

USO

Dispositivo medico-diagnostico, in vitro, per la determinazione rapida qualitativa e/o semiquantitativa su card delle reagine (un gruppo di autoanticorpi diretti contro componenti tissutali, prodotti dalla maggior parte dei pazienti con infezione da *Treponema pallidum*, agente eziologico della sifilide) nel siero o plasma umano (metodo al carbone).

L'antigene utilizzato proviene da un reagente privo di treponemi, preparato appositamente per l'identificazione rapida e semiquantitativa, attraverso una reazione di co-agglutinazione su card, delle reagine plasmatiche.

Il test, conosciuto come *Rapid Plasma Reagine (RPR)*, viene eseguito testando l'antigene (una miscela di complessi lipidici e particelle di carbone) con il campione di siero da analizzare. Lo sviluppo, o meno, di agglutinazione visibile indica la presenza, o l'assenza, di autoanticorpi reagine nel campione testato^{1,4}.

CONTENUTO DEL KIT

Codice	Confezione	Reagente Antigene
S36809	1 flacone (vetro) 2 ml	Controllo positivo
	1 flacone 1 ml	Controllo negativo
	1 flacone 1 ml	
	3 cards	
	1 ago dispensatore	
	1 flacone (plastica)	

COMPOSIZIONE DEI REAGENTI

- Reagente Antigene (RPR-carbon):** sospensione stabilizzata di cardioliipina (0,003%), lecitina (0,020-0,022 %), colesterolo (0,09%), cloruro di colina ((10%), EDTA (0,0125 mol/L), microparticelle di carbone (0,01%), in tamponi fosfato contenente tiomersale allo 0,1%
- Controllo positivo:** siero di coniglio. Contiene sodio azoturo 0.95 g/l
- Controllo negativo:** siero di provenienza animale. Contiene sodio azoturo 0.95 g/l

Tutti i campioni biologici impiegati devono essere considerati **POTENZIALMENTE INFETTI** e, come tali, manipolati secondo la B.P.L.



ATTENZIONE: il materiale reagentario presente nel kit contiene sodio azoturo: evitare il contatto con la pelle e/o le mucose

CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI.

Il contenuto del kit è stabile fino alla data di scadenza indicata sulle relative etichette, se conservato a 2-8°C ben chiuso, lontano da fonti di luce, evitando accuratamente contaminazioni durante l'uso. **NON CONGELARE.**

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Miscelare delicatamente ed accuratamente il reagente antigene per ottenere una sospensione omogenea. Inserire l'ago dispensatore sul flacone in plastica (flacone dispensatore) ed aspirare la quantità necessaria dal flacone in vetro. I controlli positivo e negativo sono pronti all'uso.

RACCOLTA DEL CAMPIONE



Utilizzare plasma o siero fresco ottenuto per centrifugazione: quest'ultimo può essere conservato a 2-8°C fino a 48 ore (congelare a -20°C per tempi di conservazione prolungati). I campioni di plasma sono utilizzabili entro 48 ore dal prelievo.

MATERIALE AGGIUNTIVO

- Micropipette automatiche
- Agitatore orizzontale orbitante (100 r.p.m.)
- Soluzione fisiologica (NaCl 0,9%, (solo per determinazioni semiquantitative)
- Timer
- Micropiastre con pozzetti a fondo piatto (solo per la procedura operativa III)

PROCEDURA OPERATIVA I (test qualitativo)

- Portare i reattivi ed i campioni a temperatura ambiente (Nota 1).
- Depositare 1 goccia (50 µL) del campione da testare ed una goccia di ciascun controllo in cerchi separati della card di reazione utilizzando un nuovo puntale monouso per ciascuno.
- Risospendere delicatamente il contenuto del flacone dispensatore e, tenendolo in posizione verticale, premerlo leggermente per rimuovere le bolle d'aria dall'ago, permettendo la formazione corretta della goccia.
- Posizionare l'ago dispensatore in posizione verticale perpendicolare rispetto alla card (Nota 2). Premere sulle pareti del flacone dispensatore e lasciar cadere una goccia di reagente antigene in ciascun cerchio, vicino al campione da analizzare (Nota 3)
- Miscelare con l'aiuto di una bacchetta monouso, stendendo la miscela su tutta la superficie interna del cerchio. Impiegare una bacchetta separata per ciascun campione.
- Porre la card sul piano dell'agitatore orbitante, regolato a 100 r.p.m. per 8 minuti.
- Valutare la presenza o assenza di agglutinazione sotto idonea fonte luminosa, entro un minuto dopo aver rimosso la card dall'agitatore rotante

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Non reattivo: sospensione di particelle di carbone uniforme, senza visibile agglutinazione, simile alla reazione del controllo negativo
Reattivo: agglutinazione visibile macroscopicamente di qualsiasi grado (Nota 4)

PROCEDURA OPERATIVA II (test semi-quantitativo)

- Per ciascun campione dispensare 50 µl di soluzione fisiologica in 5 cerchi diversi della card, evitandone la fuoriuscita all'esterno dell'area circolare
- Relativamente a ciascun campione, aggiungere, al primo cerchio utilizzato, 50 µl di campione ed, utilizzando la stessa punta, mescolare la soluzione fisiologica con il campione mediante ripetute aspirazioni ed espulsioni della miscela reattiva e, quindi, trasferire 50 µl di tale miscela al secondo cerchio (diluizione al raddoppio)
- Continuare con le diluizioni al raddoppio fino al quinto cerchio, ed eliminare 50 µl della miscela da quest'ultimo. Le diluizioni in serie risulteranno, pertanto: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32
- Testare ogni diluizione come descritto nei punti da 4 a 7 della PROCEDURA OPERATIVA I

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La procedura è la medesima riportata per il test qualitativo. Il titolo di RPR nel campione viene definito come la più alta diluizione del campione che mostra reattività. La diluizione successiva deve risultare negativa. Qualora la diluizione 1:32 risulti ancora reattiva, ripetere il test iniziando dal campione pre-diluito 1:16. In questo caso utilizzare il controllo negativo diluito 1:50 in soluzione fisiologica al posto della soluzione fisiologica assoluta per effettuare queste nuove diluizioni al raddoppio.

PROCEDURA OPERATIVA III (test qualitativo in micropiastra)

- Con l'ausilio di una micropipetta automatica, dispensare 50 µl di ciascun campione sul fondo di un diverso pozzetto della micropiastra, utilizzando un puntale monouso; dispensare 1 goccia di ciascun controllo in 2 pozzetti diversi.
- Dispensare una goccia di reagente antigene in ciascun pozzetto utilizzato
- Porre la micropiastra sul piano dell'agitatore orbitante, regolato a 200 (±50) r.p.m. per 20 minuti.
- Valutare la presenza o assenza di agglutinazione sotto idonea fonte luminosa, entro un minuto dopo aver rimosso la micropiastra dall'agitatore rotante

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La medesima del test qualitativo

CONTROLLO DI QUALITÀ

Si raccomanda l'utilizzo di siero controllo NEGATIVO e POSITIVO per verificare la qualità della procedura analitica. Il controllo positivo deve evidenziare un'agglutinazione evidente: qualora non fosse possibile ottenere i risultati attesi, il kit dovrebbe essere scartato. Ciascun Laboratorio deve stabilire la propria procedura interna di Controllo di Qualità.

CONSIDERAZIONI CLINICHE⁵

La sifilide è causata dall'infezione umana con il batterio *Treponema pallidum* che può essere trasmesso per via congenita o per contatto sessuale. Il metodo qui descritto permette uno screening rapido di un gran numero di pazienti in modo di garantire tempestivamente il trattamento terapeutico degli eventuali soggetti contagiati. Il test RPR-carbon possiede un elevato valore diagnostico nella diagnosi presuntiva basata, imprescindibilmente, sull'anamnesi ed i riscontri clinici obiettivi

PRESTAZIONI DEL METODO

- La sensibilità analitica è risultata equivalente a quella riscontrata impiegando un siero umano reattivo proveniente dal Center of Disease Control (CDC), Atlanta, GA, USA
- Specificità diagnostica: 98%
- Sensibilità diagnostica: 86% (sifilide primaria) e 100% (sifilide secondaria)
- I risultati ottenuti con la presente procedura analitica non mostrano significative differenze quando correlati a dosaggi effettuati con reagenti di riferimento; sono disponibili, a richiesta, i dettagli relativi a studi di correlazione.
- L'emoglobina (< 10 g/l), la bilirubina (< 20 mg/dl) e la lipemia (< 10 g/l) non provocano interferenze analitiche. I Fattori Reumatoidi (>300 IU/ml) interferiscono. Altre sostanze possono interferire nel dosaggio?

LIMITI DEL METODO

- Reazioni falsamente negative possono essere osservate nelle fasi iniziali della sifilide primaria ed in stati tardivi latenti della malattia
- Utilizzando antigeni cardioliipinici sono state talvolta riscontrate reazioni biologiche falsamente positive, soprattutto in patologie quali la mononucleosi infettiva, il lupus eritematoso e la polmonite virale. La gravidanza, l'uso di narcotici ed alcune patologie autoimmuni possono anch'esse provocare reazioni falsamente positive
- Il liquor non può essere utilizzato quale campione

NOTE

- La sensibilità del test si riduce a bassa temperatura. Risultati ottimali si ottengono tra 20-25°C.
- È di fondamentale importanza posizionare l'ago dispensatore in verticale a 90° rispetto alla card di reazione; in caso contrario non può essere garantita una corretta dispersione di reagente antigene a causa della presenza di aria intrappolata nell'ago stesso
- Alla fine di ciascuna giornata di sedute analitiche, l'ago dispensatore deve essere rimosso dal flacone plastico, sciacquato con acqua distillata, asciugato all'aria ed infine riposto nel relativo involucro
- Alcuni campioni possono esibire un particolare tipo di aggregazione che tende a produrre una granulosità intorno alla parte periferica del cerchio di reazione, ma assente al centro: la risospensione manuale con lieve agitazione la card può permettere discriminare un risultato negativo da uno debolmente positivo

CAUSE DI ERRORE

- Campioni di plasma contenenti un eccesso di anticoagulante possono produrre risultati errati
- I cerchi sulle card non devono essere toccati con le dita, in quanto la deposizione di materiale grasso o oleoso non permette la corretta miscelazione del campione con il reagente antigene
- Non eseguire il test vicino a termoconvettori o condizionatori d'aria, per evitare reazioni falsamente positive
- Malfunzionamento dell'agitatore orbitante, eccesso di campione, reagenti freddi, temperatura ambiente bassa o reagenti antigene scaduto possono produrre reazioni falsamente negative

BIBLIOGRAFIA

- Portnoy, J., et Al., *Pub. Hith Rep.* 77: 645 (1962)
- Portnoy, J., *Pub. Hith Lab.* 23: 43 (1965)
- McGrew, B.E. et Al., *Am. J. Clin. Path.* 50: 52 (1968)
- McGrew, B.E. et Al., *Am. J. Clin. Tech.* 34: 634 (1968)
- Guide to Clinical Preventive Services, 2nd. Ed. U.S. Dept. of Health and Human Services, Washington, DC (1996)
- Young, D.S., *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests.* 4th Edition, AACC Press (1995)

Codici di Riordino:

S36809 RAPID PLASMA REAGINE (RPR-Carbon) 100 Tests



Bio Plastic Sas - 00100 Roma