikte, donörlerin izlemi yapılamadığından EIA testi ile pozitif bulunan doğrulanmamış 19 örneğin neden yalancı pozitif sonuç verdiği aydınlatılamamıştır. İkinci çalışma grubunda geriye kalan örneklerin %73,8'inde EIA testi negatif sonuç vermiştir. Bu çalışma grubunda yalancı pozitiflik oranının CMA yöntemine göre düşük kalması EIA testinin olumlu bir özelliği olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada testin özgüllüğü değerlendirilmemiştir. Sifiliz tanısında kullanılan ticari EIA testlerin özgüllükleri için literatürde bildirilen değerler ise oldukça yüksektir. Schmidt ve ark. yaptıkları değerlendirmede EIA testlerin özgüllüklerinin %99,5 - 99,8 arasında değiştiğini bildirmişlerdir (10). EIA yöntemi ile çalışan 10 farklı ticari testin değerlendirildiği bir başka çalışmada bir testin özgüllüğü %99,2 diğerlerinki %100 bulunmuştur (12). Architect Syphilis TP ile yapılan çalışmalarda ise testin özgüllüğü %99,1 ve %98,4 olarak bildirilmiştir (11,18).

Bu çalışmanın bir kısıtlılığı, yalnızca Architect Syphilis TP pozitif örneklerin çalışmaya alınmış olmasıdır. Bu test sifiliz tanısında majör antijen olarak belirtilen *T.palliduma* özgü 4 proteinin 3'nü (TpN15, TpN17 ve TpN47) kullanmaktadır (19). Bu nedenle, EIA bulunan ve dördüncü majör antijen olarak adlandırılan TmpA proteininin (TpN45) tek başına pozitif olduğu örnekler çalışmada yer almamış ve testin performansı bu açıdan değerlendirilememiştir.

EIA testi kontrol ve "cut-off" serumlarının renkli olması, örneklerin dilüsyonsuz çalışılması, striplerinin kırılabilir olması gibi nedenlerle çalışanlar tarafından çalışması kolay bir test olarak tanımlanmıştır. Ayrıca bu çalışmada yer alan 150 serumun hiç birinde testin belirsiz sonuç vermemesi sonuçların yorumlanmasında kolaylık sağlamıştır.

Sonuç olarak, EIA testi kullanımı kolay ve tarama testi olarak kullanıldığında duyarlılığı yeterli bulundu.

BİLGİLENDİRME

Bu çalışmada kullanılan Trep-Screen ELISA testi Özmen Tıbbi Lab. Teş. A.Ş. tarafından ücretsiz temin edilmiştir. Yazarların ticari firma ile test temini dışında bir çıkar ilişkisi bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Peeling RW, Mabey DC. Syphilis. Nat Rev Microbiol 2004;2:448-449.
2. Ağaçfıdan A, Akın L. Türkiye'de Cinsel Yolla Bulaşan Enfeksiyonlar (CYBE) ve HIV/AIDS'in Sürveyans Sistemine İlişkin Durum Analizi. T.C.Sağlık Bakanlığı Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü. 2007.
3. World Health Organization. Screening donated blood for Transfusion-Transmissible Infections, Recommendations. Ed. Dhingra N, 2009;30-35.
4. Knight CS, Crum MA, Hardy RW. Evaluation of the LIAISON chemiluminescence immunoassay for diagnosis of syphilis. Clin Vaccine Immunol 2007;14:710-713.
5. Marangoni A, Sambri V, Accardo S, et al. Evaluation of LIAISON Treponema Screen, a novel recombinant antigen-based chemiluminescence immunoassay for laboratory diagnosis of syphilis. Clin Diagn Lab Immunol 2005;12:1231-1234.
6. Sambri V, Marangoni A, Simone MA, D'Antuono A, Negosanti M, Cevenini R. Evaluation of recomWell Treponema, a novel recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of syphilis. Clin Microbiol Infect 2001;7:200-205.
7. Tsang RS, Martin IE, Lau A, Sawatzky P. Serological diagnosis of syphilis: comparison of the Trep-Chek IgG enzyme immunoassay with other screening and confirmatory tests. FEMS Immunol Med Microbiol 2007;51:118-124.
8. Ebel A, Bachelart L, Alonso JM. Evaluation of a new competitive immunoassay (BioElisa Syphilis) for screening for Treponema pallidum antibodies at various stages of syphilis. J Clin Microbiol. 1998;36:358-361.
9. Manavi K, Young H, McMillan A. The sensitivity of

- syphilis assays in detecting different stages of early syphilis. *Int J STD AIDS* 2006;17:768–771.
10. Schmidt BL, Edjlalipour M, Luger A. Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary syphilis. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1279-1282.
 11. Young H, Pryde J, Duncan L, Dave J. The Architect Syphilis assay for antibodies to *Treponema pallidum*: an automated screening assay with high sensitivity in primary syphilis. *Sex Transm Infect* 2009;85:19-23.
 12. Cole MJ, Perry KR, Parry JV. Comparative evaluation of 15 serological assays for the detection of syphilis infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:705-713.
 13. French P, Gomberg M, Janier M, Schmidt B, van Voorst Vader P, Young H. IUSTI: 2008 European Guidelines on the Management of Syphilis. *Int J STD AIDS* 2009; 20: 300-309.
 14. Banoo S, Bell D, Bossuyt P, et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4:21-31.
 15. Elder, BL, Hansen, SA, Kellogg, JA, Marsik, FJ, and Zabransky, RJ. *Verification and Validation Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory, Cumitech 31*, coordinating eds, BW McCurdy, American Society for Microbiology, Washington, DC.
 16. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:1-21.
 17. Nandwani R, Evans DT. Are you sure it's syphilis? A review of false positive serology. *Int J STD AIDS*. 1995;6:241-248.
 18. Marangoni A, Moroni A, Accardo S, Cevenini R. Laboratory diagnosis of syphilis with automated immunoassays. *J Clin Lab Anal* 2009;23:1-6.
 19. Norris SJ. Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. *Treponema Pallidum Polypeptide Research Group. Microbiol Rev* 1993; 57: 750-779.