

MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM

MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM

REF 630525

10 x 10 Tests

UDI-DI 4250729700071

**Gebrauchsanweisung /
Instructions for Use /
Notice d'utilisation**

**Nur zur Verwendung durch Fachpersonal /
For professional use only /
Exclusivement pour un usage professionnel**

CE 2797

	Deutsch	Seiten	02-07
	English	Pages	08-12
	Français	Pages	12-17

MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM

Immunfluoreszenztest zum Nachweis von IgM-Antikörpern gegen *Treponema pallidum* in humanem Serum und Plasma.

Verwendungszweck

Semiquantitativer (titrierbarer) Immunfluoreszenztest zum Nachweis und zur Bestätigung von gegen *Treponema pallidum* gerichteten IgM-Antikörpern in Humanserum und Plasma als Hilfe zur Diagnose von Syphilis.

Der Assay ist für die manuelle Verwendung geeignet und nur für die professionelle In-vitro-Diagnostik vorgesehen. Alle Labortestergebnisse sollten in Verbindung mit anderen klinischen Daten interpretiert werden. Das klinische Urteil und weitere Tests müssen zusätzlich berücksichtigt werden.

Wichtiger Hinweis zur Gebrauchsanweisung

Bei etwaigen Assay-relevanten Änderungen der Gebrauchsanweisung wird das auf der letzten Seite stehende Versionsdatum aktualisiert. Für einen Zeitraum von 3 Monaten nach Vergabe der neuen Versionsnummer werden die Änderungen auf einem farbigen Beiblatt gekennzeichnet. Bitte stellen Sie sicher, dass Sie immer mit der aktuellen Gebrauchsanweisung arbeiten.

Testprinzip

Das verdünnte Probenmaterial sowie die negativen und positiven Kontrollen oder Kalibratoren werden auf die Wells des Objektträgers pipettiert und inkubiert. Die Wells sind mit gereinigten Erregerantigenen beschichtet. Sofern spezifische Antikörper im Probenmaterial sind, binden diese an die Erregerantigene auf den Wells und bilden mit diesen einen stabilen Antigen-Antikörper-Komplex. Unspezifisch oder nicht gebundene Antikörper werden in einem Waschschrift entfernt. An die spezifischen Komplexe binden dann in einer Konjugatreaktion FITC-gekoppelte Anti-human-IgM-Antikörper. Anschließend wird nicht gebundenes Konjugat durch einen Waschschrift entfernt. Im Fluoreszenzmikroskop werden die Wells ausgewertet. Liegen Antikörper im Probenmaterial vor, fluoreszieren die immunreaktiven Bereiche des Antigens.

Packungsinhalt

- SLIDE Objektträger**
10 Objektträger mit je 10 Auftragsstellen, die mit *Treponema pallidum* Spirochäten (Stamm Nichols) beschichtet wurden.
- CONTROL+ Positivkontrolle**
1 x 0,5 mL Anti-*T. pallidum* IgM-positives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig. (potentiell infektiös, siehe Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen)
Die Lösung enthält < 0,1 % (w/v) Natriumazid und Proclin (0,1 % v/v) als Konservierungsmittel.
- CONTROL- Negativkontrolle**
1 x 0,5 mL *Treponema pallidum* IgM negatives Kontrollserum; human; gebrauchsfertig. (potentiell infektiös, siehe Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen)
Die Lösung enthält < 0,1 % (w/v) Natriumazid als Konservierungsmittel.
- CONJ M FITC-Konjugat IgM**
1 x 3 mL Anti-human-Immunglobulin (Kaninchen, μ -Kette), mit FITC (Fluorescein Isothiocyanat) konjugiert; gebrauchsfertig. Die Lösung enthält Proclin (0,1 % v/v) als Konservierungsmittel.
- BUFFER PBS**
2 Sachets mit 10 g PBS. Je 1 Päckchen (10 g) in 1 Liter destilliertem oder deionisiertem Wasser auflösen.
Den pH des Puffers auf pH 7,2 \pm 0,2 einstellen.
- MOUNTING MEDIUM Eindeckmedium**
1 x 3 mL glyceringepuffertes Eindeckmedium; gebrauchsfertig. Die Lösung enthält Proclin (0,1 % v/v) als Konservierungsmittel.
- SORBENT Sorbent/Ultrasonikat**
1 x 4 mL *Treponema reiteri* Ultrasonikat; flüssig, gebrauchsfertig. Die Lösung enthält < 0,1 % (w/v) Natriumazid als Konservierungsmittel.
- MASTSORB Mastorb**
1 x 6 mL Rheumafaktor Absorbent, Anti-human IgG, Ziege, gebrauchsfertig. Die Lösung enthält < 0,1 % (w/v) Natriumazid als Konservierungsmittel.
- Gebrauchsanweisung**

Weitere verwendete Abkürzungen

- RTU** gebrauchsfertig

Zusätzlich benötigte Materialien

1. Sterile Reaktionsgefäße
2. Mikropipetten und dazu passende Spitzen
3. Küvetten
4. Feuchte Kammer
5. Messkolben oder Messbecher
6. Destilliertes oder deionisiertes Wasser
7. Pinzette
8. Deckgläser
9. Spritzflasche (Wasch- bzw. Pufferflasche)
10. Fluoreszenzmikroskop mit einer FITC-geeigneten Filterkombination (z.B 490 nm Anregungsfilter und 510 nm Sperrfilter).

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Das Kit dient nur zu *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 frei von Detergenzien sind.
7. Die im Kit enthaltenen Kontrollen/Kalibratoren sind Humanproben. Sie werden auf Antikörper gegen das HI-Virus, HCV und HBsAg getestet wurden und für negativ befundet wurden. Dennoch sollten alle menschlichen Proben als potentiell infektiös angesehen werden. Infektionen durch infektiöses oder mikrobiell kontaminiertes Material können nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.
8. Keine Reagenzien unterschiedlicher Chargen mischen, da diese in jeder Charge aufeinander abgestimmt sind.
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 Wells verhindern.
11. Die Objektträger 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 Flächendesinfektions-

mittel gemäß der Anwendungsvorschrift dekontaminieren. Glasgefäße o. ä. können bei 121 °C autoklaviert werden.

13. FITC-Konjugate sollen nicht dem Sonnen-, UV- oder Fluoreszenzlicht ausgesetzt werden. Sofern die Konjugate nicht benötigt werden, diese lichtgeschützt aufbewahren.
14. Proben, die erkenntlich mikrobiologisch kontaminiert sind, nicht verwenden.
15. Keine hämolytischen, lipämischen oder ikterischen Proben verwenden.
16. Natriumazid wird als Konservierungsmittel verwendet und kann bei Aufnahme zu Vergiftung führen. Natriumazid kann mit Metallverbindungen (Kupfer, Blei) explosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung von Azidreagenzien über den Laborabfluss, daher mit viel Wasser nachspülen.
17. Nur Wasser von hoher Qualität verwenden (destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität).

Lagerung und Stabilität

Der MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM 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.

Nach dem Öffnen sind die Reagenzien für 90 Tage haltbar. Ein geöffneter Objektträger sollte innerhalb des Arbeitstages verbraucht werden.

Der PBS-Puffer ist nach dem Auflösen 30 Tage stabil, wenn er bei 2–8 °C aufbewahrt wird.

Zur Haltbarkeit von Proben (Serum, Plasma, Liquor) gelten die allgemeinen Fachempfehlungen zur Aufbewahrung. In der Regel können Proben bis zu 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.

Probenmaterial

Probenmaterial (Serum / Plasma) wird durch Fachpersonal nach aktuellen Standards / Best-Practice-Richtlinien entnommen. Nach derzeitigem Kenntnisstand kann eine Infektion durch kontaminiertes Blut nicht vollständig ausgeschlossen werden. Jegliches Probenmaterial sollte daher als potentiell infektiös behandelt werden.

Die Proben können 3 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Bei längerer Aufbewahrung Proben sofort nach Entnahme in Aliquots aufteilen und bei -20 °C einfrieren.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden!

Aufgetaute Proben sollten vor der Verwendung im Test gemischt (Vortex) werden.

Lipämische, ikterische, hämolytische oder bakteriell kontaminierte Proben können falsche Ergebnisse ergeben.

Testdurchführung

1. Vor dem Testansatz alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen (mindestens 20 °C).
2. 1 Sacht des PBS-Puffers mit 1 L destilliertem oder deionisiertem Wasser lösen.
3. Das Sorbent sowie das Mastsorb sind gebrauchsfertig.
4. Die Proben werden wie folgt vorbereitet.
 - 20 µL Sorbent + 60 µL Mastsorb sorgfältig mischen.
 - 20 µL unverdünntes Patientenserum / -plasma zugeben und sorgfältig mischen.

Die Kontrollen dürfen nicht absorbiert werden.

5. Den Ansatz 30 min bei 37 °C inkubieren.

Nach der Inkubation den Ansatz für 5 min zentrifugieren (3000 rpm in einer Eppendorfszentrifuge)
6. Den eingeschweißten Objektträger aus der Alutüte herausnehmen. Darauf achten, nicht die Wells zu berühren.
7. Je 20–25 µL der Kontrollen oder der verdünnten Patientenproben auf ein Well pipettieren. Die Probe soll das ganze Well bedecken. Mit der Pipettenspitze dabei nicht über das Well kratzen.
8. Die Objektträger in eine feuchte Kammer legen und 60 min bei 37 °C inkubieren.
9. Nach der Inkubation die Objektträger sorgfältig mit PBS aus einer Waschflasche waschen, wobei darauf zu achten ist, dass der Strahl nicht auf die Testfelder gerichtet wird. Hierzu kann der Strahl des PBS entlang der Mitte des Objektträgers gerichtet sein, wobei der Objektträger zuerst in Richtung der Vertiefungen 1-5 und dann in Richtung 6-10 gekippt wird.
10. Die Objektträger in einer Küvette mit PBS 15 min bei Raumtemperatur waschen. Ein Wechseln des Puffers nach 5 min erhöht die Waschstringenz.
11. Die Objektträger aus dem Puffer nehmen und den Puffer kurz von der Maske abklopfen, indem man mit der Längsseite des Objektträgers auf eine saugfähige Unterlage klopft. Nie mit einem Papiertuch o.ä. über die Wells wischen!
12. Die Objektträger sofort in die feuchte Kammer legen und einen Tropfen des entsprechenden FITC-Konjugats (20–25 µL) auf jedes Well tropfen. Das Konjugat soll das ganze Well bedecken. Die Wells dürfen nach dem Waschschritt zu keinem Zeitpunkt eintrocknen!
13. Die Objektträger in der feuchten Kammer 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren.
14. Nach der Konjugatinkubation die Objektträger wie unter den Pkt. 9 und 10 beschrieben waschen.
15. Einen kleinen Tropfen Eindeckmedium auf jedes Well tropfen und mit einem Deckglas den Objektträger luftblasenfrei eindecken.

Hinweis: Wird zu viel Eindeckmedium auf die Wells getropft, so kann das Deckglas beim Mikroskopieren leicht verrutschen. Dieses mit einem saugfähigen Papiertuch entfernen. Zudem kann überschüssiges

Eindeckmedium zu einer Lichtstreuung führen, was eine hohe Hintergrundfluoreszenz zur Folge hat.

16. Die Reaktionen können nun mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Es empfiehlt sich dabei eine 400- bis 800-fache Vergrößerung.

Auswertung und Interpretation

Die Kontrollen müssen den Reaktionen auf dem chargenspezifischen QC-Zertifikat entsprechen. Die Angaben in der Tabelle dienen der Orientierung und reflektieren nicht die jeweils aktuelle Charge.

Probe	Erwartetes Ergebnis
Positivkontrolle	1 + bis 4 +
Negativkontrolle	negativ *

* negativ: Treponemen können im Einzelfall sichtbar sein, dürfen aber nicht fluoreszieren.

Zur korrekten Beurteilung der Patientenproben sollten immer die Positiv- und Negativkontrolle mit herangezogen werden.

Sollen die Proben oder die Kontrollen zur Titerbestimmung weiter verdünnt werden, so können, ausgehend vom Suchtiter, seriell weitere Verdünnungsstufen mit PBS hergestellt werden.

Interpretation der Patientenreaktionen

Positive Proben zeigen eine grüne Fluoreszenz der Treponemen. Die Fluoreszenz kann je nach Antikörperkonzentration in der Intensität variieren.

Im IgM-Ansatz können die fluoreszierenden Treponemen im Randbereich leicht unscharf wirken. Dies ist ein normales Bild im IgM-Ansatz.

Die Intensität der Fluoreszenz kann von 1+ bis 4+ bewertet werden. Bei Austitrierung einer Probe definiert die 1+ Intensität den Endtiter.

In der Regel ist die Hintergrundreaktion im IgM-Ansatz etwas höher als beim IgG-Nachweis.

Grenzwertige Proben zeigen eine sehr schwache, grünliche Fluoreszenz (+/-) der Treponemen.

Negative Proben sind in der Regel dunkel, Treponemen sind nicht sichtbar. Grün gefärbte, jedoch nicht fluoreszierende Treponemen sind als NEGATIV zu bewerten.

Negativ zu bewerten sind auch Proben, bei denen eine inhomogene Fluoreszenz in der 1:5 Suchverdünnung vorliegt. In diesem Fall sind einzelne oder auch nur Teile der Treponemen fluoreszierend, andere Treponemen sind nur grün gefärbt.

Grenzen des Nachweisverfahrens/Interferenzen

1. FTA-ABS IgM Test kann gelegentlich falsch positive Ergebnisse liefern. Dies kann insbesondere bei einigen Schwangerenseren, bei Lepra und beim Systemischen Lupus erythematodes auftreten (Lit. 5, 6).

2. Bei Proben die hohe Borrelien-Antikörpertiter aufweisen (> 1:640) können die Treponemen leicht grün fluoreszieren.
3. Der FTA-ABS IgM Test ist hoch-sensitiv und hoch-spezifisch. Dennoch sollte 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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:
 - a) 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.
 - b) Tests zur Bestimmung von Antikörpern gegen pathogene Treponemen-Antigene, wie z. B. im Häm- oder Partikelagglutinationstest (TPPA) und im Fluoreszenz-Treponemen-Antikörper Absorptionstests (FTA-ABS).

Leistungsdaten

Sensitivität und Spezifität

Der Assay wurde über ein Probenpanel bestehend aus 354 Serum und Plasma Proben validiert. Das Panel wurde gebildet aus positiven und negativen klinischen Proben. MASTABLOT™ TP IgM (Mast Diagnostica, Reinfeld, Germany, REF 6653M08) und SERODIA®-TP•PA (Fujirebio Inc., Tokyo, Japan, REF 226414) wurden als Referenzassays gewählt.

Die analytische Leistung wurde wie folgt berechnet:

	Formel	Wert
Sensitivität	$\frac{TP}{(TP + FN)}$	95,73 %
Spezifität	$\frac{TN}{(TN + FP)}$	91,14 %
Positiver prädiktiver Wert	$\frac{TP}{(TP + FP)}$	84,21 %
Negativer prädiktiver Wert	$\frac{TN}{(TN + FN)}$	97,74 %
Effizienz	$\frac{(TP + TN)}{total}$	92,66 %
Positives Likelihood-Verhältnis	$\frac{(Sens)}{(1 - Spec)}$	10.80
Negatives Likelihood-Verhältnis	$\frac{(1 - Sens)}{(Spec)}$	0.05

(Abkürzung: TP: Echt positiv, TN: Echt negativ, FN: Falsch negativ, FP: Falsch positiv)

Richtigkeit

Sensitivität und Spezifität des MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM sind vergleichbar zu den beiden getesteten Referenzassays.

Kreuzreaktivität

20 Borrelienproben wurden auf Kreuzreaktivität getestet. Sera mit einem hohen anti-Borrelia Antikörper Titer gaben teilweise falsch positive Ergebnisse (siehe Grenzen des Nachweisverfahrens/Interferenzen).

Rückverfolgbarkeit

Die INSTAND e. V. RV 311, 2012, Pr. 61 (Serum RVTP 5) Probe ist eine IgM-positive Probe und kann zur Einstellung des als Positivkontrolle verwendeten Serums verwendet werden.

Präzision

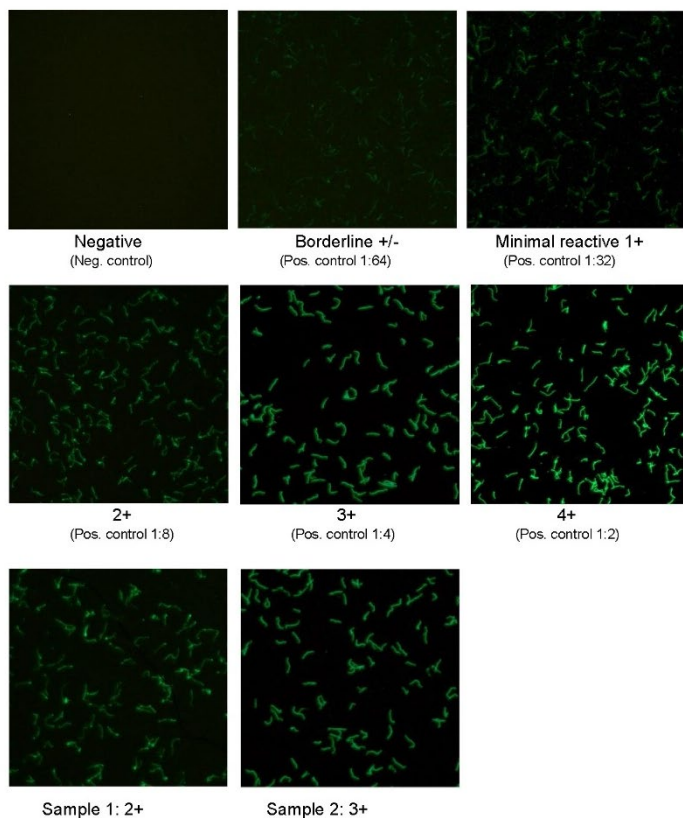
Als die Titration der Positivkontrolle (serielle Verdünnung 1:5 bis 1:640) aus verschiedenen Chargen gemäß dem Testverfahren 10-mal getestet wurde, lagen alle Ergebnisse innerhalb von ±1 Fluoreszenzstufe.

Prozonenphänomen / High dose hook effect

Der MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM-Assay ist ein indirekter Immunfluoreszenz-Nachweis-Assay mit einem FITC-gekoppelten Antikörper (2-Schritt-Assay). Es wurde ein Waschschriff hinzugefügt, in dem alle unspezifischen oder ungebundenen Antikörper entfernt werden. Aus diesem Grund wird das Prozonenphänomen verhindert.

Messbereich

Bei der Titration der Positivkontrolle (IgM: 1:2-1:256) und der Probenverdünnung (1:5) nach dem Testverfahren wurden folgende Ergebnisse für den Messbereich dokumentiert:



Nachweisgrenzen

Der Cut-off (1:5-Verdünnung, minimale 1+ Fluoreszenzintensität) wurde an einem Panel bestehend aus 354 positiven und negativen Seren und Plasmaproben entsprechend der genannten Sensitivität und Spezifität definiert.

Klinische Leistung

Die klinische Leistungsfähigkeit wurde durch eine veröffentlichte Studie (peer-reviewed paper) und durch Ringversuchsdaten nachgewiesen.

Müller et al., 2006 (Lit. 9) zeigten anhand einer Meta-Analyse externer Qualitätskontrolluntersuchungen durch das Deutsche Eignungsprüfungsprogramm für Infektionsserologie eine mittlere Genauigkeit von 88 % (qualitativ) / 65,8 % (quantitativ) für den Fluoreszenz-Treponemen-Antikörper-Absorptionstest.

Für den MASTFLUOR™ FTA-ABS IgM Assay werden 1-2 mal pro Jahr Ringversuche (INSTAND e.V. Ringversuche, Sektion 311, Treponema pallidum) durchgeführt. Daten zu den Ringversuchen werden auf Anfrage zur Verfügung gestellt.

Verfügbarkeit der Zusammenfassung für Sicherheit und Leistung (Art. 29, IVDR)

Der Bericht wird in der EUDAMED-Datenbank vorliegen (sobald das Modul verfügbar ist). (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>) verfügbar sein.

Der SSP-Bericht wird auf Anfrage zur Verfügung gestellt.

Meldung schwerwiegender Vorkommnisse

Alle schwerwiegenden Vorkommnisse welche im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind müssen dem Hersteller und der verantwortlichen Behörde im Mitgliedsland, in dem der Anwender und / oder der Patient ansässig sind, gemeldet werden.

Referenzen und Änderungshistorie

Die Referenzen und die Änderungshistorie finden Sie am Ende der Gebrauchsanweisung.

MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM

Immunofluorescence assay for the detection of IgM antibodies to *Treponema pallidum* in human serum and plasma.

Intended Purpose

Semi-quantitative (titratable) immunofluorescence assay for the detection and confirmation of IgM antibodies directed against *Treponema pallidum* in human serum and plasma as an aid to diagnosis of syphilis.

The assay is suitable for manual use and is intended for professional in-vitro diagnostic use only. All laboratory test results should be interpreted in conjunction with other clinical data. The clinical judgement and further tests have to be taken into account additionally.

Important Note for Use of these Kit Instructions

Any assay relevant changes to the kit instructions for use (IFU) will lead to a change of the version number at the bottom on the last page. All changes made will be identified on a separate sheet added to the IFU for a period of three months from the date of a change of the version. Please ensure that the latest version of the IFU is used for the assay procedure.

Principle of the Test

Diluted specimens, the negative and positive controls or calibrators are applied to the wells of microscope slides and incubated. All wells are coated with purified antigens of the very pathogen. If specific antibodies are present in the serum they will bind to the fixed pathogen antigens forming a stable antigen-antibody complex. Slides are then washed to remove any unbound material. Complexed antibodies are detected by the addition of a fluorescence labelled anti-human IgM immunoglobulin conjugate. After a further washing step to remove any unbound conjugate, slides are viewed under a fluorescence microscope.

A green fluorescence is observed if pathogen specific antibodies are present in the sample material.

Kit Contents

1. **SLIDE** Slides
Ten slides with 10 wells each coated with fixed *Treponema pallidum* cells (Nichols strain).
2. **CONTROL+** Positive control
1 x 0.5 mL human serum with *Treponema pallidum* specific antibodies (IgM). Ready to use. (potentially infectious, see Warning and Precautions)
Contains <0.1 % (w/v) sodium azide and proclin (0.1 % v/v) as preservative.
3. **CONTROL-** Negative Control
1 x 0.5 mL of *Treponema pallidum* IgM negative control, human, ready to use. (potentially infectious, see Warning and Precautions)
Contains <0.1 % (w/v) sodium azide as preservative.
4. **CONJ M** FITC Conjugate IgM
1 x 3 mL of anti-human immunoglobulin (μ -chain, rabbit) conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC). Ready to use.
Contains Proclin (0.1 % v/v) as preservative.
5. **BUFFER** PBS
2 sachets with 10 g PBS powder. Dissolve 1 sachet (10 g) in 1 litre distilled or deionised water to make a solution of phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.2 \pm 0.2.
6. **MOUNTING MEDIUM** Mounting Medium
1 x 3 mL of a buffered glycerol mounting medium.
Contains Proclin (0.1 % v/v) as preservative. Ready-to-use.
7. **SORBENT** Sorbent/Ultrasoniccate
1 x 4 mL culture extract of *Treponema reiteri*, ultrasoniccate, liquid, ready to use.
Contains <0.1 % (w/v) sodium azide as preservative.
8. **MASTSORB** Mastsorb
1 x 6 mL rheumatoid factor absorbent, Anti-human-IgG, goat, ready to use. Contains <0.1 % sodium azide as preservative.
9. **Instructions for use**

Further Abbreviations

1. **RTU** ready to use

Materials Required but not Provided

1. Sterile test tubes.
2. Micropipettes and tips.
3. Staining dish or Coplin jar.
4. Moist chamber.
5. Volumetric flask.
6. Distilled water or deionised.
7. Forceps.
8. Cover slips.
9. Wash bottle.
10. Fluorescence microscope with a filter combination suitable for FITC (e.g. 490 nm excitation filter and a 510nm barrier filter).

Warning 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 without prior validation.
3. Do not use reagents beyond the expiry date.
4. Comply with the general health and safety guidelines for working with potentially infectious materials. Wear appropriate protective clothing and use appropriate lab facilities.
5. Do not mouth pipette.
6. Use disposable plasticware where ever possible. Re-usable glassware should be washed thoroughly and rinsed free of detergents before use.
7. The control/calibrator materials of human origin provided have been tested for antibodies to HIV and for HBsAg and found to be negative. However, they should be treated as potentially infectious materials and capable of transmitting diseases. No guarantee is given that the samples are free of infections or microbial contamination.
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 wells to dry out during the assay procedures.
11. Do not expose slides to intense sunlight or similar adverse conditions while incubating.
12. Samples and contaminated disposables should be disposed according to relevant disposal directives and regulations for infectious materials. For the decontamination of surfaces use suitable surface disinfectants. Contaminated glassware should be autoclaved at 121 °C.
13. Do not expose the FITC-conjugate at any stage to strong sunlight, UV or fluorescent light. Keep in a dark place whenever possible.
14. Microbial contaminated samples should not be used.
15. Do not use haemolysed, lipaemic or icteric samples.

16. Sodium azide is used as a preservative as marked. It may be toxic if ingested. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive salts. Always dispose of by flushing to drain with plenty of water.
17. Use distilled or deionised water.

Stability and Storage

MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM can be used until the 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.

After first opening reagents are stable for 90 days. An opened slide shall be used the same day.

Reconstituted PBS powder should be stored at 2–8 °C for up to 30 days.

Samples (serum, plasma) may be stored according to general recommendation in literature. In general samples can be kept 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.

Sample Material

Serum / Plasma material is collected by professional personnel according to current standards / best practice guidelines. According to current understanding an infection by contaminated blood cannot be ruled out entirely. Any sample material should therefore be treated as potentially infectious.

Samples should be taken and can be stored at 2–8 °C for up to 3 days according to general recommendation in literature. Serum should be aliquoted immediately after sampling and kept at -20°C for longer storage.

The samples should not be frozen and thawed repeatedly. After thawing samples should be briefly vortexed carefully before being used in the assay.

Lipaemic, haemolytic, icteric or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

Test Procedure

1. Allow all materials to reach room temperature (at least 20 °C) prior to use.
2. Reconstitute one sachet of PBS powder with 1 litre of distilled water or deionised water.
3. The Sorbent and the Mastsorb are ready to use.
4. Prepare samples as follows:
 - 20 µL Sorbent + 60 µL Mastsorb, mix carefully.
 - Add 20 µL of undiluted sample (serum or plasma) and mix carefully.Do not absorb the controls.
5. Incubate all samples at 37 °C for 30 min.
After incubation centrifuge the reaction for 5 min at 3000 rpm in an e.g. Eppendorf centrifuge.
6. Carefully remove the slide from its sachet. Hold the slide at the edge and do not touch the wells. Place the slides in a moist chamber.

7. Apply 20–25 µL of treated specimens and controls to respective wells on the slides according to a prepared work format. Ensure that all the wells are covered and that serum does not escape from the wells. Direct contact of a pipette tip with the slide surface should be avoided.
8. Place the slides in the moist chamber and incubate at 37 °C for 30 min.
9. After incubation wash slides carefully with PBS from a wash bottle, taking care not to direct the jet onto the test wells. This may be done by directing the jet of PBS along the center of the slide, tilting the slide first towards wells 1–5 and then towards 6–10.
10. Immerse the slides in a staining dish or Coplin jar containing PBS and wash for 15 min at room temperature with a change of PBS after 5 min to increase washing strength.
11. Remove slides from the staining jar and drain off any excess buffer. Using a blotter, dry the area outside wells. Do not touch the well surface.
12. Immediately transfer the slide to a moist chamber and add 20–25 µL of the respective FITC-conjugate to each well. The conjugate shall cover the whole well. Do not allow the wells to dry.
13. Incubate slides at 37 °C in a covered moist chamber in the dark for 30 min.
14. After incubation wash the slides with PBS as in steps 9 and 10.
15. Apply one small drop of Mounting Medium to each well on a slide. Place a cover slip on the slide and read the results immediately. Take care not to trap air pockets under the cover slip.
Note: Remove excess Mounting Medium with a paper towel avoiding any direct movement of the cover slip. Excess Mounting Medium on a slide may result in high background fluorescence due to light scattering.
16. Examine reactions under a fluorescence microscope at a total magnification of 400x or at 800x.

Interpretation of Results

Controls have to fit the lot specific reactions stated in the QC certificate. The figures in the table below are for orientation only and do not reflect the data of the current lot.

Specimen	Expected Results
Positive Control	1 to 4 +
Negative Control	negative*

* negative: Treponemes can be visible but do not fluoresce.

For a correct interpretation the results should be compared with positive and negative controls.

If further dilution on the samples or controls are requested on the basis of the screening titer, this can be achieved by serial dilution with PBS on screening titer.

Interpretation of Specimen Results

Positive Samples: Treponema show a green fluorescence. The fluorescence intensity depends on the concentration of the antibodies.

In an IgM positive reaction the outer shape of the Treponema may show a slight diffuse signal, which is a bit hard to focus. This can be seen as a typical IgM reaction.

The intensity can be scored for fluorescence on a scale from 1+ to 4+. For titration a 1+ intensity is counted as minimally reactive.

In general the background reactivity in an IgM test is slightly stronger than in an IgG test.

Borderline Samples: Displaying a faint but nevertheless perceptible fluorescence (+/-) and should be repeated.

Negative Samples: In most cases no treponemes are visible. Treponemes which are stained green but are not fluorescent must be read NEGATIVE.

In some cases an inhomogeneous pattern is observed in the 1:5 screening dilution. Fluorescence is obtained in some treponemes or in parts of them, other treponemes in the same well are just stained without any fluorescence. These wells should be read as negative.

Limitations / Interferences

1. The FTA-ABS IgM test may occasionally give a false positive result under certain patient conditions or diseases e.g. pregnancy, leprosy and systemic lupus erythematosus (see references 5, 6).
2. Sera with a high anti-Borrelia antibody titer (> 1:640) may show a green fluorescence of Treponema.
3. The FTA-ABS IgM 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.
4. Pathogenic treponemes 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.
5. Commensal treponemes can be cultured in artificial media whereas attempts to culture pathogenic treponemes *in vitro* failed.
6. 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:
 - a) Tests to measure antibodies against non-specific treponemal antigens i.e. cardiolipin or lipoidal antigen tests. These were formerly called 'Reagin' tests.

- b) Tests to measure antibodies against antigens specific for pathogenic treponemes i.e. *T. pallidum* particle agglutination assay (TPPA) and the fluorescent treponemal antibody absorbance test (FTA-ABS).

Performance characteristics

Sensitivity and Specificity

The assay was validated on a panel consisting of 354 sera and plasma samples. The panel was derived from positive and negative clinical samples. MASTABLOT™ TP IgM (Mast Diagnostica, Reinfeld, Germany, REF 6653M08) and SERODIA®-TP•PA (Fujirebio Inc., Tokyo, Japan, REF 226414) were used as comparison products.

The analytical performance was calculated as follows:

	Formula	Value
Sensitivity	$\frac{TP}{(TP + FN)}$	95.73 %
Specificity	$\frac{TN}{(TN + FP)}$	91.14 %
Positive predictive value	$\frac{TP}{(TP + FP)}$	84.21 %
Negative predictive value	$\frac{TN}{(TN + FN)}$	97.74 %
Efficiency	$\frac{(TP + TN)}{total}$	92.66 %
Positive likelihood ratio	$\frac{(Sens)}{(1 - Spec)}$	10.80
Negative likelihood ratio	$\frac{(1 - Sens)}{(Spec)}$	0.05

(Abbreviations: TP: True positive, TN: True negative, FN: False negative, FP: False positive)

Trueness

Sensitivity and specificity of MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM is in line with performance data of the comparison products.

Cross-Reactivity

20 *Borrelia* samples were tested for cross-reactivity. Sera with a high anti-*Borrelia* antibody titer sometimes gave false positive results (see Limitations).

Traceability

The INSTAND e. V. RV 311, 2012, Pr. 61 (Serum RVTP 5) sample is an IgM positive sample and can be used to adjust the serum being used as positive control.

Assay Precision

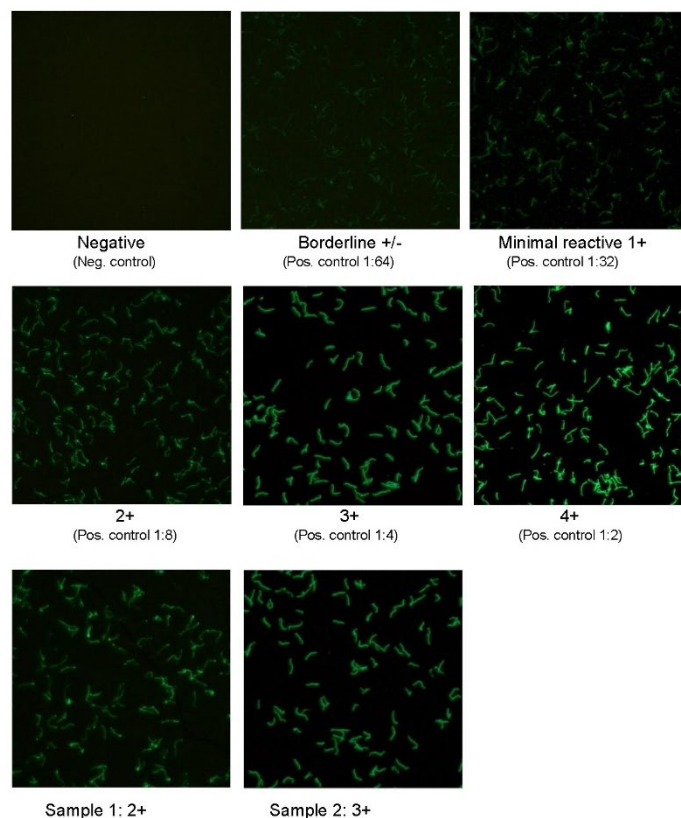
When positive control titration (serial dilution 1:5 to 1:640) was tested 10 times from different lots according to the test procedure, all results were found to be within ± 1 level of fluorescence. Test within the same lot similarly demonstrated repeatability. Thus assay precision was demonstrated.

High dose hook effect (prozone effect)

The MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM assay is an indirect immunofluorescence detection assays using an FITC-coupled antibody (2-step assay). A washing step has been added in which all unspecific or unbound antibodies are removed. For this reason, the high-dose hook effect is prevented.

Measuring range

When positive control titration (IgM: 1:2-1:256) and sample dilution (1:5) was tested according to the test procedure, following results for measuring range were documented:



Cut-off

The cut-off (1:5 dilution, minimum 1+ fluorescence intensity) was defined on a panel consisting of 354 positive and negative sera and plasma samples corresponding to the mentioned sensitivity and specificity.

Clinical Performance

The clinical performance was demonstrated by a peer-reviewed paper and by proficiency testing.

Müller et al., 2006 (reference 9) showed by using a meta-analysis of external quality control surveys by the German Infection Serology Proficiency Testing Program a mean accuracy of 88% (qualitative) / 65.8% (quantitative) for the fluorescent treponemal antibody absorption test.

For the MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM assay, proficiency tests (INSTAND e.V. Ringversuche, Section 311, Treponema pallidum) are performed 1-2 times per year. Data on the interlaboratory comparisons will be provided on request.

Availability of the summary of safety and performance (Art. 29, IVDR)

The report will be available in the EUDAMED database (as soon as the module is available).

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>.

The SSP report will be provided on request.

Reporting serious incidents

All serious incidents that have occurred in connection with the device must be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and / or patient is established.

References and Change History

You can find the references and the Change History at the end of the instruction for use.

MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM

Test d'immunofluorescence pour la détection des IgM anti-*Treponema pallidum* dans le sérum et le plasma humain.

Domaine d'utilisation

Test d'immunofluorescence semi-quantitatif (titrable) pour la détection et la confirmation des anticorps IgM dirigés contre *Treponema pallidum* dans le sérum et le plasma humains comme aide au diagnostic de la syphilis.

Le test est adapté à une utilisation manuelle et est destiné à un usage professionnel de diagnostic in vitro uniquement. Tous les résultats des tests de laboratoire doivent être interprétés en conjonction avec d'autres données cliniques. Le jugement clinique et les autres tests doivent également être pris en compte.

Note importante sur la notice d'utilisation

Tout changement pertinent de la notice d'utilisation (NU) du kit implique un changement de numéro de version indiqué en bas sur la dernière page de la NU. Toutes les modifications apportées sont indiquées dans une feuille supplémentaire accompagnant la NU pour une période de trois mois à compter de la date de changement de version. Veillez à ce que la dernière version de la NU soit utilisée avant d'effectuer le test.

Principe du test

Les échantillons dilués, les contrôles négatifs et positifs, ou les calibrateurs sont déposés sur les puits des lames de microscope et incubés. Tous les puits sont recouverts d'antigènes purifiés du pathogène. Si les anticorps spécifiques sont présents dans le sérum, ils se lieront aux antigènes pathogènes fixés formant un complexe antigène-anticorps stable. Le rinçage des lames permet d'éliminer tout matériel non spécifique ou non lié. Après rinçage des lames, les complexes sont mis en évidence par l'ajout du conjugué fluorescent IgM anti-humain. Un autre rinçage permet d'éliminer le conjugué en excès. Après lavage les lames sont observées sous un microscope à fluorescence. Une fluorescence verte est observée si les anticorps spécifiques contre le pathogène sont présents dans l'échantillon.

Contenu du kit

2. **SLIDE Lames**
10 lames de 10 puits contenant *Treponema pallidum* (souche Nichols).
3. **CONTROL+ Contrôle positif**
1 x 0,5 mL de sérum humain avec anticorps spécifiques de *Treponema pallidum* (IgM). Prêt à l'emploi. (potentiellement infectieux, voir Précautions d'utilisation). Contient < 0,1 % d'azide de sodium et du Proclin (0,1 % v/v) comme conservateur.
4. **CONTROL- Contrôle négatif**
1 x 0,5 mL de contrôle négatif *Treponema pallidum* IgM, humain, prêt à l'emploi.
Contient < 0,1 % d'azide de sodium et du Proclin (0,1 % v/v) comme conservateur.
5. **CONJ M Conjugué FITC IgM**
1 x 3 mL d'immunoglobuline anti-humaine (chaîne μ , lapin) conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Prêt à l'emploi.
Contient du Proclin (0,1% v/v) comme conservateur.
6. **BUFFER PBS**
2 sachets de 10g de PBS en poudre. Dissoudre 1 sachet (10g) dans 1 litre d'eau déionisée ou distillée pour obtenir une solution de PBS à pH $7,2 \pm 0,2$.
7. **MOUNTING MEDIUM Milieu de montage**
1 x 3 mL de milieu de montage tamponné glycérolé.
Contient du Proclin (0,1% v/v) comme conservateur.
Prêt à l'emploi.
8. **SORBENT Absorbant / Traiter par ultrasons**
1 x 4 mL d'extrait de culture de *Treponema reiteri*, passé aux ultrasons, liquide d'adsorbant, prêt à l'emploi. Chaque flacon contient moins de 0,1% (p/v) d'azoture de sodium comme conservateur.
9. **MASTORB Mastsorb**
1 x 6 mL d'absorbant pour facteur rhumatoïde, Anti-human- IgG, chèvre, prêt à l'emploi. Contient < 0,1 % d'azide de sodium comme conservateur.
10. **Notice d'utilisation**

Autres abréviations

1. **RTU Prêt à l'emploi**

Matériels nécessaires non fournis

7. Tubes stériles.
8. Micropipettes et embouts.
9. Bac à coloration.
10. Chambre humide.
11. Flacon gradué pour PBS.
12. Eau distillée ou ultrapure.
13. Pincettes.
14. Lamelles.
15. Flacon de lavage.
16. Microscope à transmission ou à épifluorescence avec combinaison de filtres adaptée à FITC (ex. filtre d'excitation de 490 nm et filtre barrière de 510 nm).

Précautions d'utilisation

1. Les réactifs du coffret sont uniquement utilisés pour le diagnostic *in vitro*.
2. Lire soigneusement la notice d'utilisation avant de commencer le test. Ne pas modifier la procédure.
3. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption indiquée sur le coffret.
4. Respecter les réglementations de santé et de sécurité relatives aux matières potentiellement infectieuses. Porter des vêtements adaptés à ce type de manipulation, utiliser un équipement de protection approprié, et opérer dans un laboratoire approprié.
5. Ne pas pipeter avec la bouche.
6. Utiliser du matériel en plastique jetable dans la mesure du possible. La verrerie doit être lavée soigneusement et rincée sans détergent avant utilisation.
7. Les matériaux de contrôle/calibration d'origine humaine 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. Aucune garantie n'est donnée que les échantillons soient exempts de maladie infectieuse ou de contamination microbiologique.
8. Ne pas échanger les réactifs de différents lots car les réactifs sont calibrés pour chaque lot.
9. Éviter toute contamination croisée entre les réactifs et ne pas intervertir les bouchons des flacons. Changer de pipettes ou d'embouts entre chaque échantillon et chaque réactif.
10. Ne pas laisser sécher les puits entre les différentes étapes.
11. Protéger les lames des rayons du soleil ou de la lumière directe pendant l'incubation.
12. Éliminer les échantillons et les produits jetables contaminés conformément aux règlements établis pour l'élimination des matières potentiellement infectieuses. Décontaminer les surfaces de travail avec un désinfectant de surface approprié conformément aux instructions d'utilisation. Les récipients en verre ou similaires peuvent être autoclavés à 121 °C.

13. Protéger le conjugué FITC des UV, de la fluorescence et des rayons du soleil. Conserver le conjugué à l'obscurité.
14. Ne pas utiliser les échantillons contaminés par des micro-organismes.
15. Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés, lipémiques ou ictériques.
16. L'azoture de sodium utilisé comme conservateur est un produit toxique en cas d'ingestion. L'azoture de sodium peut réagir avec les conduites en plomb ou en cuivre et former des sels hautement explosifs. Rincer toujours abondamment à l'eau lors d'une élimination dans les canalisations.
17. Utilisez de l'eau distillée ou déionisée.

Conservation et stabilité

MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM se conserve jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

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

Après la première ouverture, les réactifs sont stables pendant 90 jours. Une lame ouverte doit être utilisée le jour même.

Le PBS reconstitué se conserve 30 jours à 2–8 °C.

Les échantillons de sérum, plasma ou de LCR sont à stockés selon les recommandations générales publiées. En général, les échantillons peuvent se conserver 3 jours à 2–8 °C ou à -20 °C pour des délais supérieurs. Éviter la congélation et décongélation répétée des échantillons.

Échantillons de matériaux

Le sérum/plasma est collecté par du personnel professionnel conformément aux normes en vigueur/aux lignes directrices sur les meilleures pratiques. Selon les connaissances actuelles, une infection par du sang contaminé ne peut pas être totalement exclue. Tout échantillon doit donc être traité comme potentiellement infectieux.

Les échantillons prélevés peuvent être conservés entre 2 et 8 °C pendant 3 jours maximum, conformément aux recommandations générales de la littérature. Le sérum doit être aliquoté immédiatement après le prélèvement et conservé à -20 °C pour un stockage plus long.

Les échantillons ne doivent pas être congelés et décongelés de façon répétée.

Après décongélation, les échantillons doivent être agités au vortex rapidement et avec soin avant d'effectuer le test.

Les échantillons hyperlipidiques, ictériques, hémolysés ou contaminés peuvent donner des résultats faussement négatifs ou positifs.

Procédure

17. Laissez tous les matériaux atteindre la température ambiante (au moins 20 °C) avant de les utiliser.
18. Reconstituer un sachet de poudre de PBS avec 1 litre d'eau distillée ou d'eau désionisée.

19. L'absorbant et le Mastsorb sont prêts à être utilisés.
20. Préparer les échantillons comme suit :
 - 20 µL de Sorbent + 60 µL de Mastsorb, mélanger soigneusement.
 - Ajouter 20 µL d'échantillon non dilué (sérum ou plasma) et mélanger soigneusement.

Ne pas absorber les contrôles.

21. Incuber tous les échantillons à 37 °C pendant 30 minutes.
Après incubation, centrifuger la réaction pendant 5 min à 3000 rpm dans une centrifugeuse Eppendorf par exemple.
22. Retirez délicatement la lame de son sachet. Tenez la lame par le bord et ne touchez pas les puits. Placez les lames dans une chambre humide.
23. Appliquer 20-25 µl d'échantillons traités et de contrôles dans les puits respectifs des lames selon un format de travail préparé. S'assurer que tous les puits sont couverts et que le sérum ne s'échappe pas des puits. Le contact direct de l'embout de la pipette avec la surface de la lame doit être évité.
24. Placer les lames dans la chambre humide et incuber à 37 °C pendant 30 minutes.
25. Après l'incubation, laver soigneusement les lames avec du PBS provenant d'un flacon de lavage, en prenant soin de ne pas diriger le jet sur les puits de test. Ceci peut être fait en dirigeant le jet de PBS le long du centre de la lame, en inclinant la lame d'abord vers les puits 1-5 et ensuite vers 6-10.
26. Immerger les lames dans un plat de coloration ou un bocal de Coplin contenant du PBS et laver pendant 15 min à température ambiante en changeant le PBS après 5 min pour augmenter la force de lavage.
27. Retirez les lames du bocal de coloration et éliminez tout excès de tampon. A l'aide d'un buvard, sécher la zone à l'extérieur des puits. Ne pas toucher la surface des puits.
28. Transférez immédiatement la lame dans une chambre humide et ajoutez 20-25 µL du conjugué FITC respectif dans chaque puits. Le conjugué doit couvrir la totalité du puits. Ne laissez pas les puits sécher.
29. Incuber les lames à 37 °C dans une chambre humide couverte et dans l'obscurité pendant 30 min.
30. Après l'incubation, laver les lames avec du PBS comme dans les étapes 9 et 10.
31. Appliquez une petite goutte de milieu de montage dans chaque puits d'une lame. Placez une lamelle couvre-objet sur la lame et lisez les résultats immédiatement. Veillez à ne pas emprisonner de poches d'air sous la lamelle.
Note : Enlevez l'excès de milieu de montage avec une serviette en papier en évitant tout mouvement direct de la lamelle.
Un excès de milieu de montage sur une lame peut entraîner une fluorescence de fond élevée en raison de la diffusion de la lumière.
32. Examiner les réactions sous un microscope à fluorescence à un grossissement total de 400x ou 800x.

Interprétation des résultats

Validation du test

Les contrôles doivent correspondre aux réactions spécifiques du lot indiquées dans le certificat de contrôle de qualité. Les chiffres du tableau ci-dessous sont donnés à titre indicatif et ne reflètent pas les données du lot actuel.

Echantillon	Resultats attendus*
Contrôle positif	1 + à 4 +
Contrôle négatif	négatif*

* négatif : Les tréponèmes sont visibles mais ne sont pas fluorescents.

Pour une interprétation correcte, les résultats doivent être comparés aux contrôles positifs et négatifs.

Si une dilution supplémentaire des échantillons ou des contrôles est demandée sur la base du titre de dépistage, elle peut être archivée par une dilution en série avec du PBS sur le titre de dépistage.

Interprétation des résultats des échantillons

Echantillons positifs : Treponema présente une fluorescence verte. L'intensité de fluorescence dépend de la concentration en anticorps.

Dans une réaction positive aux IgM, la forme extérieure du tréponème peut présenter un léger signal diffus, qui est un peu difficile à mettre au point. Ceci peut être considéré comme une réaction IgM typique.

L'intensité de la fluorescence peut être notée sur une échelle de 1+ à 4+. Pour le titrage, une intensité de 1+ est considérée comme peu réactive.

En général, la réactivité de fond dans un test IgM est légèrement plus forte que dans un test IgG.

Echantillons à la limite : Présence d'une fluorescence faible mais néanmoins perceptible (+/-), le test doit être répété.

Echantillons négatifs : Dans la plupart des cas aucun tréponème n'est visible. Les tréponèmes colorés en vert mais qui ne sont pas fluorescents doivent être considérés NEGATIF.

Dans certains cas un motif inhomogène est observé dans la dilution de dépistage au 1:5. La fluorescence est visible dans certains tréponèmes ou certaines parties d'entre eux, d'autres tréponèmes du même puits sont juste colorés sans fluorescence. Ces puits doivent être considérés comme négatifs.

Limites / Interférences

1. Le test FTA-ABS IgM peut occasionnellement donner des résultats faussement positifs chez certains patients dans certaines conditions ou maladies : grossesse, lèpre et lupus érythémateux (voir références 5, 6).
2. Les sérum avec un titre élevé d'anticorps anti-Borrelia (> 1 :640) peuvent montrer une fluorescence verte de Treponema.

3. Le test FTA-ABS IgM 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.
4. 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.
5. Les tréponèmes commensaux peuvent être cultivés sur milieu artificiel contrairement aux tréponèmes pathogènes où les essais *in vitro* ont toujours échoué.
6. Le diagnostic clinique de la syphilis est confirmé en laboratoire soit par la mise en évidence de *T. pallidum* à partir des écoulements des lésions, soit par 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 :
 - a) Le dosage des anticorps dirigés contre les antigènes non spécifiques du tréponème, par exemple les tests cardioline ou lipoïde. Ce sont les tests de "réagine".
 - b) Le dosage des anticorps dirigés contre les antigènes spécifiques du tréponème pathogène ; le test d'agglutination (TPPA) et le test de fluorescence absorbée (FTA-ABS).

Caractéristiques de performance

Sensibilité et spécificité

Le test a été validé sur un panel composé de 354 échantillons de sérums et de plasma. Le panel a été obtenu à partir d'échantillons cliniques positifs et négatifs. MASTABLOT™ TP IgM (Mast Diagnostica, Reinfeld, Allemagne, REF 6653M08) et SERODIA®-TP-PA (Fujirebio Inc., Tokyo, Japon, REF 226414) ont été utilisés comme tests de référence.

La performance analytique a été calculée comme suit :

	Formule	Valeur
Sensibilité	$\frac{TP}{(TP + FN)}$	95,73 %
Spécificité	$\frac{TN}{(TN + FP)}$	91,14 %
Valeur prédictive positive	$\frac{TP}{(TP + FP)}$	84,21 %
Valeur prédictive négative	$\frac{TN}{(TN + FN)}$	97,74 %
Efficacité	$\frac{(TP + TN)}{total}$	92,66 %
Rapport de vraisemblance positif	$\frac{(Sens)}{(1 - Spec)}$	10.80
Rapport de vraisemblance négatif	$\frac{(1 - Sens)}{(Spec)}$	0.05

(Abréviations : TP : Vrai positif, TN : Vrai négatif, FN : Faux négatif, FP : Faux positif)

Conformité du test

La sensibilité et la spécificité de MASTAFUOR™ FTA-ABS IgM sont conformes aux données de performance des tests de référence.

Réactivité croisée

20 échantillons de Borrelia ont été testés pour la réactivité croisée. Les sérums ayant un titre élevé d'anticorps anti-Borrelia ont parfois donné des résultats faussement positifs (voir Limites).

Traçabilité

L'échantillon INSTAND e. V. RV 311, 2012, Pr. 61 (Sérum RVTP 5) est un échantillon positif en IgM et peut être utilisé pour ajuster le sérum utilisé comme contrôle positif.

Précision du test

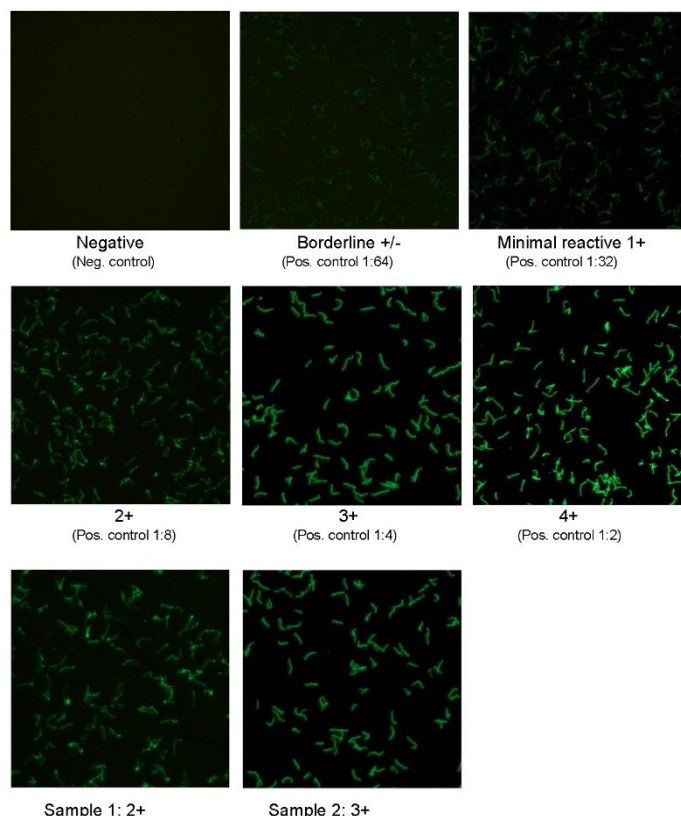
Lorsque le titrage du témoin positif (dilution en série 1:5 à 1:640) a été testé 10 fois à partir de différents lots selon la procédure d'essai, tous les résultats se sont avérés être à ± 1 niveau de fluorescence.

Effet de crochet à forte dose

Le test MASTAFUOR™ FTA-ABS IgG est un test de détection par immunofluorescence indirecte utilisant un anticorps couplé au FITC (test en 2 étapes). Une étape de lavage a été ajoutée, au cours de laquelle tous les anticorps non spécifiques ou non liés sont éliminés. C'est pourquoi l'effet d'accrochage à forte dose est évité.

Plage de mesure

Lorsque le titrage du témoin positif (IgM : 1:2-1:256) et la dilution de l'échantillon (1:5) ont été testés conformément



à la procédure de test, les résultats suivants pour la gamme de mesure ont été documentés :

Cut-off

Le seuil de coupure (dilution 1:5, intensité de fluorescence minimum 1+) a été défini sur un panel composé de 354 échantillons de sérums et de plasma positifs et négatifs correspondant à la sensibilité et à la spécificité mentionnées.

Performance clinique

La performance clinique a été démontrée par un article revu par des pairs et par des essais d'aptitude.

Müller et al, 2006 (référence 9) ont montré en utilisant une méta-analyse des enquêtes de contrôle de qualité externe par le programme allemand d'essais d'aptitude en sérologie infectieuse une précision moyenne de 88 % (qualitative) / 65,8 % (quantitative) pour le test d'absorption des anticorps tréponémiques fluorescents.

Pour le test MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM, des essais d'aptitude (INSTAND e.V. Ringversuche, Section 311, Treponema pallidum) sont réalisés 1 à 2 fois par an. Les données sur les comparaisons interlaboratoires seront fournies sur demande.

Disponibilité du résumé de la sécurité et des performances (Art. 29, IVDR)

Le rapport sera disponible dans la base de données EUDAMED (dès que le module sera disponible). (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>).

Le rapport SSP sera fourni sur demande.

Signaler les incidents graves

Tout incident grave survenu en rapport avec le dispositif doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

Références et historique des modifications

Vous trouverez les références et l'historique des modifications à la fin du mode d'emploi.

Referenzen / References / Références:

- Schöfer H, Brockmeyer NH, Hagedorn HJ, Hamouda O, Handrick W, Krause W, Marcus U et al. (2006): Syphilis. Leitlinie der Deutschen STD Gesellschaft zur Diagnostik und Therapie der Syphilis. J. Dtsch. Dermatol. Ges. 4 (2): 160-177.
- Rath PM, Marsch WC, Brade V, Fehrenbach FJ (1994): Serological distinction between syphilis and Lyme borreliosis. Zentralbl. Bakteriol. 280 (3).
- Hans-Jochen Hagedorn, Syphilis; in Lothar Thomas, Labor und Diagnose 8. Auflage (2012), TH-Books; Kapitel 42.14: 2006 - 2017
- Annual epidemiological report 2014 - Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections; Chapter: Syphilis, p. 51-53; <http://ecdc.europa.eu/>
- Smikle MF, James OB, Prabhakar P (1990): Biological false positive serological tests for syphilis in the Jamaican population. Sexually Transmitted Infections, 66, p. 76-78
- Wright DJM (1973): The significance of the fluorescent treponemal antibody (FTA-ABS) test in collagen disorders and leprosy Journal of Clinical Pathology, 26, p. 968-972
- Syphilis, in Surveillance Report, Sexual Transmitted Infections in Europe, 2013, p. 25-31; www.ecdc.europa.eu
- Bosshard PP (2013): Usefulness of IgM-specific enzyme immunoassays for serodiagnosis of syphilis: Comparative evaluation of three different assays. J. Infec., 67 (1), p. 35-42.
- Müller I, Brade V, Hagedorn HJ, Straube E, Schörner C, Frosch M et al. (2006); Is Serological Testing a Reliable Tool in Laboratory Diagnosis of Syphilis? Meta-Analysis of Eight External Quality Control Surveys Performed by the German Infection Serology Proficiency Testing Program. Journal of clinical microbiology, 6, 1335-1341.

Änderungshistorie / Change History / Historique des changements

Change history includes changes to significant aspects of the assay / IFU.

Chapter	Description of change
Cover page	Addition of the number of the Notified Body
Stability and Storage	Change in-use stability from 3 months to 90 days
Limitations / Interferences	Addition of References Smikle et al. (Ref. 5) and Wright et al. (Ref. 6)
Performance Characteristics - Traceability	Removal of reference to IgG control sample
Performance Characteristics - Prozonenphänomen (german version)	Addition of the naming High dose hook effect
Performance Characteristics - Clinical performance	New sources of clinical performance added
Availability of the summary of safety and performance (Art. 29)	Addition of the webpage and sending on request
Change History	Adding a reference to the Change History at the end of the IFU.
References	Addition of new references for cross reactivity (Ref. 5, 6) and clinical performance (Ref. 9)

**Mast Diagnostica GmbH,**

Feldstraße 20,
23858 Reinfeld,
Deutschland

Tel: +49 (0)4533 2007 0
Fax: +49 (0)4533 2007 68
email: mast@mast-diagnostica.de
Web: www.mast-group.com

Mast Group Ltd.

Mast House, Derby Road
Bootle, Merseyside, L20 1EA
United Kingdom

Tel: +44 (0)151 472 1444
Fax: +44 (0)151 944 1332
email: sales@mastgrp.com
Web: www.mast-group.com

Mast Diagnostic

12 rue Jean-Jacques Mention
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1
France

Tél: +33 (3) 22 80 80 67
Fax: +33 (3) 22 80 99 22
email: info@mast-diagnostic.fr
Web: www.mast-group.com

Verwendete Symbole gemäß DIN EN ISO 15223-1

Icons are used according to DIN EN ISO 15223-1

Icônes utilisées selon DIN EN ISO 15223-1