

MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM

MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM

REF 630525

10 x 10 Tests

UDI-DI 4250729700071

**Gebrauchsanweisung /
Instructions for Use /
Notice d'utilisation /
Istruzioni per l'uso**

**Nur zur Verwendung durch Fachpersonal /
For professional use only /
Exclusivement pour un usage professionnel/
Da utilizzare solo da parte di personale specializzato**

CE 2797

	Deutsch	Seiten	02-06
	English	Pages	07-11
	Français	Pages	12-16
	Italiano	Pagine	17-21

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

1. **SLIDE** Objektträger
10 Objektträger mit je 10 Auftragsstellen, die mit *Treponema pallidum* Spirochäten (Stamm Nichols) beschichtet wurden.
2. **CONTROL+** Positivkontrolle
1 x 0,5 mL Anti-*T. pallidum* IgM-positives Kontrollserum, human, gebrauchsfertig, potenziell infektiös (siehe Warnhinweise), enthält < 0,1% NaN₃ und ≤ 0,005% ProClin (potentiell infektiös und hautreizend, siehe Warnhinweise)
3. **CONTROL-** Negativkontrolle
1 x 0,5 mL *Treponema pallidum* IgM negatives Kontrollserum; human; gebrauchsfertig, potenziell infektiös (siehe Warnhinweise), enthält < 0,1% NaN₃ und ≤ 0,005% ProClin (potentiell infektiös und hautreizend, siehe Warnhinweise)
4. **CONJ|M** FITC-Konjugat IgM
1 x 3 mL Anti-human-Immunglobulin (Kaninchen, μ -Kette), mit FITC (Fluorescein Isothiocyanat) konjugiert; gebrauchsfertig, enthält ≤ 0,005% ProClin (hautreizend, siehe Warnhinweise)
5. **BUFFER** PBS
2 Sachets mit 10 g PBS. Je 1 Päckchen (10 g) in 1 Liter destilliertem oder deionisiertem Wasser auflösen, pH 7,2 ± 0,2.
6. **MOUNTING MEDIUM** Eindeckmedium
1 x 3 mL glycerinepuffertes Eindeckmedium; gebrauchsfertig, enthält ≤ 0,005% ProClin (hautreizend, siehe Warnhinweise)
7. **SORBENT** Sorbent/Ultrasonikat
1 x 4 mL *Treponema reiteri* Ultrasonikat; flüssig, gebrauchsfertig, enthält Natriumazid (< 0,1%) und ≤ 0,005% ProClin (hautreizend, siehe Warnhinweise)
8. **MASTSORB** Mastsorb
1 x 6 mL Rheumafaktor Absorbent, Anti-human IgG, Ziege, gebrauchsfertig, enthält Natriumazid (< 0,1%)

Weitere verwendete Abkürzungen

1. **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

1. Halten Sie die allgemeinen Gesundheits- und Sicherheitsrichtlinien für die Arbeit mit potenziell infektiösen Materialien ein. Tragen Sie geeignete Schutzkleidung und benutzen Sie geeignete Laboreinrichtungen.
2. Vermeiden Sie Kreuzkontaminationen, sowie den Austausch der Flaschendeckel. Verwenden Sie keine kontaminierten Reagenzien. Reagenzien mit beschädigten Flaschen oder Verpackungen sollten aufgrund des Kontaminationsrisikos nicht verwendet werden. Für jede Probe oder jedes Reagenz sollte eine eigene Pipette bzw. Pipettenspitze verwendet werden.
3. Die Kontroll-/Kalibriermaterialien menschlichen Ursprungs wurden auf Antikörper gegen HIV und HBsAg getestet und wurden für negativ befunden. Sie sollten jedoch als potenziell infektiöses Material behandelt werden, das in der Lage ist, Krankheiten zu übertragen. Es wird nicht garantiert, dass die Proben frei von Infektionen oder mikrobieller Kontamination sind.
4. Einzelne Kitreagenzien enthalten bovine Komponenten. Zum Schutz vor Infektionen mit Prionen oder zoonotischen Erregern müssen die gängigen Arbeitsschutzregeln (GLP) eingehalten werden.
5. Keine hämolysierten, lipämische oder ikterischen Proben verwenden (Ref. 10, 11, 12).
6. Natriumazid und ProClin werden als Konservierungsmittel verwendet. ProClin kann zu Hautreizungen führen. Bei Kontakt mit der Haut sollten die betroffenen Stellen gründlich mit Wasser und Seife gewaschen werden. Natriumazid kann bei Aufnahme zu Vergiftung führen und mit Metallverbindungen (Kupfer, Blei) explosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung von Azidreagenzien über den Laborabfluss, daher mit viel Wasser nachspülen.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Lesen Sie die Anweisungen sorgfältig durch, bevor Sie den Test durchführen. Ändern Sie das Verfahren nicht ohne vorherige Validierung.
2. Keine Kitreagenzien nach dem Ablauf der Haltbarkeit verwenden.
3. Keine Kitreagenzien aus verschiedenen Chargen kombinieren.
4. Verwenden Sie nach Möglichkeit Einweg-Plastikmaterial. Wiederverwendbare Glasmaterialien sollten vor dem Gebrauch gründlich gewaschen und frei von Reinigungsmitteln gespült werden.
5. Für jeden Pipettierschritt ist eine neue Pipettenspitze zu verwenden.
6. Nur Laborwasser von höchster Qualität verwenden (z. B. Aqua dest., Aqua bidest., Aqua inieciabilia, HPLC Grade).
7. Ein Austrocknen der Wells während der Testdurchführung vermeiden.
8. Die Objektträger nicht direktem Sonnenlicht oder anderen vergleichbar extremen Bedingungen aussetzen.
9. Setzen Sie das FITC-Konjugat zu keinem Zeitpunkt starkem Sonnenlicht, UV- oder Fluoreszenzlicht aus. Möglichst an einem dunklen Ort aufbewahren.

Entsorgung

Kitreagenzien, Proben und kontaminierte Einwegartikel sollten gemäß den einschlägigen Entsorgungsrichtlinien und -vorschriften für infektiöses Material entsorgt werden.

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 potenziell 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 (Lit. 10, 11, 12).

Testdurchführung

1. Vor dem Testansatz alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen (mindestens 20 °C).
2. 1 Sachet 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 Eppendorfsentrifuge)
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 Waschschrift 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 Kontrollen 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 Nachweisverfahren/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 Nachweisverfahren/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

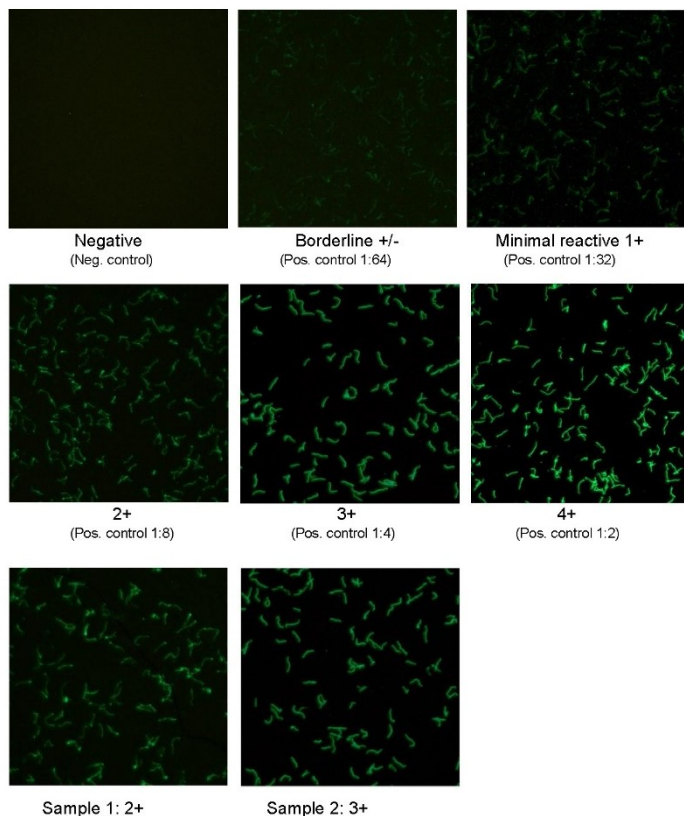
Als die Titration der Positivkontrolle (serielle Verdünnung 1:5 bis 1:640) aus verschiedenen Chargen gemäß dem Testverfahren 10-mal getestet wurde, lagen alle Ergebnisse innerhalb von ±1 Fluoreszenzstufe.

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 MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM Assay werden 1-2 mal pro Jahr Ringversuche (IN STAND 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, contains < 0.1% NaN₃ and ≤ 0.005% ProClin (potentially infectious and irritating to skin, see warnings)

3. **CONTROL-** Negative Control

1 x 0.5 mL of *Treponema pallidum* IgM negative control, human, ready to use, contains < 0.1% NaN₃ and ≤ 0.005% ProClin (potentially infectious and irritating to skin, see warnings)

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 < 0.1% NaN₃ and ≤ 0.005% ProClin (irritating to skin, see warnings)

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 ± 0.2.

6. **MOUNTING MEDIUM** Mounting Medium

1 x 3 mL of a buffered glycerol mounting medium, contains < 0.005% Proclin (irritating to skin, see warnings), ready-to-use

7. **SORBENT** Sorbent/Ultrasonicate

1 x 4 mL culture extract of *Treponema reiteri*, ultrasonicate, liquid, ready to use, contains sodium azide (< 0.1%) and ≤ 0.005% ProClin (irritating to skin, see warnings)

8. **MASTSORB** Mastsorb

1 x 6 mL rheumatoid factor absorbent, Anti-human-IgG, goat, ready to use, contains sodium azide (< 0.1%)

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).

Warnings

1. Comply with the general health and safety guidelines for working with potentially infectious materials. Wear appropriate protective clothing and use appropriate lab facilities.
2. Do not cross-contaminate reagents or interchange caps on bottles. Do not use contaminated reagents. Do not use reagents with damaged bottles or packaging. Use a separate pipette or pipette tips for each sample and reagent.
3. 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.
4. The kit reagents may contain bovine components. To protect against infections with prions or zoonotic pathogens, standard occupational safety regulations (GLP) must be observed.
5. Do not use haemolysed, lipemic or icteric samples (Lit. 10, 11, 12).
6. Sodium azide and ProClin are used as preservatives. ProClin can cause skin irritation. In the event of contact with the skin, the affected areas should be washed thoroughly with soap and water. Sodium azide can lead to poisoning if ingested and can form explosive metal azides with metal compounds (copper, lead). When disposing of azide reagents down the laboratory drain, rinse with plenty of water.

Precautions

1. Read instructions carefully before conducting the assay. Do not modify the procedure without prior validation.
2. Do not use reagents beyond the expiry date.
3. Do not mix reagents between different lots, as reagents have been calibrated for each batch.
4. Use disposable plasticware wherever possible. Re-usable glassware should be washed thoroughly and rinsed free of detergents before use.

5. A new pipette tip must be used for each pipetting step.
6. Only use laboratory water of the highest quality (e.g. Aqua dest., Aqua bidest., Aqua iniectionabilia, HPLC grade).
7. Do not allow wells to dry out during the assay procedures.
8. Do not expose slides to intense sunlight or similar adverse conditions while incubating.
9. Do not expose the FITC-conjugate at any stage to strong sunlight, UV or fluorescent light. Keep in a dark place whenever possible.

Disposal

Kit reagents, samples and contaminated disposables should be disposed of in accordance with the relevant disposal guidelines and regulations for infectious materials.

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.

Lipemic, haemolytic, icteric or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results (Ref. 10, 11, 12).

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 Mastorb are ready to use.
4. Prepare samples as follows:
 - 20 µL Sorbent + 60 µL Mastorb, 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 60 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 the controls.

If further dilution on the samples or controls are requested based on 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

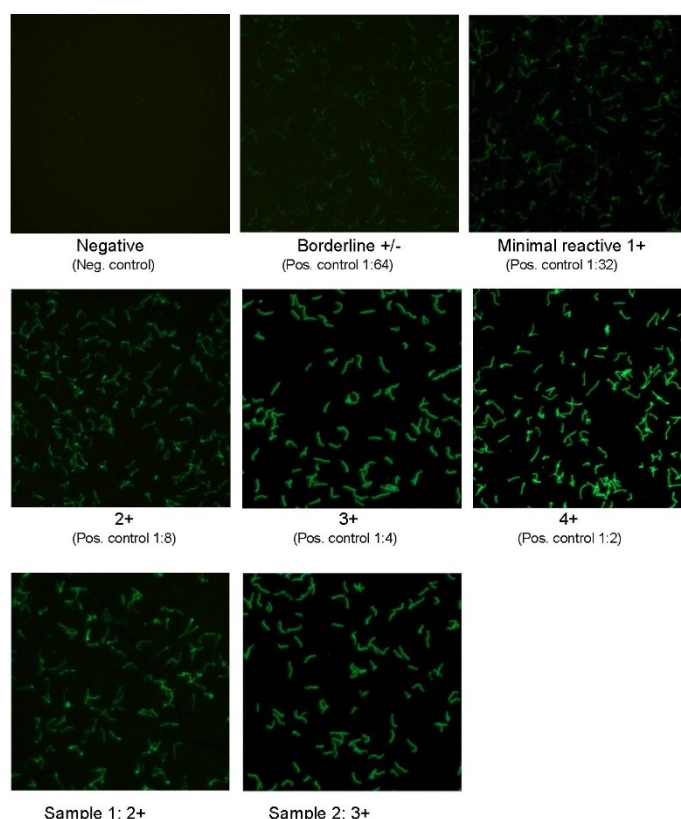
When positive control titration (serial dilution 1:5 to 1:640) was tested 10 times from different lots according to the test procedure, all results were found to be within ± 1 level of fluorescence. Test within the same lot similarly demonstrated repeatability. Thus, assay precision was demonstrated.

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

- SLIDE Lames**
10 lames de 10 puits contenant *Treponema pallidum* (souche Nichols).
- CONTROL+ Contrôle positif**
1 x 0,5 mL de sérum humain avec anticorps spécifiques de *Treponema pallidum* (IgM), prêt à l'emploi, contient < 0,1% de NaN₃ et < 0,005% de ProClin (potentiellement infectieux et irritant pour la peau, voir les avertissements)
- CONTROL- Contrôle négatif**
1 x 0,5 mL de contrôle négatif *Treponema pallidum* IgM, humain, prêt à l'emploi, contient < 0,1% de NaN₃ et < 0,005% de ProClin (potentiellement infectieux et irritant pour la peau, voir les avertissements)
- 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 < 0,1% de NaN₃ et < 0,005% de ProClin (irritant pour la peau, voir les avertissements)
- 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.
- MOUNTING MEDIUM Milieu de montage**
1 x 3 mL de milieu de montage tamponné glycérolé, contient < 0,005% de ProClin (irritant pour la peau, voir les avertissements), Prêt à l'emploi.
- 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, contient < 0,1% de l'azide de sodium et < 0,005% de ProClin (irritant pour la peau, voir les avertissements)
- MASTSORB Mastorb**
1 x 6 mL d'absorbant pour facteur rhumatoïde, Anti-human- IgG, chèvre, prêt à l'emploi, contient < 0,1% de l'azide de sodium

Autres abréviations

- RTU** Prêt à l'emploi

Matériels nécessaires non fournis

1. Tubes stériles.
2. Micropipettes et embouts.
3. Bac à coloration.
4. Chambre humide.
5. Flacon gradué pour PBS.
6. Eau distillée ou ultrapure.
7. Pincettes.
8. Lamelles.
9. Flacon de lavage.
10. 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).

Avertissements

1. Respectez les consignes générales de santé et de sécurité pour travailler avec du matériel potentiellement infectieux. Portez des vêtements de protection appropriés et utilisez les installations de laboratoire adéquates.
2. Ne pas contaminer les réactifs et ne pas intervertir les bouchons des flacons. Ne pas utiliser de réactifs contaminés. Ne pas utiliser de réactifs dont le flacon ou l'emballage est endommagé. Utiliser une pipette ou des embouts de pipette distincts pour chaque échantillon et chaque réactif.
3. Les matériaux de contrôle/calibrage d'origine humaine fournis ont été testés pour les anticorps contre le VIH et l'HBsAg et se sont révélés négatifs. Toutefois, ils doivent être traités comme des matériaux potentiellement infectieux et susceptibles de transmettre des maladies. Aucune garantie n'est donnée que les échantillons sont exempts d'infections ou de contamination microbienne.
4. Les réactifs du kit peuvent contenir des composants bovins. Pour se protéger contre les infections par des prions ou des agents pathogènes zoonotiques, il convient d'observer les règles standard de sécurité au travail (BPL).
5. Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés, lipémiques ou ictériques (Lit. 10, 11, 12).
6. L'azide de sodium et le ProClin sont utilisés comme conservateurs. Le ProClin peut provoquer une irritation de la peau. En cas de contact avec la peau, les zones concernées doivent être soigneusement lavées à l'eau et au savon. L'azide de sodium peut provoquer une intoxication en cas d'absorption et former des azides métalliques explosifs avec des composés métalliques (cuivre, plomb). En cas d'élimination de réactifs azotés dans les égouts du laboratoire, rincer donc abondamment à l'eau.

Précautions

1. Lire attentivement les instructions avant d'effectuer le test. Ne pas modifier la procédure sans validation préalable.

2. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.
3. Ne pas mélanger les réactifs entre différents lots, car les réactifs ont été calibrés pour chaque lot.
4. Utiliser autant que possible de la vaisselle en plastique jetable. La verrerie réutilisable doit être lavée soigneusement et rincée sans détergent avant d'être utilisée.
5. Une nouvelle pointe de pipette doit être utilisée pour chaque étape du pipetage.
6. Ne pas laisser les puits se dessécher pendant les procédures de dosage.
7. Ne pas exposer les lames à la lumière intense du soleil ou à des conditions défavorables similaires pendant l'incubation.
8. Ne pas exposer le conjugué FITC, à quelque stade que ce soit, à la lumière solaire intense, aux UV ou à la lumière fluorescente. Dans la mesure du possible, conserver à l'abri de la lumière.
9. N'utiliser que de l'eau de laboratoire de la plus haute qualité (par exemple Aqua dest., Aqua bidest., Aqua iniectionabilia, qualité HPLC).

Élimination

Les réactifs du kit, les échantillons et les produits jetables contaminés doivent être éliminés conformément aux directives et réglementations relatives à l'élimination des matières infectieuses.

Conservation et stabilité

MASTAFUOR™ 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 (Lit. 10, 11, 12).

Procédure

1. Laissez tous les matériaux atteindre la température ambiante (au moins 20 °C) avant de les utiliser.
2. Reconstituer un sachet de poudre de PBS avec 1 litre d'eau distillée ou d'eau désionisée.
3. L'absorbant et le Mastorb sont prêts à être utilisés.
4. Préparer les échantillons comme suit :
 - 20 µL de Sorbent + 60 µL de Mastorb, mélanger soigneusement.
 - Ajouter 20 µL d'échantillon non dilué (sérum ou plasma) et mélanger soigneusement.

Ne pas absorber les contrôles.

5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Placer les lames dans la chambre humide et incuber à 37 °C pendant 60 minutes.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Incuber les lames à 37 °C dans une chambre humide couverte et dans l'obscurité pendant 30 min.

14. Après l'incubation, laver les lames avec du PBS comme dans les étapes 9 et 10.

15. 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.

16. 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.

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 cardiolipine 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 MASTAFLUOR™ 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

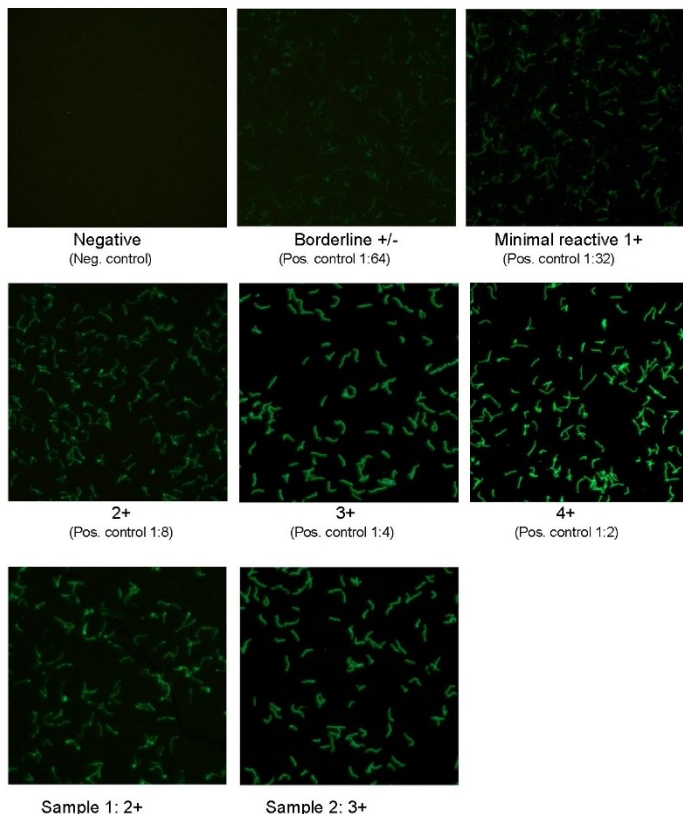
Lorsque le titrage du témoin positif (dilution en série 1:5 à 1:640) a été testé 10 fois à partir de différents lots selon la procédure d'essai, tous les résultats se sont avérés être à ± 1 niveau de fluorescence.

Effet de crochet à forte dose

Le test MASTAFLUOR™ 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.

Plaque 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.

MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM

Test di immunofluorescenza per la rilevazione di anticorpi IgM contro *Treponema pallidum* nel siero e nel plasma umani.

Scopo previsto

Test di immunofluorescenza semiquantitativo (titolabile) per la rilevazione e la conferma di anticorpi IgM diretti contro *Treponema pallidum* nel siero e nel plasma umani come ausilio alla diagnosi di sifilide.

Il test è adatto all'uso manuale ed è destinato esclusivamente all'uso diagnostico professionale in vitro. Tutti i risultati dei test di laboratorio devono essere interpretati insieme ad altri dati clinici. Il giudizio clinico e ulteriori test devono essere presi in considerazione.

Nota importante per l'utilizzo delle istruzioni del kit

Eventuali modifiche alle istruzioni per l'uso del kit (IFU) relative al saggio comporteranno una modifica del numero di versione in fondo all'ultima pagina. Tutte le modifiche apportate saranno identificate su un foglio separato aggiunto all'IFU per un periodo di tre mesi dalla data di modifica della versione. Assicurarsi di utilizzare la versione più recente dell'IFU per la procedura di analisi.

Principio del test

I campioni diluiti, i controlli negativi e positivi o i calibratori vengono applicati ai pozzetti dei vetrini da microscopio e incubati. Tutti i pozzetti sono rivestiti con antigeni purificati dell'agente patogeno stesso. Se nel siero sono presenti anticorpi specifici, questi si legheranno agli antigeni patogeni fissati formando un complesso antigene-anticorpo stabile. I vetrini vengono quindi lavati per rimuovere il materiale non legato. Gli anticorpi complessati vengono rilevati con l'aggiunta di un coniugato di immunoglobuline anti-IgM umane marcato in fluorescenza. Dopo un'ulteriore fase di lavaggio per rimuovere il coniugato non legato, i vetrini vengono osservati al microscopio a fluorescenza.

Si osserva una fluorescenza verde se nel materiale del campione sono presenti anticorpi specifici del patogeno.

Contenuto del kit

1. **SLIDE** Vetrini

Dieci vetrini con 10 pozzetti ciascuno rivestiti con cellule di *Treponema pallidum* fissate (ceppo Nichols)

CONTROL+

2. **Controllo positivo**

1 x 0,5 mL di siero umano con anticorpi specifici anti *Treponema pallidum* (IgM), contiene < 0,1% di NaN₃ e ≤ 0,005% di ProClin (potenzialmente infettivo e irritante per la pelle, vedere le avvertenze)

CONTROL-

3. **Controllo negativo**

1 x 0,5 mL di controllo negativo *Treponema pallidum* IgM, umano, pronto all'uso, contiene < 0,1% di NaN₃ e ≤ 0,005% di ProClin (potenzialmente infettivo e irritante per la pelle, vedere le avvertenze)

4. **CONJ M** IgM coniugato FITC

1 x 3 mL di immunoglobulina anti-umana (catena μ , coniglio) coniugata con isotiocianato di fluoresceina (FITC), pronta all'uso, contiene < 0,1% di NaN₃ e ≤ 0,005% di ProClin (irritante per la pelle, vedere le avvertenze)

5. **BUFFER** PBS

2 bustine con 10 g di polvere di PBS. Sciogliere 1 bustina (10 g) in 1 litro di acqua distillata o deionizzata per ottenere una soluzione di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) a pH 7,2 ± 0,2.

6. **MOUNTING MEDIUM** Mezzo di montaggio

1 x 3 mL di terreno di montaggio in glicerolo tamponato, contiene ≤ 0,005% di ProClin (irritante per la pelle, vedere le avvertenze), pronto all'uso

7. **SORBENT** Sorbente / Ultrasonicato

1 x 4 mL di estratto colturale di *Treponema reiteri*, ultrasonicato, liquido, pronto all'uso, contiene sodio azide (< 0,1%) e ≤ 0,005% di ProClin (irritante per la pelle, vedere le avvertenze)

8. **MASTSORB** Mastsorb

1 x 6 mL assorbitore per fattore reumatoide, IgG anti-umane, capra, pronto all'uso, contiene sodio azide (< 0,1%)

Altre abbreviazioni

1. **RTU** pronto all'uso

Materiale richiesto ma non fornito

1. Provette sterili.
2. Micropipette e puntali.
3. Piastra di colorazione o vaschetta Coplin.
4. Camera umida.
5. Pallone volumetrico.
6. Acqua distillata o deionizzata.
7. Pinze.
8. Slitte di copertura.
9. Bottiglia di lavaggio.
10. Microscopio a fluorescenza con una combinazione di filtri adatta al FITC (ad esempio, filtro di eccitazione da 490 nm e filtro di barriera da 510 nm).

Avvertenze

1. Rispettare le linee guida generali in materia di salute e sicurezza per lavorare con materiali potenzialmente infettivi. Indossare indumenti protettivi adeguati e utilizzare le strutture di laboratorio appropriate.
2. Non contaminare i reagenti e non scambiare i tappi dei flaconi. Non utilizzare reagenti contaminati. Non utilizzare reagenti con flaconi o confezioni danneggiati. Utilizzare una pipetta o puntali separati per ogni campione e reagente.
3. I materiali di controllo/calibrazione di origine umana forniti sono stati testati per gli anticorpi dell'HIV e dell'HBsAg e sono risultati negativi. Tuttavia, devono essere trattati come materiali potenzialmente infettivi e in grado di trasmettere malattie. Non si garantisce che i campioni siano privi di infezioni o contaminazioni microbiche.
4. I reagenti del kit possono contenere componenti bovini. Per proteggere dalle infezioni da prioni o da agenti patogeni zoonotici, è necessario osservare le norme standard di sicurezza sul lavoro (GLP).
5. Non utilizzare campioni emolizzati, lipemici o itterici (Lit. 10, 11, 12).
6. Come conservanti vengono utilizzati azoturo di sodio e ProClin. ProClin può causare irritazioni cutanee. In caso di contatto con la pelle, le zone interessate devono essere lavate accuratamente con acqua e sapone. L'azoturo di sodio può causare avvelenamento se ingerito e può formare azoturi metallici esplosivi con composti metallici (rame, piombo). Quando si smaltiscono reagenti azoturici nello scarico del laboratorio, sciacquare con abbondante acqua.

Precauzioni

1. Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Non modificare la procedura senza previa convalida.
2. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.
3. Non mescolare i reagenti tra lotti diversi, poiché i reagenti sono stati calibrati per ogni lotto.
4. Usare consumabili in plastica usa e getta ogni volta che è possibile. La vetreria riutilizzabile deve essere

lavata accuratamente e risciacquata senza detergenti prima dell'uso.

5. Per ogni fase di pipettaggio è necessario utilizzare un nuovo puntale.
6. Utilizzare solo acqua di laboratorio della massima qualità (ad es. Aqua dest., Aqua bidest., Aqua iniectionabilia, grado HPLC).
7. Non lasciare che i pozzetti si asciughino durante le procedure di analisi.
8. Non esporre i vetrini alla luce solare intensa o a condizioni avverse simili durante l'incubazione.
9. Non esporre il coniugato FITC in nessuna fase a forte luce solare, UV o fluorescente. Se possibile, conservare in un luogo buio.

Smaltimento

I reagenti del kit, i campioni e i materiali monouso contaminati devono essere smaltiti in conformità alle linee guida e alle normative sullo smaltimento dei materiali infettivi.

Stabilità e conservazione

MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM può essere utilizzato fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del kit. Tutti i componenti e i reagenti del kit devono essere conservati a 2-8 °C e portati a temperatura ambiente prima dell'uso.

Dopo la prima apertura i reagenti sono stabili per 90 giorni. Un vetrino aperto deve essere utilizzato il giorno stesso.

La polvere di PBS ricostituita deve essere conservata a 2-8 °C per un massimo di 30 giorni.

I campioni (siero, plasma) possono essere conservati secondo le raccomandazioni generali della letteratura. In generale, i campioni possono essere conservati a 2-8 °C per un massimo di 3 giorni prima dell'uso o a -20 °C per una conservazione più lunga. Si deve evitare di congelare e scongelare ripetutamente i campioni.

Materiale campione

- a) Il materiale sierico/plasmatico viene raccolto da personale professionale secondo gli standard attuali e le linee guida delle migliori pratiche. Secondo le attuali conoscenze, non è possibile escludere completamente un'infezione da sangue contaminato. Qualsiasi campione di materiale deve quindi essere trattato come potenzialmente infettivo.
- b) I campioni devono essere prelevati e conservati a 2-8 °C per un massimo di 3 giorni, secondo le raccomandazioni generali della letteratura. Il siero deve essere aliquotato immediatamente dopo il prelievo e conservato a -20 °C per una conservazione più lunga.

I campioni non devono essere congelati e scongelati ripetutamente.

Dopo lo scongelamento, i campioni devono essere brevemente agitati con cura prima di essere utilizzati nel test.

I campioni lipemici, emolitici, itterici o contaminati da batteri possono causare risultati falsi positivi o falsi negativi (Lit. 9, 10, 11).

Procedura del test

1. Lasciare che tutti i materiali raggiungano la temperatura ambiente (almeno 20 °C) prima dell'uso.
2. Ricostituire una bustina di PBS in polvere con 1 litro di acqua distillata o deionizzata.
3. Il sorbente e il Mastorb sono pronti all'uso.
4. Preparare i campioni come segue:
 - 20 µL di sorbente + 60 µL di Mastorb, mescolare accuratamente.
 - Aggiungere 20 µL di campione non diluito (siero o plasma) e mescolare accuratamente.

Non assorbire i controlli.

5. Incubare tutti i campioni a 37 °C per 30 min.
Dopo l'incubazione, centrifugare la reazione per 5 minuti a 3000 rpm in una centrifuga Eppendorf.
6. Estrarre con cautela il vetrino dalla bustina. Tenere il vetrino sul bordo e non toccare i pozzetti. Posizionare i vetrini in una camera umida.
7. Applicare 20-25 µL di campioni trattati e di controlli nei rispettivi pozzetti dei vetrini secondo un formato di lavoro preparato. Assicurarsi che tutti i pozzetti siano coperti e che il siero non fuoriesca dai pozzetti. Si deve evitare il contatto diretto del puntale della pipetta con la superficie del vetrino.
8. Posizionare i vetrini nella camera umida e incubare a 37 °C per 60 minuti.
9. Dopo l'incubazione, lavare accuratamente i vetrini con PBS da un flacone di lavaggio, facendo attenzione a non dirigere il getto sui pozzetti del test. Questo può essere fatto dirigendo il getto di PBS lungo il centro del vetrino, inclinando il vetrino prima verso i pozzetti 1-5 e poi verso i pozzetti 6-10.
10. Immergere i vetrini in un piatto di colorazione o in una vaschetta Coplin contenente PBS e lavare per 15 minuti a temperatura ambiente, cambiando il PBS dopo 5 minuti per aumentare la forza di lavaggio.
11. Rimuovere i vetrini dal vaschetta di colorazione e drenare il tampone in eccesso. Con una carta assorbente, asciugare l'area esterna ai pozzetti. Non toccare la superficie dei pozzetti.
12. Trasferire immediatamente il vetrino in una camera umida e aggiungere 20-25 µL del rispettivo coniugato FITC in ciascun pozzetto. Il coniugato deve coprire l'intero pozzetto. Non lasciare che i pozzetti si asciughino.
13. Incubare i vetrini a 37 °C in una camera umida coperta e al buio per 30 minuti.
14. Dopo l'incubazione lavare i vetrini con PBS come ai punti 9 e 10.
15. Applicare una piccola goccia di liquido di montaggio su ciascun pozzetto di un vetrino. Posizionare un vetrino coprioggetto sul vetrino e leggere immediatamente i risultati. Fare attenzione a non

intrappolare sacche d'aria sotto il vetrino coprioggetto.

Nota: rimuovere il liquido di montaggio in eccesso con un tovagliolo di carta, evitando di muovere direttamente il vetrino coprioggetto.

L'eccesso di terreno di montaggio su un vetrino può causare un'elevata fluorescenza di fondo dovuta alla dispersione della luce.

16. Esaminare le reazioni al microscopio a fluorescenza con un ingrandimento totale di 400x o 800x.

Interpretazione dei risultati

I controlli devono corrispondere alle reazioni specifiche del lotto indicate nel certificato QC. Le cifre riportate nella tabella sottostante sono solo a titolo indicativo e non riflettono i dati del lotto attuale.

Campione	Risultati attesi
Controllo positivo	da 1 to 4 +
Controllo negativo	negativo*

* negativo: I treponemi possono essere visibili ma non sono fluorescenti.

Per una corretta interpretazione, i risultati devono essere confrontati con i controlli.

Se è richiesta un'ulteriore diluizione dei campioni o dei controlli in base al titolo di screening, questa può essere ottenuta mediante diluizione seriale con PBS sul titolo di screening.

Interpretazione dei risultati dei campioni

Campioni positivi: I treponemi mostrano una fluorescenza verde. L'intensità della fluorescenza dipende dalla concentrazione degli anticorpi.

In una reazione positiva alle IgM, la forma esterna del Treponema può mostrare un leggero segnale diffuso, un po' difficile da mettere a fuoco. Questo può essere visto come una tipica reazione IgM.

L'intensità della fluorescenza può essere valutata su una scala da 1+ a 4+. Per la titolazione, un'intensità di 1+ è considerata minimamente reattiva.

In generale, la reattività di fondo in un test IgM è leggermente più forte rispetto a un test IgG.

Campioni borderline: Mostrano una fluorescenza debole ma comunque percepibile (+/-) e devono essere ripetuti.

Campioni negativi: Nella maggior parte dei casi non sono visibili treponemi. I treponemi colorati di verde ma non fluorescenti devono essere letti come NEGATIVI.

In alcuni casi si osserva un pattern disomogeneo nella diluizione di screening 1:5. La fluorescenza si ottiene in alcuni treponemi o in parti di essi, mentre altri treponemi nello stesso pozzetto sono solo colorati senza alcuna fluorescenza. Questi pozzetti devono essere letti come negativi.

Limitazioni / Interferenze

1. Il test FTA-ABS IgM può occasionalmente dare un risultato falso positivo in alcune condizioni o malattie del paziente, come la gravidanza, la lebbra e il lupus eritematoso sistemico (vedi riferimenti 5, 6).
2. I sieri con un alto titolo di anticorpi anti-Borrelia (> 1:640) possono mostrare una fluorescenza verde del Treponema.
3. Il test FTA-ABS IgM ha dimostrato di essere altamente sensibile e specifico, tuttavia i risultati devono essere considerati insieme a tutti i test sierologici, alla storia clinica e ad altri aspetti della gestione del paziente per essere considerati diagnosticamente significativi.
4. I treponemi patogeni includono il *T. pallidum*, causa della sifilide, il *T. pertenue*, causa dello framboesia e il *T. carateum*, causa della pinta. L'unico treponema importante in Europa è il *T. pallidum*. Inoltre, esistono molte specie commensali di treponemi ed è importante differenziarle da *T. pallidum* prima di formulare una diagnosi di sifilide primaria.
5. I treponemi commensali possono essere coltivati in terreni artificiali, mentre i tentativi di coltivare in vitro i treponemi patogeni sono falliti.
6. La diagnosi clinica di sifilide viene confermata in laboratorio dimostrando la presenza di *T. pallidum* negli essudati delle lesioni, oppure dimostrando la presenza di anticorpi sierici contro l'organismo. I metodi utilizzati per misurare la risposta anticorpale all'infezione treponemica possono essere suddivisi in due categorie principali:
 - a) Test per la misurazione degli anticorpi contro gli antigeni treponemici non specifici, come i test della cardiolipina o dell'antigene lipoideo. In passato questi test erano chiamati "Reagine".
 - b) Test per misurare gli anticorpi contro gli antigeni specifici dei treponemi patogeni, ovvero il test di agglutinazione delle particelle di *T. pallidum* (TPPA) e il test di assorbimento degli anticorpi treponemici fluorescenti (FTA-ABS).

Caratteristiche delle prestazioni

Sensibilità e specificità

Il test è stato validato su un pannello composto da 354 campioni di siero e plasma. Il pannello è stato ricavato da campioni clinici positivi e negativi. Come prodotti di confronto sono stati utilizzati MASTABLOT™ TP IgM (Mast Diagnostica, Reinfeld, Germania, REF 6653M08) e SERODIA®-TP-PA (Fujirebio Inc., Tokyo, Giappone, REF 226414).

La performance analitica è stata calcolata come segue:

	Formula	Valore
Sensibilità	$\frac{TP}{(TP + FN)}$	95.73 %
Specificità	$\frac{TN}{(TN + FP)}$	91.14 %
Valore predittivo positivo	$\frac{TP}{(TP + FP)}$	84.21 %
Valore predittivo negativo	$\frac{TN}{(TN + FN)}$	97.74 %
Efficienza	$\frac{(TP + TN)}{total}$	92.66 %
Rapporto di verosimiglianza positivo	$\frac{(Sens)}{(1 - Spec)}$	10.80
Rapporto di verosimiglianza negativo	$\frac{(1 - Sens)}{(Spec)}$	0.05

(Abbreviazioni: TP: Vero positivo, TN: Vero negativo, FN: Falso negativo, FP: Falso positivo)

Conformità del test

La sensibilità e la specificità di MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM sono in linea con le prestazioni dei prodotti di confronto.

Reattività crociata

20 campioni di Borrelia sono stati analizzati per verificare la reattività crociata. I sieri con un elevato titolo di anticorpi anti-Borrelia hanno talvolta dato risultati falsi positivi (vedere Limitazioni).

Tracciabilità

Il campione INSTAND e. V. RV 311, 2012, Pr. 61 (Siero RVTP 5) è un campione positivo alle IgM e può essere utilizzato per regolare il siero usato come controllo positivo.

Precisione del test

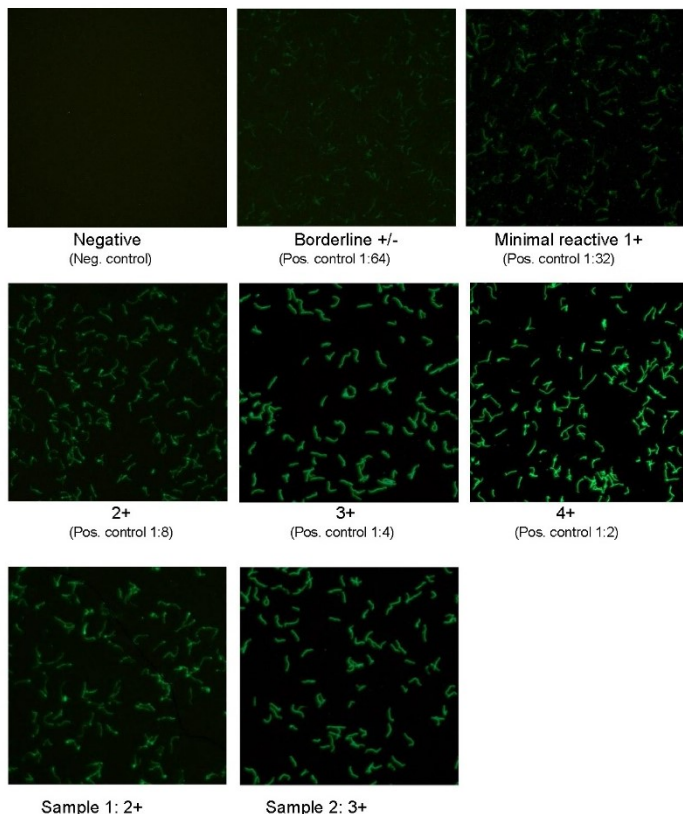
Quando la titolazione del controllo positivo (diluizione seriale da 1:5 a 1:640) è stata analizzata 10 volte da lotti diversi secondo la procedura di analisi, tutti i risultati sono risultati compresi entro ± 1 livello di fluorescenza. I test all'interno dello stesso lotto hanno dimostrato una ripetibilità analoga. È stata quindi dimostrata la precisione del saggio.

Effetto gancio ad alta dose (effetto prozona)

Il test MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM è un test di rilevamento a immunofluorescenza indiretta che utilizza un anticorpo accoppiato a FITC (test a 2 fasi). È stata aggiunta una fase di lavaggio in cui vengono rimossi tutti gli anticorpi non specifici o non legati. In questo modo si evita l'effetto gancio ad alta dose.

Intervallo di misurazione

Quando la titolazione del controllo positivo (IgM: 1:2-1:256) e la diluizione del campione (1:5) sono state testate secondo la procedura di prova, sono stati documentati i seguenti risultati per l'intervallo di misurazione:



Cut-off

Il cut-off (diluizione 1:5, intensità minima di fluorescenza 1+) è stato definito su un pannello composto da 354 campioni di siero e plasma positivi e negativi, corrispondenti alla sensibilità e alla specificità indicate.

Prestazioni cliniche

Le prestazioni cliniche sono state dimostrate da una pubblicazione peer-reviewed e da test di competenza.

Müller et al., 2006 (riferimento 9) hanno dimostrato, utilizzando una meta-analisi delle indagini di controllo di qualità esterne del German Infection Serology Proficiency Testing Program, un'accuratezza media dell'88% (qualitativa) / 65,8% (quantitativa) per il test di assorbimento degli anticorpi treponemici fluorescenti.

Per il test MASTAFLUOR™ FTA-ABS IgM, vengono eseguite 1-2 volte all'anno prove di idoneità (INSTAND e.V. Ringversuche, Sezione 311, Treponema pallidum). I dati sui confronti interlaboratorio saranno forniti su richiesta.

Disponibilità della sintesi della sicurezza e delle prestazioni (Art. 29, IVDR)

Il rapporto sarà disponibile nel database EUDAMED (non appena il modulo sarà disponibile). (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>).

Il rapporto SSP sarà fornito su richiesta.

Segnalazione degli incidenti gravi

Tutti gli incidenti gravi verificatisi in relazione al dispositivo devono essere segnalati al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui è stabilito l'utilizzatore e/o il paziente.

Riferimenti e cronologia delle modifiche

I riferimenti e la cronologia delle modifiche sono riportati alla fine delle istruzioni per l'uso.

Referenzen / References / Références / Riferimenti:

1. 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.
2. Rath PM, Marsch WC, Brade V, Fehrenbach FJ (1994): Serological distinction between syphilis and Lyme borreliosis. Zentralbl. Bakteriol. 280 (3).
3. Hans-Jochen Hagedorn, Syphilis; in Lothar Thomas, Labor und Diagnose 8. Auflage (2012), TH-Books; Kapitel 42.14: 2006 - 2017
4. Annual epidemiological report 2014 - Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections; Chapter: Syphilis, p. 51-53; <http://ecdc.europa.eu/>
5. 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
6. 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
7. Syphilis, in Surveillance Report, Sexual Transmitted Infections in Europe, 2013, p. 25-31; www.ecdc.europa.eu
8. 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.
9. 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.
10. Thomas, L.: Haemolysis as influence & interference factor (2002) eJIFCC 13(4) 95-8.
11. Nikolac, N.: Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management (2014) Biochem 24(1): 57-67
12. Mainali, S. et al: Frequency of icteric interference in clinical chemistry laboratory tests and causes of severe icterus (2021) Pract. Lab. Med. e00259

Änderungshistorie / Change History / Historique des changements / Revisioni

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

Chapter	Description of change
Contents	Detailed description of ProClin concentration and link to warnings
Warnings	Update of the warning for ProClin



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