



INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE
PENTRU MICROBIOLOGIE ȘI IMUNOLOGIE
„CANTACUZINO”

Splaiul Independenței 103, București, 050096

LABORATORUL NATIONAL DE REFERINTA PENTRU ITS

	Elaborat	Verificat	Aprobat
Funcția	Sef laborator	Manager calitate	Director LNR
Nume prenume	Dr. Dan Ionescu		
Semnatura*			
Data			

* Semnatura se aplică pe documentul original

PROCEDURA SPECIFICA

DETECTAREA ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN TESTUL RPR

Cod:

Editia :

Revizia :

Data aplicarii :

Avertisment Documentul de față este proprietatea I.N.C.D.M.I. « CANTACUZINO »
Reproducerea și difuzarea documentului sunt în exclusivitate dreptul I.N.C.D.M.I. «CANTACUZINO»
Copiile sunt numerotate și controlate.

Exemplar nr : _____

Destinatarul: _____

Exemplar : controlat necontrolat

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICĂ DETECTAREA ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN TESTUL RPR card cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării

CUPRINS

INDICATORUL APROBARILOR SI REVIZIILOR	2
CUPRINS	3
1. SCOP	4
2. DOMENIUL DE APLICARE	4
3. DOCUMENTE DE REFERINTA	4
4. DEFINITII SI PRESCURTARI	4
4.1. Definitii.....	4
4.2. Prescurtari	4
5. DESCRIEREA ACTIVITATII	4
5.1. Condiții prealabile	4
5.2. Resurse necesare.....	4
5.3. Executia testului RPR.....	5
5.3.1. Etape preliminare.....	5
5.3.2. Pregatirea probelor pentru testare.....	5
5.3.7. Validarea testarii / Controlul calitatii testarii	7
5.4. Interpretarea rezultatelor testului RPR.....	7
5.5. Limitele testului.....	8
6. RESPONSABILITATI	8
7. FORMULARE / INREGISTRARI, DOCUMENTE CONEXE	8
7.1.FORMULARE / INREGISTRARI	8
7.2. DOCUMENTE CONEXE.....	8
8. ANEXE	8

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICĂ	Exemplar nr.
	DETECTAREA ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN	Editia:
	TESTUL RPR card	Revizia:
	cod :	Data aplicării

1. SCOP

Procedura descrie operațiunile PENTRU executarea testului cardioliipinic RPR card cu trusa « RPR reditest » Biokit S.A.

Antigenul RPR este preparat dintr-o suspensie de antigen VDRL **modificat si adionat cu particule de carbune**, pentru a elimina necesitatea inactivarii serului, pentru a mari stabilitatea suspensiei si pentru a facilita citirea macroscopica a rezultatelor.

Pentru testare, antigenul RPR se amesteca cu ser (inactivat sau nu) sau plasma neinactivata, pe un card din material plastic. Testul RPR detecteaza anticorpi anti-lipoidici ca si testul VDRL.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se executa pe probe de ser si plasma, de catre personalul autorizat in cadrul Laboratorului ITS din I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO pentru depistarea serologica a sifilisului si urmarirea eficientei tratamentului .

Testul nu se utilizeaza pe probe de LCR.

3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- 3.1. Manualul Calitatii cod MC-EM-01
- 3.2. Bench-level Laboratory Manual for Sexually Transmitted Diseases WHO/VDT/89.443
- 3.3. A Manual of Tests for Syphilis, 9th edition, ed. By S.A. Larsen et al., 1998
- 3.4. Ghid de Diagnostic si Tratament al Infectiilor Transmise Sexual, MSF 2001, Bucuresti
- 3.5. Prospectul utilizatorului, redactat de producator.

4. DEFINITII SI PRESCURTARI

4.1. Definitii

Testul RPR = test netreponemic (nespecific) de floclurare, macroscopic, folosit pentru depistarea serologica calitativa si semicantitativa a sifilisului.

4.2. Prescurtari

RPR = Rapid Plasma Reagin

ID/SN = numar de identificare/numar de serie

5. DESCRIEREA ACTIVITATII

5.1. Condiții prealabile

- Temperatura camerei de lucru trebuie sa fie +23+29°C. Procedura nu se executa pana cand temperatura nu se incadreaza intre aceste limite, deoarece rezultatele testului pot fi influentate.
- Fiecare nou lot de truse trebuie evaluat comparativ cu lotul anterior, antigenul testandu-se cu martorii de ser din trusa si cu alte seruri de control de reactivitate cunoscuta. Daca se obtin rezultate discrepante (diferente mai mari de o dilutie in testul cantitativ paralel), lotul nou se respinge.
- Aparatele si dispozitivele necesare executarii procedurii trebuie sa fie in stare de buna functionare.
- Probele de testat trebuie sa corespunda din punct de vedere cantitativ (min. 0.5ml) si calitativ. Nu se testeaza probe hemolizate, lipemice, contaminate bacterian/fungic, probe de plasma pastrate mai mult de 48h, probe de ser pastrate mai mult de 5 zile la + 2+8°C. **Nu se testeaza probe de LCR.**
- Personalul desemnat sa execute testarile trebuie sa aiba calificarea/experienta necesara.

5.2. Resurse necesare

- 5.2.1. Reactivi si materiale furnizate de trusa

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICĂ DETECTAREA ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN TESTUL RPR card	Exemplar nr.
	cod :	Editia:
		Revizia:
		Data aplicării

- Suspensie antigenica : 0.003% cardiolipina, 0.020-0.022% lecitina, 0.09% colesterol, 0.0125M EDTA, 0.01M Na₂HPO₄, 0.01MKH₂PO₄, 0.01% thiomersal, 10% choline chloride (v/v), 0.01% microparticule de carbune, apa distilata;
- Control pozitiv : preparat din ser imun de iepure cu 0.1% azida de sodiu;
- Flacon cu ac calibrat pentru repartizarea antigenului (17µl/picatura), baghete de unica folosinta pentru etalarea probei pe card, carduri plastic(10 locuri),de unica folosinta.

5.2.2. Condițiile de pastrare a reactivilor din trusa

- Reactivii din trusa raman stabili pana la data expirarii (marcata pe ambalaj si etichete), daca se pastreaza corespunzator (+ 2+8°C). NU se ingheata.
- Daca antigenul este expus la temperaturi care depasesc+30°C, pot sa apara reactii fals pozitive.

5.2.3. Reactivi si materiale nefurnizate de trusa

- Solutie salina fiziologica (0.9% NaCl) pentru tehnica semicantitativa
- Vas cu dezinfectant (sol. hipoclorit de sodiu 0.5-1%)
- Hartie de filtru
- Manusi latex

5.2.4. Echipamente/dispozitive

- Agitator rotativ mecanic in plan orizontal ,cu 20mm diametru de rotatie, reglat la 100 rpm
- Ceas de semnalizare , lampa cu halogen
- Termometru de camera
- Pipeta automata 20-200 microL, conuri de prelevare galbene
- Centrifuga de masa pentru centrifugarea probelor, daca este cazul

5.3. Executia testului RPR

Testul se poate executa calitativ (pe proba nediluata) sau semicantitativ (dilutii binare de ser in solutie salina 0.9%) pe cardurile de plastic.

Executia operatiunilor in succesiunea lor, rezultatul verificarilor si calculele necesare se inregistreaza in Fisa de Lucru cod:.

5.3.1. Etape preliminare

- Se verifica temperatura camerei de lucru (+23+29°C) .
- Se pregateste spatiul de lucru pentru executarea procedurii si asigurarea masurilor de biosecuritate:
 - se elibereaza locul de obiectele care nu sunt necesare,
 - se aduc stative potrivite, hartie de filtru, vasul cu dezinfectant ,pentru dispensere si conuri de prelevare folosite.
- Se scot reactivii si probele din frigider si se lasa in repaos la temperatura de lucru 30min.
- Se verifica starea de functionare a echipamentelor utilizate pentru efectuarea testului si anume:
 - numarul de rotatii/min ale agitatorului rotativ care trebuie sa fie 100 rpm (se numara rotatiile 15 sec x 4)
 - centrifuga de masa, functionala.
- Se completeaza Fisa de lucru Cod:.

5.3.2. Pregatirea probelor pentru testare

- Se contoleaza aspectul probelor si, daca este nevoie, se clarifica prin centrifugare (5min la 1200rpm).

5.3.3. Pregatirea suspensiei antigenice

- Se agita cu grija flaconul cu antigen pentru omogenizare (suspensia trebuie sa fie omogena).
- Se ataseaza acul de repartizare la flaconul de plastic si se aspira suspensia antigenica.

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICĂ	Exemplar nr.
	DETECTAREA ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN	Editia:
	TESTUL RPR card	Revizia:
	cod :	Data aplicării

- Se noteaza pe flaconul de repartizare numarul lotului de antigen, data de expirare si data transferarii din flaconul initial.
- Se executa controlul suspensiei antigenice, prin testare calitativa, cu martorul pozitiv inclus in trusa. In urma testarii, martorul pozitiv trebuie sa produca o floculare clara. Daca rezultatul nu este satisfactor, se repeta testul de control si, in cazul unui nou rezultat nesatisfactor, suspensia antigenica se arunca.

5.3.4. Executia testului calitativ

- Cu pipeta automata se repartizeaza 50 μ L proba de testat intr-un cerc de pe card. Este inclus obligatoriu si **Controlul pozitiv**.
Cu capatul astupat si latit al baghetei se intinde picatura pe toata suprafata cercului (NU trebuie depasita limita cercului). Se arunca bagheta in dezinfectant.
- Se agita usor flaconul de repartizare cu antigen dupa care, tinandu-l in pozitie verticala, se lasa sa cada cateva picaturi in capacul flaconului (pentru eliminarea aerului din ac).
- Apoi, se repartizeaza cate o picatura de antigen in fiecare cerc, peste proba detestat si Controlul pozitiv. NU se amesteca.
- Se recupereaza antigenul din capacul flaconului.
- Card-ul se pune pe agitator, se acopera cu capac (captusit cu hartie de filtru umeda si se agita **8 min la 100rpm**).
- Dupa agitare, cardul se roteste si se balanseaza scurt cu mana, pentru a reusi diferentierea rezultatelor minim reactive de cele nonreactive.
- Citirea se face macroscopic sub lumina puternica, notându-se prezența (indiferent de grad) sau absența agregarii particulelor de carbon, respectiv Reactiv / Nereactiv.
- Rezultatele se noteaza în Fisa de Inregistrare Rezultate cod :
- Dupa terminarea lucrului, acul se spala cu apa distilata (se usuca in termostat), se inchid flacoanele cu reactivi si se pun in frigider .

5.3.5. Executia testului (semi)cantitativ

- Prepararea dilutiilor de ser/plasma (cf. schema) :

Nr. cerc	1	2	3	4	5
SF (μ l)	-	50	50	50	50
Proba (μ l)	50	50	-	-	-
Amestc si transfer (μ l)		→ 50	→ 50	→ 50	→ 50
Dilutie	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16

- se repartizeaza cate 50 μ l de solutie fiziologica in cercurile de pe card de la 2-5 ; se repartizeaza aceeasi cantitate (50 μ l) din proba in cercul 1 si cercul 2;
- cu acelasi con de prelevare, se amesteca serul cu diluentul din cercul 2 prin cateva cicluri aspirare-respingere;
- se transfera 50 μ l din amestec direct peste in cercul 3;
- se repeta operatiunea, cu transferarea a cate 50 μ l in cercurile 4 si 5, dupa care se arunca ultimii 50 μ l;
- incepand de la dilutia cea mai mare (cercul 5) si folosind capatul inchis si latit al baghetei se intinde proba pe toata suprafata cercului. Se continua in sensul 4→1;
- dupa terminarea operatiunii se arunca bagheta folosita in vasul cu dezinfectant.

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICĂ DETECTAREA ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN TESTUL RPR card cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării

- Se agita usor flaconul de repartizare cu antigen dupa care, tinandu-l in pozitie verticala, se lasa sa cada cateva picaturi in capacul flaconului (pentru eliminarea aerului din ac).
- Se continua cf. procedurii testului calitativ.
- Rezultatele se noteaza în Fisa de Inregistrare rezultate Cod :

5.3.6. Aprecierea rezultatelor

Citire	Apreciere/ Inregistrare
Prezenta de flocoane (agregate) caracteristice negre (de carbune), care pot sa fie foarte fine sau grosiere.	Reactiv (R)/ pozitiv
Suspensia are aspect omogen, de culoare gri sau poate prezenta un aspect granular fin pe tot cercul sau mai mult in centru.	Nereactiv (N)/ negativ

Unele probe nereactive pot sa prezinte un aspect usor grunjos care are tendinta sa fie mai pronuntat spre periferia cercului si omogen in centrul cercului. O rotire scurta si balansarea cardului cu mana pot sa ajute in diferentierea fata de un tip de reactie minim reactiva.

Probele cu rezultat pozitiv se retesteaza prin tehnica semicantitativa, dupa care se confirma cu un test treponemic.

Citirea si raportarea rezultatelor semicantitative

Titrul aproximativ = dilutia cea mai mare care prezinta inca o reactie vizibila clara.

5.3.7. Validarea testarii / Controlul calitatii testarii

- Testarea se valideaza daca rezultatul controlului zilnic de antigen a fost satisfactor : floclare clara in serul pozitiv de control din trusa.
- Controlul calitatii testarii este asigurat de respectarea / documentarea conditiilor prealabile enumerate la pct. 5.1. si de executarea corecta a etapelor de lucru enumerate in procedura.

5.4. Interpretarea rezultatelor testului RPR

- Testul RPR este unul din testele curent utilizate pentru diagnosticul sifilisului. Valoarea predictiva a testului RPR reactiv in diagnosticul serologic al sifilisului creste cand se combina cu un test treponemic reactiv, cum ar fi TPHA sau FTA-Abs.
- Un test **RPR reactiv** poate sugera o infectie in antecedente sau prezenta, cu *Treponema pallidum*; totusi poate sa fie, de asemenea, o **reactie fals pozitiva (BFP)**. BFP pot sa apara din cauza unor erori de laborator ca si datorita unor anticorpi serici fara legatura cu infectia sifilitica. Erorile tehnice pot fi eliminate prin repetarea testarii pe aceeasi proba si pe o proba de ser sigur nereactiv. **BFP datorate unor infectii netreponemice sau alte stari patologice se detecteaza in conditiile obtinerii unui rezultat repetat negativ la testul treponemic.**
- Un test **RPR nereactiv** fara evidenta clinica de sifilis: poate sugera absenta unei infectii curente sau o infectie corect tratata in antecedente.
- Un test **RPR nereactiv** cu manifestari clinice sugestive: poate sa apara in sifilisul primar in perioada de incubatie; in sifilisul secundar ca rezultat al fenomenului de prozona (vezi limitele testului); in unele cazuri de sifilis tardiv.
- Cand se executa testul RPR (semi)cantitativ la pacientii cu sifilis, o crestere de patru ori a titrului la repetarea testului pe o noua proba poate sugera: infectia activa; o reinfectie sau tratament ineficient; o scadere de patru ori a titrului in sifilisul recent indica de obicei un tratament adecvat.

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICĂ	Exemplar nr.
	DETECTAREA ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN	Editia:
	TESTUL RPR card	Revizia:
	cod :	Data aplicării

5.5. Limitele testului

- Testul RPR nu se folosește pentru LCR.
- Poate să apară ocazional reactie de prozona. Fenomenul de prozona (inhibiția completă sau parțială a reactivității), apare cu serul nediluat; maximum de reactivitate se obține numai cu serul diluat. Fenomenul de prozona poate fi atât de pronunțat încât în testul calitativ poate să apară doar un aspect ușor grunjos (rough) la un ser, care diluat, are o reactivitate puternică. Toate probele de ser, care la testul RPR calitativ dau o reacție cât de cât grunjoasă, trebuie retestate prin procedura cantitativă.
- Testul RPR poate fi pozitiv la persoane din țări în care sunt endemice sifilisul nevenerian, pinta, pian.
- Ocazional, față de antigene cardiolipinice pot să apară reacții biologice fals pozitive (BFP), în special la persoane care folosesc droguri; care au boli cum ar fi lupusul eritematos, mononucleoza, lepra, pneumonii virale sau care au fost vaccinate recent.
- Titrul testelor netreponemice la persoanele care au fost tratate pentru stadiul latent sau tardiv al sifilisului sau care s-au reinfectat nu scade tot atât de repede ca la cele tratate pentru stadiile recente ale unei infecții primare. Aceste persoane pot să rămână "serofast", păstrând un titru scăzut de reactivitate pentru toată viața.

6. RESPONSABILITATI

Procedura este efectuată de către asistent medical.

Verificarea execuției procedurii este efectuată de către șeful de laborator.

7. FORMULARE / INREGISTRARI, DOCUMENTE CONEXE

7.1.FORMULARE / INREGISTRARI

7.1.1. FISA LUCRU TEST VDRL / RPR Cod :

7.1.2. REGISTRU RECEPTIE PROBE – ELIBERARE BULETINE REZULTATE Cod :

7.1.3. REGISTRU GESTIUNE CONTRAPROBE Cod :

7.1.4. BULETIN DE ANALIZA INDIVIDUAL Cod:

7.2. DOCUMENTE CONEXE

8. ANEXE

Anexa 1. Model FISA LUCRU TEST VDRL/ RPR / TPHA Cod :

Anexa 2. Model REGISTRU RECEPTIE PROBE – REZULTATE ANALIZE Cod:

Anexa 3. MODEL BULETIN ANALIZA Cod: