



DIESSE Diagnostica Senese SpA

Via delle Rose 10, 53035 Monteriggioni SI

Tel. ++39/0577/ 587111 - Fax ++39/0577/318690

ISTRUZIONI PER L'USO**RPR COLOUR****REF 028 500 Tests****(Italiano)****1. UTILIZZAZIONE****TEST NON-TREPONEMICO DI FLOCCULAZIONE PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA E SEMIQUANTITATIVA DELLE REAGINE IN SIERO O PLASMA****2. INTRODUZIONE**

L'infezione da *Treponema pallidum* sollecita una complessa risposta anticorpale. I tests non treponemici si basano sulla rivelazione delle reagine, una classe di anticorpi presente nella sifilide e talvolta anche in altre patologie acute e croniche (1). Le reagine compaiono nel siero dopo circa 4-6 settimane dall'infezione, o 1-3 settimane dopo la comparsa della lesione sifilitica.

Come antigene viene usato un estratto purificato di cuore di bue (cardiolipina) addizionato di lecitina e colesterolo. I tests non treponemici vengono routinariamente utilizzati nella sierologia della sifilide, grazie alla loro praticità e riproducibilità, sebbene essi non offrano talvolta una specificità del 100%.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test viene effettuato su siero o plasma. L'antigene è costituito da una sospensione colloidale di cardiolipina, lecitina e colesterolo miscelata a microparticelle di carbone. Quando un siero reattivo viene posto a contatto con l'antigene, si ha la formazione di una flocculazione macroscopica.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT**- Portare i reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso.****ANTIGEN** ANTIGENE 3 flaconcini x 3 mL

Contenuto: L'antigene è composto da una miscela stabilizzata di cardiolipina, colesterolo, lecitina e microparticelle di carbone. Attenzione: Conservare le fiale in posizione verticale. Portare alla temperatura ambiente prima dell'uso. Non agitare vigorosamente.

CONTROL + SIERO DI CONTROLLO POSITIVO 2 mL

Contenuto: Siero umano reattivo per la sifilide, diluito in soluzione di BSA con sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

CONTROL - SIERO DI CONTROLLO NEGATIVO 2 mL

Contenuto: Siero umano non reattivo per la sifilide, diluito in soluzione di BSA con sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

ALTRI MATERIALI**- Slides****ALTRI MATERIALI OCCORRENTI MA NON FORNITI**

- Agitatore ruotante per reazioni di agglutinazione, regolabile a 100 ± 4 rpm.
- Fonte idonea di luce.
- Micropipetta da 50 μ L e da 17 μ L (volume variabile)
- Soluzione salina 0,9%.
- Stecchini di legno.

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI**I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.****La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.**

I reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

REAGENTE	CONDIZIONI
ANTIGENE	2 mesi
CONTROLLO POSITIVO	4 mesi

6. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO. CONSERVARE A 2-8°C.

Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HbsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV.. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

Smaltimento dei residui: i campioni di siero e i reagenti usati devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di legge vigenti.

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
2. I reagenti contengono Sodio Azide (0.09%) che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi.
Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
3. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere pulita, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. **Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C).** Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti.
4. La reazione può essere eseguita su un agitatore ruotante. Regolare la velocità a 100 ± 10 rpm.
5. La reazione di agglutinazione viene meglio interpretata osservando lo slide sotto una lampada.

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Siero fresco o scongelato. Il campione fresco può essere mantenuto per 5 giorni a 2/8°C. Plasma raccolto su citrato, EDTA od Eparina e conservato a 2/8°C per un massimo di 2 giorni. Per conservazioni più lunghe congelare a -20°C, può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni.

8. PROCEDIMENTO

TEST DI SCREENING

1. Portare i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente.
2. Aspirare 50 µL di siero in esame e lasciarlo cadere sul cerchio dello slide. Fare attenzione a non trasferire alcun elemento cellulare.
3. Ripetere queste fasi per ciascun campione in esame.
4. Fare roteare leggermente il flaconcino per ottenere una sospensione omogenea dell'antigene e distribuire 17 µL in ciascun cerchio dello slide; miscelare con un bastoncino.
5. Porre il cartoncino sul rotore e fare rotare a 100 ± 4 rpm per 6 min.
6. Esaminare il risultato sotto una fonte idonea di luce. Le reazioni vanno lette entro un minuto dopo aver tolto il cartoncino dal rotore.

TEST QUANTITATIVO

1. Per ogni campione in esame, dispensare nei cerchi n. 2-5, 0.05 mL (50 µL) di una soluzione salina allo 0.9% come diluente. Non stendere la soluzione.
2. Aggiungere al cerchio n°1 e n° 2, 50 µL di siero. Eseguire delle diluizioni seriali a raddoppio, mescolando accuratamente prima di ogni nuova diluizione.
3. Scartare 50 µL dall'ultimo cerchio.
4. Usare un bastoncino nuovo per ogni campione. Iniziando dal cerchio 5 (o dalla diluizione più alta), stendere il siero sulla superficie del cerchio. Usando lo stesso bastoncino, ripetere nel cerchio 4 ed in quelli successivi.
5. Fare roteare il flaconcino dell'antigene per ottenere una sospensione omogenea e distribuire 17 µL in ciascun cerchio.

6. Continuare come nella procedura descritta sopra.

9. VALIDAZIONE DEL TEST

Utilizzare i sieri di controllo ad ogni seduta dispensando 50 µl di ogni controllo in un cerchio del cartoncino. Procedere come descritto nel paragrafo "Procedura" riportato di seguito.

10. INTERPRETAZIONE DEL TEST

1. Risultati qualitativi del test di screening

a) REATTIVO:

La presenza di aggregati neri ben visibili è tipica di un campione reattivo. Il Controllo Positivo deve dare agglutinazione evidente.

b) NON REATTIVO:

Nessuna formazione di aggregati. Il Controllo Negativo non deve dare formazione di aggregati.

NOTA: Tutti i campioni che danno risposta positiva dovrebbero essere sottoposti al test quantitativo.

2. Test quantitativo

Il risultato viene dato dalla diluizione più alta che presenta ancora reattività.

NOTA: Nei casi in cui l'anamnesi o le manifestazioni cliniche del paziente contrastano con la diagnosi, dovrebbe essere effettuato un test treponemico.

N.B. Si possono avere dei risultati falso-positivi o falso-negativi se non viene seguita accuratamente la procedura riportata.

11. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Si possono verificare talvolta delle reazioni biologiche falso-positive con antigeni cardiolipinici, ad esempio nei casi di abuso di farmaci, o in certe patologie quali lupus eritematoso, mononucleosi, malaria, lebbra.

E' stato osservato occasionalmente un fenomeno di pro-zona: si ha una inibizione completa o parziale della reattività con il siero non diluito mentre la reattività massima si ha con siero diluito. Questo fenomeno può quindi portare ad un risultato debolmente positivo nel test qualitativo mentre si avrà una forte reazione nel test quantitativo dopo diluizione del siero. Per questo motivo, tutti quei campioni che mostrano anche un minimo grado di reattività dovrebbero essere dosati anche con la procedura quantitativa.

12. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

Sono stati analizzati 272 campioni di cui 200 negativi e 72 positivi. Si è utilizzato nel confronto un reattivo in commercio approvato dall'FDA. Nella sperimentazione sono stati considerati concordanti i risultati +/- rispetto a +1. Si sono ottenuti i risultati schematizzati come segue:

	Pos.	Neg.	FP	FN
Diesse	71	200		1
Altro metodo	72	200		

La sensibilità è del 98,6% e la specificità è del 100% rispetto al kit di confronto.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Manual of Tests for Syphilis. Public Health Service, Publication no. 411 (1969).
2. Portnoy J., Bossak H.W. et al. Public Health Reports 76, 933 (1961).
3. March R.W. et al. Abstracts of Ann. Meeting of Am. Soc. Microbiol. p. 93 (1974).
4. Bossak H.N., Harris A.D. and Olansky S. Brit. J. Ven. Dis. 231, 33 (1955).
5. Dyckman J.D., Storms S. and Huber T.W. J. Clin. Microbiol. 12, 629 (1980).
6. Fiumara N.J. JAMA 243, 2500 (1980).
7. Garner M.F., Backhouse J.L. et al. J. Clin. Path. 26, 258 (1973).
8. Hicks C.B. et al. Ann. Int. Med. 107, 492 (1987).
9. Luger A.F.H. in "Immunological Diagnosis of sexually transmitted disease (Clinical and Biochemical analysis; 23)". New York, N.Y. Dekker, 1988, 249.



DIESSE Diagnostica Senese SpA

Via delle Rose 10, 53035 Monteriggioni SI

Tel. ++39/0577/ 587111 - Fax ++39/0577/318690

INSTRUCTIONS FOR USE**RPR COLOUR****REF 028 500 Tests****(English)****1. INTENDED USE****NON-TREPONEMAL FLOCCULATION TEST FOR THE QUALITATIVE AND SEMIQUANTITATIVE DETERMINATION OF REAGINS IN SERUM OR PLASMA****2. INTRODUCTION**

Infection with *Treponema pallidum* gives rise to a complex antibody response. Non treponemal tests are based on the detection of reagins, an antibody class present in syphilis and occasionally in other acute and chronic conditions (1). Reagins can be detected in the serum about 4-6 weeks after infection, or 1-3 weeks after appearance of the chancre. Purified beef heart extract (cardiolipin) fortified with lecithin and cholesterol, is used as antigen for reagin tests. Non treponemal tests are routinely used in syphilis serology because of their practical advantages and reproducibility, even though they are not always 100% specific.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The test is performed on serum or plasma. The antigen is composed of a colloidal suspension of cardiolipin, lecithin and cholesterol mixed with carbon microparticles. When a reactive serum is mixed with the antigen on the test card, a macroscopical flocculant is formed.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION**- Bring reagents to room temperature before use.****ANTIGEN** ANTIGEN 3 vials x 3 mL

Contents: The antigen is composed of a stabilised mixture of cardiolipin, cholesterol, lecithin and carbon microparticles. Attention: Store in an upright position when not in use. Bring to room temperature before use. Do not shake too vigorously.

CONTROL + POSITIVE CONTROL SERUM 2 mL

Contents: Human serum, reactive for syphilis, diluted in a solution of BSA with sodium azide 0,09%; liquid, ready for use without further dilution.

CONTROL - NEGATIVE CONTROL SERUM 2 mL

Contents: Human serum, non reactive for syphilis, diluted in a solution of BSA with sodium azide 0,09%; liquid, ready for use without further dilution.

OTHER MATERIALS**- Slides****MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

- Mechanical rotor for agglutination reactions, adjustable to 100 ± 4 rpm.
- Light source
- 50 and 17 μ L micropipette (variable volume)
- 0.9% Physiological Saline solution
- Mixing sticks.

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

REAGENT	CONDITIONS
ANTIGEN	2 months
POSITIVE CONTROL	4 months
NEGATIVE CONTROL	4 months

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY. STORE AT 2-8°C

Caution: *This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response by FDA-approved methods for the presence of HbsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling material of human origin.*

Waste disposal: *serum samples and reagents once used must be treated as infectious residuals and eliminated according to law.*

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The reagents contain 0.09% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides.
If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
3. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical precautions

1. **Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use.** Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature.
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable.

7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

Fresh or defrosted serum. Fresh samples may be stored at 2/8°C for 5 days. Plasma collected with citrate, EDTA or heparin may be used and stored at 2/8°C up to 2 days. For longer storage, freeze at -20°C, and can be thawed a maximum of 3 times. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers.

8. PROCEDURE

SCREENING TEST

1. Bring reagents and samples to room temperature.
2. Draw up 50 µL of test serum and drop onto a test circle on the slide. Take care not to transfer any cellular elements.
3. Repeat these steps for each sample to be tested.
4. Gently rotate the bottle containing the antigen to obtain a homogeneous suspension, and using the dropper, distribute 17 µL on each circle on the slide, mixing with a stick.
5. Place the card on the rotor and rotate at 100 ± 4 rpm for 6 min.
6. Examine the result under a good light source. Reactions must be read within one minute after removal from the rotor.

QUANTITATIVE TEST

1. For each test sample, place 0.05 mL (50 µL) of 0.9% saline into circles 2 to 5 as diluent. Do not spread.
2. Add 50 µL of serum to circles 1 and 2. Make serial 2-fold dilutions, mixing thoroughly before transferring each time.
3. Withdraw 50 µL from last circle and discard.
4. Use a new stirrer for each sample. Start with circle 5 (or the highest dilution) and spread the serum over the circle. Repeat in circle 4 and subsequent circles, using the same stirrer.

5. Gently rotate the antigen to obtain a homogeneous suspension and using the dropper, distribute one drop (17 µL) of Reagin Antigen in each circle.
6. Continue as in procedure described above.

9. TEST VALIDATION

Use the controls in each session, dispensing 50 µl of each control into a circle on the slide. Proceed as described in the section "Test Procedure" below.

10. INTERPRETATION OF THE TEST

1. Qualitative results of the screening test

a) REACTIVE:

The presence of clearly visible black aggregates is typical of a positive sample. The positive control must give evident agglutination.

b) NON REACTIVE:

No aggregate formation.

The Negative Control must not give aggregate formation.

NOTE: Any sample giving a reactive result should be tested in the quantitative method.

2. Quantitative Test

The result is given by the highest dilution showing any reactivity.

NOTE: In cases where the patient's history or clinical signs contrast with the diagnosis, a confirmatory treponemal test should be performed.

N.B. False-negative or false-positive results may occur if the described procedure is not followed very carefully.

11. LIMITATIONS OF THE TEST

Biological false-positive reactions occur occasionally with cardiolipin antigens, e.g. in cases of drug abuse, or in certain diseases such as lupus erythematosus, mononucleosis, malaria, leprosy.

A pro-zone reaction is sometimes found: complete or partial inhibition of reactivity occurs with undiluted serum and maximum reactivity is found only with diluted serum. This can lead to a weakly positive result in the qualitative test, whereas a strong reaction will be found when the sample is diluted. For this reason, all specimens showing any reactivity should be tested in the quantitative procedure.

12. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

272 samples were tested, 200 of which were negative and 72 positive. Another commercial FDA-approved method was used in comparison. In the trial, results which were +/- between the two methods were considered in agreement. 1 because they came from healthy donors who were negative to TPHA and to an ELISA screening test. The product was compared with another commercial kit. The results can be summarized as follows:

	Pos.	Neg.	FP	FN
Diesse	71	200		1
Other method	72	200		

The sensitivity was 98.6% while the specificity was 100% in comparison with the other commercial method.

16. REFERENCES

1. Manual of Tests for Syphilis. Public Health Service, Publication no. 411 (1969).
2. Portnoy J., Bossak H.W. et al. Public Health Reports 76, 933 (1961).
3. March R.W. et al. Abstracts of Ann. Meeting of Am. Soc. Microbiol. p. 93 (1974).
4. Bossak H.N., Harris A.D. and Olansky S. Brit. J. Ven. Dis. 231, 33 (1955).
5. Dyckman J.D., Storms S. and Huber T.W. J. Clin. Microbiol. 12, 629 (1980).
6. Fiumara N.J. JAMA 243, 2500 (1980).
7. Garner M.F., Backhouse J.L. et al. J. Clin. Path. 26, 258 (1973).
8. Hicks C.B. et al. Ann. Int. Med. 107, 492 (1987).
9. Luger A.F.H. in "Immunological Diagnosis of sexually transmitted disease (Clinical and Biochemical analysis; 23)". New York, N.Y. Dekker, 1988, 249.

	EN ES IT	Date of manufacture Fecha de fabricación Data di fabbricazione	FR GR PT	Date de fabrication Ημερομηνία Παραγωγής Data de fabrico
	EN ES IT	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro	FR GR PT	Utiliser jusqu' Ημερομηνία λήξης Prazo de validade
	EN ES IT	Caution, consult accompanying documents Atención, ver instrucciones de uso Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Attention voir notice d'instructions Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα Atenção, consulte a documentação incluída
	EN ES IT	Manufacturer Fabricante Fabbrikante	FR GR PT	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante
	EN ES IT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR GR PT	Contenu suffisant pour "n" tests Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις Conteúdo suficiente para “n” ensaios
	EN ES IT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura	FR GR PT	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura
	EN ES IT	Consult Instructions for Use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização
	EN ES IT	Biological risks Riesgo biológico Rischio biologico	FR GR PT	Risques biologiques Βιολογικοί κίνδυνοι Risco biológico
	EN ES IT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo	FR GR PT	Référence du catalogue Αριθμός καταλόγου Referência de catálogo
	EN ES IT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro	FR GR PT	Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	EN ES IT	Batch code Código de lote Codice del lotto	FR GR PT	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote



Diesse Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) – Italy
Tel. 0577-587111