

Test per la determinazione qualitativa delle reagine plasmatiche

PRINCIPIO

L'RPR carbone è un test di agglutinazione non treponemico su vetrino per la individuazione delle plasmareagine nel siero umano con metodo qualitativo e semiquantitativo.

Particelle di carbone rivestite con un complesso lipidico vengono agglutinate se mescolate con campioni contenenti reagine.

SIGNIFICATO CLINICO

Le reagine sono un gruppo di anticorpi prodotti verso alcuni componenti dei danni tissutali provocati da *Treponema pallidum*. Questo microrganismo produce danni al fegato ed al cuore, con rilascio di frammenti tissutali. L'organismo reagisce verso questi frammenti producendo anticorpi chiamati reagine.

REATTIVI

R1 Particelle di carbone rivestite di complessi lipidici (cardiolipine, lecitine e colesterolo) in tampone fosfato 20 mmol/l, pH 7.0

R2 Controllo Positivo tappo rosso: siero umano artificiale con titolo di reagine $\geq 1/4$

R3 Controllo Negativo tappo blu: siero animale con conservante

- Slide a 6 divisioni


- Stirrer

CAMPIONI

Siero fresco o plasma. Stabile 7 giorni a 2-8° C o 3 mesi a -20° C.

Campioni con presenza di fibrina devono essere centrifugati. Non utilizzare campioni fortemente emolitici o lipemici.

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

 *I componenti di origine umana sono stati testati e trovati negativi per la presenza di HbsAg, HCV e anticorpi HIV (1/2). Tuttavia maneggiare con cautela come potenzialmente infettivi.*

Attenzione: i reattivi contengono Sodio Azide (0.095%) come conservante. Evitare l'ingestione ed il contatto con pelle, occhi e mucose.

CALIBRAZIONE

La sensibilità del reattivo è stata calibrata verso il Siero Reattivo Umano (HRS) del CDC (centro per il controllo delle malattie).

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti sono pronti all'uso.

R1 (RPR Carbone) agitare moderatamente per disperdere le particelle di carbone prima dell'utilizzo.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Tutti i componenti sono stabili fino alla scadenza stampata sull'etichetta se conservati ben chiusi a 2-8° C e protetti da contaminazione durante l'uso. Non congelare: il congelamento può cambiare la funzionalità del test.

Mantenere i flaconcini sempre in posizione verticale. Se la posizione è cambiata, agitare gentilmente per dissolvere aggregati eventualmente presenti.

Deterioramento del reattivo: presenza di particelle e torbidità.

MATERIALI AUSILIARI

Agitatore rotante con velocità regolabile a 80/100 r.p.m.

Agitatore Vorte, Micropipetta da 20/50 µl.

PROCEDIMENTO QUALITATIVO

1. Portare i reattivi ed i campioni a 15-25° C. La sensibilità del test può essere ridotta dalle basse temperature.
2. Dispensare 50 µl del campione ed una goccia dei controlli positivi e negativi separatamente nelle zone circolari dello slide.
3. Agitare vigorosamente o con un vortex l'RPR carbone prima dell'uso. Prelevare il reagente rimuovendo le bolle d'aria dalla micropipetta.
4. Aggiungere una goccia (20 µl) adiacente al campione da testare.
5. Mescolare le gocce con uno stirrer, spandendole per tutta la superficie del cerchio. Utilizzare un differente stirrer per ogni campione.

6. Mettere lo slide sull'agitatore rotante a 80-100 r.p.m. per 8 minuti. Risultati falsi positivi possono apparire se la lettura è effettuata dopo gli 8 minuti.

PROCEDIMENTO SEMIQUANTITATIVO

1. Preparare una serie di diluizioni seriali (1:2) del campione in soluzione salina 9 g/l.
2. Procedere con ogni diluizione come per il metodo qualitativo.

LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Esaminare microscopicamente la presenza o l'assenza di agglutinazioni visibili subito dopo aver tolto lo slide dall'agitatore.

Ruotare due volte lo slide a mano prima della lettura.

Interpretazione

| Agglutinazione | Letture | Risultato |
|------------------------------|---------|---------------------|
| Media o ampia agglutinazione | P | Positivo |
| Discreta agglutinazione | D | Debolmente positivo |
| Nessuna | N | Negativo |

Il titolo nel metodo semiquantitativo, è definito come la diluizione più elevata che mostra agglutinazione.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Si raccomandano controlli positivi e negativi per monitorare la performance della procedura, così come un campione comparativo per una migliore interpretazione dei risultati. Tutti i risultati diversi dal controllo negativo sono da considerarsi positivi.

PRESTAZIONI DEL REATTIVO

1. Sensibilità analitica: determinazione accurata secondo materiale di riferimento sotto le condizioni di analisi descritte (v. "Calibrazione").
2. Effetto prozona: non ci sono effetti prozona fino a titoli di $\geq 1/128$.
3. Sensibilità diagnostica: 100%
4. Specificità diagnostica: 98%

INTERFERENZE

La bilirubina non interferisce sino alla concentrazione di 20 mg/dl.

L'emoglobina non interferisce sino alla concentrazione di 10 g/l.

Lipidi non interferisce sino alla concentrazione di 10 g/l.

Il fattore reumatoide interferisce alla concentrazione di 300 IU/ml.

LIMITI DEL TEST

- Elevate temperature possono seccare i componenti sul vetrino causando una falsa agglutinazione che può essere interpretata come positivo. Si raccomanda di posizionare i vetrini sotto una copertura umidificata.

- Il test al carbone non è specifico per la sifilide. Tutti i positivi devono essere riconfermati con metodi al treponema, come TPHA e FTA-Abs.

- Risultati negativi non escludono la diagnosi di sifilide che deve essere integrata da altre indagini.

- Si possono avere falsi positivi con infezioni quali toxoplasmosi, polmonite virale, mononucleosi infettiva, gravidanze o malattie autoimmuni.

BIBLIOGRAFIA

Gorge P. Schmid. Current Opinion in Infectious Diseases 1994;7 34-40.



Sandra A Larsen et al. Clinical Microbiology Reviews 1995; 8 (1): 1-21.


Sandra Larsen et al. A manual of test for Syphilis American Public Health Association 190: 1-192.


Joseph Earle Moore et al. Gastrointestinal Haemorrhage 1952; 150 (5): 467-473.



Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4th ed AACC Press. 1995.

SIMBOLOGIA

 Consultare istruzioni per l'uso  Rischio biologico

 Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79/CE)

 Limiti temperatura di conservazione

 Dispositivo medico-diagnostico in vitro  Fabbricante

Qualitative determination of plasma reagins

PRINCIPLE

The RPR carbon is a non-treponemal slide agglutination test for the qualitative and semiquantitative detection of plasma reagins in human serum. Carbon particles coated with a lipid complex are agglutinated when mixed with samples containing reagins.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Reagins are a group of antibodies against some components of the damage tissue from patients infected by treponema pallidum, the agent which causes the syphilis. This microorganism produces some damage to the liver and heart, releasing some tissue fragments. Immunological patient system reacts producing reagins, antibodies against these fragments.

REAGENTS

R1 Carbon particles coated with a lipid complex, cardiolipin, lecithin and cholesterol, in phosphate buffer 20 mmol/l, pH 7.0


R2 Positive control red cap: human artificial serum with regain titer $\geq 1/4$

R3 Negative control blue cap: animal serum. Preservative.
- Slide with 6 divisions
- Stirrer

SAMPLES

Fresh serum or plasma. Stable 7 days at 2-8°C or 3 months at -20° C. Samples with presence of fibrin should be centrifuged. Do not use highly hemolyzed or lipemic samples.

PRECAUTION IN USE

 Components from human origin have been tested and found to be negative for the presence of HbsAg, HCV and antibody to HIV (1/2). However handle cautiously as potentially infectious.

Caution: the reagents contain Sodium Azide (0.095%) as preservative. Avoid swallowing and contacting with skin, eyes and mucous membranes.

CALIBRATION

The reagent sensitivity is calibrated against the "Human Reactive Serum" from CDC (Centre for Disease Control).

PREPARATION

RPR carbon: swirl the reagent gently to disperse the carbon particles before use. Open the RPR carbon vial, place the micropipette to the dispensing vial and draw by suction the required volume of RPR carbon. Once the test is completed, return the reagent to the original vial and rinse the micropipette and vial with distilled water.

STORAGE AND STABILITY

All the kit components will remain stable until the expiration date printed on the label, when stored tightly closed at 2-8° C and contaminations are prevented during their use. Do not freeze: frozen reagents could change the functionality of the test

Always keep vials in vertical position. If position is changed, gently mix to dissolve aggregates that may be present.

Reagents deterioration: presence of particles and turbidity.

ADDITIONAL EQUIPMENT

Mechanical rotator with adjustable speed at 80/100 r.p.m.
Vortex mixer and micropipette from 20/50 µl.

QUALITATIVE PROCEDURE

1. Allow the reagents and samples to reach room temperature. The sensitivity of the test may be reduced at low temperatures.
2. Place 50µl of the sample and one drop of each positive and negative controls into separate circles on the slide test.
3. Mix the RPR carbon reagent vigorously or on a vortex mixer before using. Invert the dropper assembly and press gently to remove air bubbles from the micropipette.
4. Place the micropipette in a vertical position and perpendicular to the slide, and add one drop (20 µl) of this reagent next to the sample to be tested.
5. Mix the drop with a stirrer, spreading them over the entire surface of the circle. Use different stirrer for each sample.
6. Place the slide on a mechanical rotator at 80-100 r.p.m. for 8 minutes. False positive results could appear if the test is read later than two minutes.

SEMIQUANTITATIVE PROCEDURE

1. Make serial two fold dilutions of the sample in 9 g/l saline solution.
2. Proceed for each dilution as in the quantitative method.

READING AND INTERPRETATION

Examine macroscopically the presence or absence of visible agglutination immediately after removing the slide from the rotator. Rotate the slide twice by hand before reading.

Interpretation

| Agglutination | Reading | Report |
|--|---------|-----------------|
| Medium or large clumps | R | Reactive |
| Small clumps | W | Weakly reactive |
| No clumping or very slight "roughness" | N | Non reactive |

The titer, in the semiquantitative method, is defined as the highest dilution showing a positive result.

QUALITY CONTROL

Positive and negative controls are recommended to monitor the performance of the procedure, as well as a comparative pattern for a better result interpretation.

All results different from the negative control will be considered as a positive.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Analytical sensitivity: Accurate titer determination of the reference material, under the described assay conditions (see "Calibration").
2. Prozone effect: no prozone effect was detected up to titer $\geq 1/128$.
3. Diagnostic sensitivity: 100%
4. Diagnostic specificity: 98%

INTERFERENCES

Bilirubin does not interfere up to concentration of 20 mg/dl.

Hemoglobin does not interfere up to concentration of 10 g/l.

Lipemia does not interfere up to concentration of 10 g/l.

Rheumatoid factors interfere up to concentration of 300 IU/ml.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- High temperature may cause test components to dry on the slide giving an agglutination aspect that can be interpreted as false positive results. It is recommended to place the slide under a humidifying cover.

- RPR carbon test is non-specific for syphilis. All reactive samples should be retested with treponemal methods such as TPHA and FTA-Abs to confirm the results.

- A non reactive result by itself does not exclude a diagnosis of syphilis. Clinical diagnosis should not be made by findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

- False positive results have been reported in diseases such as infectious mononucleosis, viral pneumonia, toxoplasmosis, pregnancy and autoimmune diseases.

BIBLIOGRAPHY

Gorge P.Schimid. Current Opinion in Infectious Diseases 1994;7 34-40.



Sandra A Larsen et al. Clinical Microbiology Reviews 1995; 8 (1): 1-21.

Sandra Larsen et al. A manual of test for Syphilis American Public Health Association 190: 1-192.


Joseph Earle Moore et al. Gastrointestinal Haemorrhage 1952 ; 150 (5) : 467-473.

Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4th ed AACCC Press. 1995.

SYMBOLS

 Red instruction for use  Biological risk

 CE mark (requirement of 98/78 CE regulation)

 Storing temperature limits

 In vitro medical device  Producer