

RPR-DAT

REF 26030

CE
0123



DIESSE Diagnostica
Senese S.p.A.
Strada dei Laghi, 39
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy

	Capitolo Section Chapitre
Modifiche introdotte nella revisione corrente Changes introduced in the current revision Changements introduits dans la révision actuelle	8



RPR-DAT

Solo per uso diagnostico in vitro

1. DESTINAZIONE D'USO

RPR-DAT (REF 26030) è un test di agglutinazione per la rilevazione qualitativa di reagine nel siero umano, da applicare sullo strumento AUTO-DAT o da utilizzare nella tecnica manuale. Il test può anche essere utilizzato per la rilevazione delle reagine in campioni diluiti in serie, tramite determinazione del relativo titolo (test semi-quantitativo).

Poiché i test non treponemici si basano sulla rilevazione delle reagine, una classe di anticorpi presente nella Sifilide (malattia causata dall'infezione da *Treponema pallidum*), il kit è destinato a determinare l'esposizione all'infezione da *Treponema pallidum* e ad essere utilizzato come ausilio nella sua diagnosi.

2. INTRODUZIONE

La sifilide, causata dalle spirochete di *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, è un'infezione cronica con molte manifestazioni cliniche diverse che si verificano in fasi distinte. Generalmente, questa malattia infettiva sistemica viene contratta tramite contatto sessuale diretto e presenta lesioni contenenti treponemi. Gli unici ospiti conosciuti sono gli esseri umani. Ci sono molti test per la diagnosi diretta e indiretta della sifilide, ma non esiste ancora un unico test ottimale.

I metodi diagnostici diretti includono l'individuazione del *T. pallidum* attraverso l'esame microscopico del fluido o degli strisci delle lesioni, l'esame istologico dei tessuti o i metodi di amplificazione dell'acido nucleico come la reazione a catena della polimerasi (PCR).

La diagnosi indiretta si basa su test sierologici per il rilevamento di anticorpi. I test sierologici rientrano in due categorie:

1. test non treponemici di screening
2. test treponemici di conferma

I test non treponemici si basano sulla rilevazione delle reagine, una classe di anticorpi presente nella sifilide e occasionalmente in altre condizioni acute e croniche. Le reagine possono essere rilevate nel siero circa 4-6 settimane dopo l'infezione, o 1-3 settimane dopo la comparsa del sifiloma primario.

L'estratto purificato di cuore di manzo (cardiolipina) fortificato con lecitina e colesterolo, è usato come antigene per i test della reagina. I test non treponemici sono usati abitualmente nella sierologia della sifilide per i loro vantaggi pratici e la loro riproducibilità, anche se non sono sempre specifici al 100%. Poiché il prodotto RPR-DAT è un test non treponemico, basato sul principio della flocculazione, è destinato a determinare l'esposizione all'infezione da *Treponema pallidum* come ausilio nella diagnosi relativa.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test si basa sul principio della flocculazione.

Il campione di siero viene fatto reagire nel pozzetto di micropiastre con una sospensione colloidale di cardiolipina, lecitina e colesterolo miscelata a microparticelle di carbone. In presenza di anticorpi (reagine) che agglutinano l'antigene si forma un aggregato.

Il test viene applicato allo strumento AUTO-DAT, che cattura l'immagine della reazione avvenuta e la analizza attraverso l'uso di un algoritmo specifico, riducendo la variabilità legata all'interpretazione individuale.

4. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e hanno dato un metodo di risposta negativo per la presenza di HBsAg e per gli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 e anti-HCV. Poiché nessun test diagnostico può offrire una garanzia completa sull'assenza di agenti infettivi, tutto il materiale di origine umana deve essere trattato come potenzialmente infettivo. Tutte le precauzioni normalmente adottate nella pratica di laboratorio devono essere seguite quando si maneggia materiale di origine umana.

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

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca.
 2. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova.
 3. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
 4. Consultare la relativa scheda di sicurezza dei materiali (disponibile su richiesta) per tutte le informazioni sulla sicurezza relative ai reagenti contenuti nel kit.
 5. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere decontaminata, 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 decontaminare eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti.
- Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

Prima dell'uso, portare i reagenti a temperatura ambiente (18-30°C).

1. Dopo l'uso riporre i reagenti a 2-8°C.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza.
3. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.

4. Non modificare la Procedura del test. Non sostituire i reagenti con quelli di altri fornitori o di altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile tra i lotti.
5. Non utilizzare campioni emolizzati, lipemici, itterici con una concentrazione di interferenti superiore a quella testata (secondo le indicazioni riportate nel capitolo "Specificità analitica")

5. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti sono sufficienti per 500 determinazioni.

ANTIGEN

ANTIGENE

2 x 4 mL

Contenuto: l'antigene è composto da una miscela stabilizzata di cardiolipina 0.003%, colesterolo 0.09%, lecitina 0.02% e microparticelle di carbone 0.2 g/L

Attenzione: Conservare le fiale in posizione verticale quando non si usano. Portare a temperatura ambiente prima dell'uso. Non agitare vigorosamente.

CONTROL +

CONTROLLO POSITIVO

1 x 0.5 mL

Contenuto: Siero umano reattivo per la sifilide, diluito fino ad un massimo del 15% in una soluzione proteica con sodio azide 0.09%.

Liquido, pronto all'uso.

CONTROL -

CONTROLLO NEGATIVO/DILUENTE CAMPIONE

1 x 4 mL

Contenuto: 100% di siero umano non reattivo contenente Proclin 300 0.029% e gentamicina 0.05% come conservanti.

Liquido, pronto all'uso

MT PLATE

6 MICROPIASTRE FONDO PIATTO (8x12)

ALTRO MATERIALE RICHiesto MA NON FORNITO

- Strumento AUTO-DAT (REF 26000)
- Agitatore ruotante
- Micropipetta a volume variabile

6. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C

Dopo il primo utilizzo le micropiastre devono essere conservate a temperatura ambiente.

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

La stabilità dei reagenti non cambia dopo apertura del flacone, purché l'utilizzatore faccia attenzione a mantenere il prodotto al riparo da possibile contaminazione microbica.

7. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il campione è composto da siero da sangue intero raccolto tramite venipuntura e maneggiato secondo le tecniche di laboratorio standard.

Non sono conosciute le conseguenze dell'utilizzo di altri liquidi biologici.

Il siero fresco può essere congelato a -20°C (per almeno 26 mesi).

Non conservare i campioni in congelatori auto sbrinatori. I campioni scongelati devono essere agitati con cura prima dell'uso.

8. PROCEDIMENTO

APPLICAZIONE STRUMENTALE CON AUTO-DAT

TEST QUALITATIVO

1. Portare i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente. Risospendere il reattivo.
2. Aspirare 25 µl di siero in esame e deporlo sul fondo del pozzetto della micropiastra. Fare attenzione a non trasferire alcun elemento cellulare. **Evitare la formazione di bolle.**
3. Ripetere queste fasi per ciascun campione da testare.
4. Distribuire 15 µl dell'antigene in ciascun pozzetto. **Evitare la formazione di bolle.**
5. Verificare che la miscela campione-antigene sia distribuita **uniformemente sul fondo del pozzetto**. Altrimenti provvedere con colpetti laterali alla piastra e/o battendo delicatamente sul piano di lavoro.
6. Posizionare le piastre nello strumento AUTO-DAT e seguire le istruzioni sul tablet.
7. Al termine dell'analisi, estrarre le piastre dallo strumento AUTO-DAT e coprire con il copripiastra i pozzetti in cui è avvenuta la reazione. I pozzetti non utilizzati in precedenza e non coperti possono essere utilizzati per successive analisi.

NOTA: Lasciare un pozzetto della strip per il Controllo Negativo ed uno per il Controllo Positivo, da testare esattamente come i campioni in esame.

TEST SEMIQUANTITATIVO

Da effettuare sui campioni risultati reattivi al test di screening.

1. Aggiungere 25 µl di Controllo Negativo/diluente campioni in ogni pozzetto della piastra.
2. Aggiungere 25 µl del campione risultato positivo al primo pozzetto.
3. Effettuare diluizioni a raddoppio, mescolando accuratamente prima di trasferire ad ogni pozzetto, e procedere a smaltire i 25 µl in eccesso presenti nell'ultimo pozzetto, come riportato nello schema seguente. **Evitare la formazione di bolle.**

Strip 1x8	A	B	C	D	E	F	G
Sample Diluent (µl)	25	25	25	25	25	25	25
Siero (µl)	25	25	25	25	25	25	25
Mescolare e trasferire (µl)		25	25	25	25	25	25
Diluizione/Titolo	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128

Smaltire
i 25 µl in
eccesso

4. Seguire la procedura descritta per il test di screening dal punto 4 al punto 7.

Il titolo sarà dato dall'ultima diluizione trovata reattiva con lo strumento.

9. VALIDAZIONE DEL TEST SU AUTO-DAT

Usare i controlli forniti ad ogni seduta.

Procedere come descritto nel paragrafo "APPLICAZIONE STRUMENTALE CON AUTO-DAT".

Se il risultato è diverso da quello previsto, contattare il Scientific Support:

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETAZIONE DEL TEST

APPLICAZIONE STRUMENTALE CON AUTO-DAT

Alla fine del test lo strumento stamperà i risultati non reattivi (N), dubbi (D), reattivi (P).

È consigliabile verificare visivamente i risultati ottenuti per conferma del referto.

ATTENTION: la mancata aggiunta dell'antigene al campione genera risultati falsi positivi.

11. LIMITAZIONI DEL TEST

Il prodotto deve essere utilizzato solo da utenti professionali di laboratorio e non è destinato allo screening di donatori di sangue o tessuti.

Il test non è applicabile a tipi di campioni diversi dal siero.

Non si può escludere la presenza di risultati falsi negativi dovuti ad effetto pro-zona di campioni altamente positivi. Per questo motivo, tutti i campioni che danno risultati dubbi o reattivi (positivi) dovrebbero essere confermati con la procedura semi-quantitativa.

Reazioni biologiche false-positive si verificano occasionalmente con gli antigeni cardiolipina, ad esempio in caso di abuso di droghe, o in alcune malattie come il lupus eritematoso, la mononucleosi, la malaria, la lebbra.

Tutti i risultati ottenuti richiedono un'attenta interpretazione che deve considerare altri indicatori relativi al paziente. Il test, infatti, non può essere utilizzato da solo per una diagnosi clinica e il risultato del test deve essere valutato insieme alla storia clinica del paziente e ad altre indagini diagnostiche.

12. SPECIFICITA' ANALITICA

3 campioni (2 negativi e 1 positivo) sono stati addizionati dei seguenti fattori potenzialmente interferenti e poi analizzati:

Bilirubina (45 mg/dl)
Trigliceridi (1500 mg/dl)
Emoglobina (10 mg/ml)

La presenza nel campione di siero delle sostanze interferenti sopra descritte non influenza il risultato del test.

13. CROSS-REATTIVI

Sono stati analizzati 42 campioni positivi a Toxoplasma gondii, Rosolia, Herpes simplex (Tipo 1 e Tipo 2), Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, Varicella zoster, Borrelia, Fattore Reumatoide e Anti-CCP.

Non sono state trovate reazioni crociate significative

14. STUDI DI COMPARAZIONE

In una sperimentazione esterna, sono stati analizzati 218 campioni con il kit Diesse.

I dati della sperimentazione sono riassunti di seguito:

		Riferimento		
		+	-	Total
Diesse	+	41	3	44
	-	0	174	174
	Totale	41	177	218

Percent Positive Agreement (~Sensibilità Diagnostica):

100.0% CI95%: 91.4-99.9

Percent Negative Agreement (~Specificità Diagnostica):

98.3% CI95%: 95.1-99.4

Valore Predittivo Positivo (PPV): 93.2% CI95%: 89.9-96.5

Valore Predittivo Negativo (NPV):

100.0% CI95%: 100.0-100.0

Il grado di concordanza tra i due metodi risulta essere ottimo con un valore di K (Coefficiente di Cohen) di 0.97.

15. PRECISIONE E RIPETIBILITA'

La precisione e la ripetibilità sono state valutate su repliche di campioni negativi e positivi, in tre lotti diversi, con operatori diversi che eseguivano il test, in giorni diversi e con strumenti diversi.

Tutti i risultati ottenuti rientrano nei criteri di accettazione (Agreement % ≥ 95% tra i risultati attesi e quelli ottenuti) dimostrando la precisione e la ripetibilità del metodo.

16. BIBLIOGRAFIA

- Larsen S.A et All. Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS (1995), p. 1-21
- Antonio Fuertes Ortiz de Urbina Syphilis (Book)
- WHO guidelines for the treatment of Treponema pallidum (Syphilis) (2016)
- Morshed M.G. et All. Recent Trends in the Serologic Diagnosis of Syphilis. Clinical and Vaccine Immunology (2015) Volume 22 Number 2

5. Meredith E. et All. RPR and the Serologic Diagnosis of Syphilis. JAMA. Author manuscript (2019)
6. Tuddenham S. et All. Syphilis Laboratory Guidelines: Performance Characteristics of Nontreponemal Antibody Tests. Clinical Infectious Diseases (2020):71 (Suppl 1)

17. SEGNALAZIONE DI INCIDENTE

Se si è verificato un incidente grave in relazione a questo dispositivo nel territorio di mercato dell'Unione Europea, si prega di segnalarlo senza indugio al produttore e all'autorità competente del proprio Stato membro.

18. SINTESI RELATIVA ALLA SICUREZZA E ALLE PRESTAZIONI

Questo documento, disponibile sul database di Eudamed, fa parte della Documentazione Tecnica.

DIESSE

INSTRUCTIONS FOR USE

RPR-DAT

For In Vitro Diagnostic Use Only

1. INTENDED PURPOSE

RPR-DAT (REF 26030) is an agglutination test kit for qualitative detection of reagins in human serum, to be applied on the AUTO-DAT instrument or to be used in manual technique. The test may also be used to detect reagins in samples serially diluted to establish titer information (semi-quantitative test).

Since non-treponemal tests are based on the detection of reagins, an antibody class present in Syphilis (disease caused by *Treponema pallidum* infection), the kit is intended to determine the exposure to *Treponema pallidum* infection and to be used as an aid to the related diagnosis.

2. INTRODUCTION

Syphilis, caused by the spirochete *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, is a chronic infection with many diverse clinical manifestations that occur in distinct stages.

This systemic infectious disease is generally acquired by direct sexual contact and features treponemes-containing lesions. The only known hosts are human beings. There are many tests for the direct and indirect diagnosis of syphilis, still there is no single optimal test.

Direct diagnostic methods include the detection of *T. pallidum* by microscopic examination of fluid or smears from lesions, histological examination of tissues or nucleic acid amplification methods such as polymerase chain reaction (PCR).

Indirect diagnosis is based on serological tests for the detection of antibodies. Serological tests fall into two categories:

1. non-treponemal tests for screening
2. treponemal tests for confirmation

Non treponemal tests are based on the detection of reagins, an antibody class present in syphilis and occasionally in other acute and chronic conditions. 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.

Since the product RPR-DAT is a non-treponemal test, based on macroscopic flocculation principle, it is intended to determine the exposure to *Treponema pallidum* infection as an aid to the related diagnosis.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The assay is based on the flocculation principle.

The serum sample reacts in a microplate flat bottom well with the colloidal suspension of cardiolipin, lecithin and cholesterol mixed with carbon microparticles. When antibodies (reagins) agglutinating antigen are present an aggregate is formed.

The test is applied to the AUTO-DAT instrument, which captures the image of the occurred reaction and analyzes it throughout the use of a specific algorithm, reducing the variability related to the individual interpretation.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response 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.
2. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay.
3. Wash hands thoroughly when finished.
4. Consult the relative Material Safety Data Sheet (available on request) for all the information on safety concerning the reagents contained in the kit.
5. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1% 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

Bring the reagents to room temperature (18-30°C) before use.

1. After use, and return reagents to 2-8°C.
2. Do not use the reagents after the expiry date.
3. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
4. Do not modify the Test Procedure. Do not substitute reagents using reagents from other suppliers or other lots, unless it is specifically indicated that the reagent is interchangeable between lots.
5. Do not use hemolyzed, lipemic, icteric samples having a interfering concentration higher than that tested

(according to the indications reported in chapter "Analytical specificity")

5. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

Reagents are sufficient for 500 determinations.

ANTIGEN

ANTIGEN

2 x 4 mL

Contents: the antigen is composed of a stabilised mixture of cardiolipin 0.003%, cholesterol 0.09%, lecithin 0.02 % and carbon microparticles 0.2 g/L

Attention: Store in an upright position when not in use. Bring to room temperature before use. Do not shake too vigorously.

CONTROL +

POSITIVE CONTROL

1 x 0.5 mL

Contents: Human serum, reactive for syphilis, diluted up to a maximum of 15% in a protein solution with sodium azide 0.09%.

Liquid, ready for use.

CONTROL -

NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT

1 x 4 mL

Contents: 100% non reactive human serum containing Proclin 300 at 0.029% and Gentamicin at 0.05% as preservatives.

Liquid, ready for use.

MT PLATE

6 FLAT BOTTOM MICROPLATES (8x12)

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- AUTO-DAT Instrument (REF 26000)
- Rotating mixer
- Micropipette with variable volume

6. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C

After the first use, the microplate must be stored at room temperature.

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

The stability of the reagents does not change after opening the bottle, provided that the user is careful to keep the product safe from possible microbial contamination.

7. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The sample is composed of serum from whole blood collected by venipuncture and handled following standard laboratory techniques.

Possible consequences, in case of use of other biological liquids, are not known.

The fresh serum may be frozen at -20°C (for at least 26 months).

Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted samples must be shaken carefully before use.

8. ASSAY PROCEDURE

INSTRUMENTAL APPLICATION WITH AUTO-DAT

QUALITATIVE TEST

1. Bring reagents and samples to room temperature. Resuspend the reagent.
2. Draw up 25 µl of serum and drop on the bottom of the microplate well. Take care not to transfer any cellular elements. **Avoid the formation of bubbles.**
3. Repeat these steps for each sample to be tested.
4. Distribute 15 µl of antigen in each well. **Avoid the formation of bubbles.**
5. Verify that the sample-antigen mix is **evenly distributed on the bottom of the well**. If not, tap the plate on the side and / or gently tap it on the work surface.
6. Place the plates in the AUTO-DAT instrument and follow the instructions on the tablet.
7. At the end of the analysis, extract the plates from the AUTO-DAT instrument and, using the adhesive film, cover the wells in which the reaction occurred. Wells not previously used and not covered can be used for further analysis.

NOTE: Leave one strip microwell for Negative Control and one for Positive Control, to be tested exactly as the analyzed samples.

SEMI-QUANTITATIVE TEST

To be carried out on the samples reactive to the screening test.

1. Add 25 µl of Negative Control/Sample Diluent to each well of the plate.
2. Add to the first well 25 µl of the sample that gave positive result.
3. Make doubling dilutions, mixing thoroughly before transferring to each step, and proceed to dispose of the excess 25 µl present in the last well, as shown in the following scheme. **Avoid the formation of bubbles.**

Strip 1x8	A	B	C	D	E	F	G
Sample Diluent (µl)	25	25	25	25	25	25	25
Serum (µl)	25	25	25	25	25	25	25
Mix and transfer (µl)		25	25	25	25	25	25
Dilution/Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128

Proceed to dispose of the excess 25 µl

4. Follow the procedure described for the screening test from step 4 to step 7.

The titer will be given by the last dilution found reactive with the instrument.

9. TEST VALIDATION ON AUTO-DAT

Use the controls provided at each session.
Proceed as described in the paragraph "INSTRUMENTAL APPLICATION WITH AUTO-DAT".

If the result is different from the expected, contact the Scientific Support:

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETATION OF THE TEST

INSTRUMENTAL APPLICATION WITH AUTO-DAT

At the end of the test the instrument will print the results as non-reactive (N), doubtful (D), reactive (P).
It is advisable to visually verify the obtained results for confirmation.

ATTENTION: failure to add the antigen to the sample causes false positive results.

11. LIMITATIONS

The product must be used by professional laboratory users only and it is not intended for screening blood or tissue donors. The test is not applicable to sample types different from serum.

The presence of false negative results due to prozone reaction of high positive samples cannot be excluded. For this reason, all the specimens that give doubtful or reactive (positive) results should be confirmed with the semi-quantitative procedure

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.

All the obtained results require a careful interpretation that must consider other indicators relative to the patient. The test, indeed, cannot be used alone for a clinical diagnosis and the test result should be evaluated together with the patient history and other clinical diagnostic evaluation.

12. ANALYTICAL SPECIFICITY

3 samples (2 Negative and 1 Positive) were spiked with the following potentially interfering factors and then tested:

Bilirubin (45 mg/dl)
Triglycerides (1500 mg/dl)
Hemoglobin (10 mg/ml)

The presence in the serum sample of the interfering substances described above does not affect the test result.

13. CROSS-REACTIONS

42 samples positive to *Toxoplasma gondii*, Rubella, Herpes simplex virus (Type 1 and Type 2), Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, Varicella zoster, Borrelia, Rheumatoid Factor and Anti-CCP were tested.

No significant cross-reactions were found.

14. METHOD COMPARISON

In an external experimentation, 218 samples were analyzed with Diesse kit.

The experimental data are summarized below:

		Reference		
		+	-	Total
		41	3	44
Diesse	-	0	174	174
	Totale	41	177	218

Percent Positive Agreement (~Diagnostic Sensitivity):

100.0% CI95%: 91.4-99.9

Percent Negative Agreement: (~Diagnostic Specificity):

98.3% CI95%: 95.1-99.4

Positive Predictive Value (PPV): 93.2%

CI95%: 89.9-96.5

Negative Predictive Value (NPV): 100.0%

CI95%: 100.0-100.0

The agreement between the two methods is excellent with a Cohen's Kappa of 0.97.

15. PRECISION AND REPEATABILITY

Precision and repeatability has been evaluated on replicates of negative and positive samples, in three different batches, with different operators performing the test, in different days with different instruments.

All the obtained results were within the acceptance criteria (Agreement % $\geq$ 95% between the expected and the obtained results) demonstrating the precision and repeatability of the method.

16. REFERENCES

1. Larsen S.A et All. Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS (1995), p. 1–21
2. Antonio Fuertes Ortiz de Urbina Syphilis (Book)
3. WHO guidelines for the treatment of *Treponema pallidum* (Syphilis) (2016)
4. Morshed M.G. et All. Recent Trends in the Serologic Diagnosis of Syphilis. Clinical and Vaccine Immunology (2015) Volume 22 Number 2
5. Meredith E. et All. RPR and the Serologic Diagnosis of Syphilis. JAMA. Author manuscript (2019)
6. Tuddenham S. et All. Syphilis Laboratory Guidelines: Performance Characteristics of Nontreponemal Antibody Tests. Clinical Infectious Diseases (2020):71 (Suppl 1)

17. INCIDENT REPORTING

If any serious incident in relation to this device has occurred in the European Union market territory, please report without delay to the manufacturer and competent authority of your Member State.

18. SUMMARY OF SAFETY AND PERFORMANCE

This document, available on Eudamed database, is part of Technical Documentation.



RPR-DAT

Uniquement pour diagnostic in vitro

1. UTILISATION PRÉVUE

RPR-DAT (RÉF 26030) est un test d'agglutination pour la détection qualitative de la réagine dans le sérum humain, à appliquer sur l'analyseur AUTO-DAT ou utiliser en technique manuelle. Le test peut également être utilisé pour la détection de la réagine dans des échantillons dilués en série, par la détermination du titre relatif (test semi-quantitatif).

Étant donné que les tests non tréponémiques sont basés sur la détection de la réagine, une classe d'anticorps présente dans la syphilis (maladie causée par une infection au *Treponema pallidum*), ce kit est destiné à déterminer l'exposition à l'infection au *Treponema pallidum* et à être utilisé comme aide à son diagnostic.

2. INTRODUCTION

La syphilis, causée par les spirochètes de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, est une infection chronique aux nombreuses manifestations cliniques différentes qui apparaissent à différents stades.

Généralement, cette maladie infectieuse systémique se contracte par contact sexuel direct et présente des lésions contenant des tréponèmes. Les seuls hôtes connus sont les humains. Il existe de nombreux tests de diagnostic direct et indirect de la syphilis, mais aucun test optimal unique à ce jour.

Les méthodes de diagnostic direct comprennent la détection du *T. pallidum* par examen microscopique du liquide ou des frottis des lésions, examen histologique des tissus ou méthodes d'amplification d'acide nucléique telles que la réaction en chaîne par polymérase (PCR).

Le diagnostic indirect repose sur des tests sérologiques de détection des anticorps. Les tests sérologiques se divisent en deux catégories :

3. tests non tréponémiques de criblage
4. tests tréponémiques de confirmation

Les tests non tréponémiques sont basés sur la détection de la réagine, une classe d'anticorps présente dans la syphilis et occasionnellement dans d'autres affections aiguës et chroniques. Les réagines peuvent être détectées dans le sérum environ 4 à 6 semaines après l'infection, ou 1 à 3 semaines après apparition du syphilome primaire.

L'extrait de cœur de bœuf purifié (cardiolipine) enrichi de lécithine et de cholestérol est utilisé comme antigène pour les tests de réagine. Les tests non tréponémiques sont couramment utilisés en sérologie de la syphilis pour leurs avantages pratiques et leur reproductibilité, bien qu'ils ne soient pas toujours spécifiques à 100 %.

Le produit RPR-DAT étant un test non tréponémique, basé sur le principe de la floculation, il est destiné à déterminer

l'exposition à l'infection par *Treponema pallidum* comme aide au diagnostic relatif.

3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le test est basé sur le principe de la floculation.

L'échantillon de sérum est mis à réagir dans le puits de la microplaque avec une suspension colloïdale de cardiolipine, de lécithine et de cholestérol mélangée à des microparticules de charbon. Un agrégat se forme en présence d'anticorps (réagine) qui agglutinent l'antigène.

Le test est appliqué à l'analyseur AUTO-DAT, qui capture l'image de la réaction survenue et l'analyse à travers l'utilisation d'un algorithme spécifique, réduisant la variabilité liée à l'interprétation individuelle.

4. PRÉCAUTIONS

UNIQUEMENT POUR DIAGNOSTIC IN VITRO

Ce coffret contient des matières d'origine humaine qui ont été testées et qui ont fourni une méthode de réponse négative à la recherche de l'HbsAg et des anticorps anti-VIH-1, anti-VIH-2 et anti-VHC. Comme aucun test de diagnostic ne peut offrir une garantie complète sur l'absence d'agents infectieux, tout matériel d'origine humaine doit être traité comme potentiellement infectieux. Suivre toutes les précautions normalement adoptées dans les pratiques de laboratoire lors de la manipulation de matériel d'origine humaine.

Élimination des résidus : les échantillons de sérum et les réactifs utilisés doivent être traités comme des résidus infectés, puis éliminés conformément à la législation en vigueur.

Avertissements relatifs à la sécurité personnelle

1. Ne pas pipeter avec la bouche.
 2. Utiliser des gants jetables et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et pendant le test.
 3. Se laver soigneusement les mains après avoir terminé le test.
 4. Consulter la fiche de sécurité correspondante des matériaux (disponible sur demande) pour toutes les informations de sécurité relatives aux réactifs contenus dans le kit.
 5. En cas de déversement accidentel de matières potentiellement infectées, essuyer immédiatement avec du papier absorbant ; la zone contaminée devra être décontaminée avec, par exemple, de l'hypochlorite de sodium (1 %), avant de continuer le travail. En présence d'un acide, veiller à bien essuyer le plan de travail avant d'utiliser de l'hypochlorite de sodium.
- Tout matériel (notamment les gants) utilisé pour décontaminer les zones salies par d'éventuels déversements accidentels, doit être considéré comme potentiellement infecté et éliminé.

Ne pas mettre de matériaux contenant de l'hypochlorite de sodium en autoclave.

Précautions analytiques

Attendre que les réactifs aient atteint la température ambiante (18-30 °C) avant leur utilisation.

6. Après utilisation, conserver les réactifs entre 2 et 8 °C.
7. Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption.
8. Éviter toute contamination microbienne des réactifs pour ne pas altérer la validité du produit ce qui pourrait entraîner des résultats erronés.
9. Ne pas modifier la procédure de test. Ne pas remplacer les réactifs par des produits d'autres fournisseurs ou d'autres lots, sauf s'il est spécifiquement indiqué que le réactif est interchangeable d'un lot à l'autre.
10. Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés, lipémiques, ictériques avec une concentration en interférents supérieure à celle testée (selon les indications données dans le chapitre « Spécificité analytique »)

5. COMPOSITION DU KIT ET PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Les réactifs sont suffisants pour 500 déterminations.

ANTIGÈNE

ANTIGÈNE

2 x 4 ml

Contenu : l'antigène est composé d'un mélange stabilisé de cardiolipine 0,003 %, de cholestérol 0,09 %, de lécithine 0,02 % et de microparticules de carbone 0,2 g/l

Attention : Conserver les flacons à la verticale lorsqu'ils ne sont pas utilisés. Amener à température ambiante avant utilisation. Ne pas secouer vigoureusement.

CONTROL +

CONTRÔLE POSITIF

1 x 0,5 ml

Contenu : Sérum humain réactif pour la syphilis, dilué jusqu'à un maximum de 15 % dans une solution protéique à 0,09 % d'azide de sodium.

Liquide, prêt à l'emploi.

CONTROL -

CONTRÔLE NÉGATIF/DILUANT D'ÉCHANTILLON

1 x 4 ml

Contenu : Sérum humain 100 % non réactif contenant 0,029 % de Proclin 300 et 0,05 % de gentamicine comme conservateurs.

Liquide, prêt à l'emploi

PLAQUE MT

6 MICROPLAQUES À FOND PLAT (8x12)

AUTRE MATÉRIEL REQUIS ET NON FOURNI

- Outil AUTO-DAT (RÉF 26000)
- Agitateur rotatif
- Micropipette à volume variable

6. MODE DE CONSERVATION ET STABILITÉ DES RÉACTIFS

Conserver les réactifs entre 2 et 8° C

Après la première utilisation, les microplaques doivent être conservées à température ambiante.

La date de péremption est imprimée sur chaque composant et sur l'étiquette apposée sur l'emballage.

La stabilité des réactifs ne change pas après l'ouverture du flacon, tant que l'utilisateur veille à conserver le produit à l'abri d'une éventuelle contamination microbienne.

7. COLLECTE ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

L'échantillon est composé de sérum de sang total prélevé par ponction veineuse et manipulé selon les techniques de laboratoire standard.

Les conséquences de l'utilisation d'autres liquides biologiques ne sont pas connues.

Le lactosérum frais peut être congelé à -20°C (pendant au moins 26 mois).

Ne pas conserver les échantillons dans des congélateurs à dégivrage automatique. Les échantillons décongelés doivent être soigneusement agités avant utilisation.

8. PROCÉDURE

APPLICATION INSTRUMENTALE AVEC AUTO-DAT

ESSAI QUALITATIF

1. Amener les réactifs et les échantillons à température ambiante. Remettre le réactif en suspension.
2. Aspirer 25 µl de sérum à tester et le déposer sur le fond du puits de la microplaque. Veiller à ne transférer aucun élément cellulaire. **Éviter la formation de bulles.**
3. Répéter ces étapes pour chaque échantillon à tester.
4. Verser 15 µl d'antigène dans chaque puits. **Éviter la formation de bulles.**
5. Vérifier que le mélange échantillon-antigène est réparti **uniformément sur le fond du puits**. Sinon, frapper de petits coups sur le côté de la plaque et/ou tapoter doucement la surface de travail.
6. Placer les plaques dans l'analyseur AUTO-DAT et suivre les instructions sur la tablette.
7. À la fin de l'analyse, retirer les plaques de l'analyseur AUTO-DAT et couvrir les puits dans lesquels la réaction s'est produite avec le couvre-plaque. Les puits précédemment inutilisés et non couverts peuvent être utilisés pour les analyses suivantes.

REMARQUE : Laisser un puits de la bandelette pour le contrôle négatif et un pour le contrôle positif, à tester exactement comme les échantillons étudiés.

TEST SEMI-QUANTITATIF

À effectuer sur des échantillons qui ont été réactifs au test de dépistage.

1. Ajouter 25 µl de Contrôle Négatif/diluant d'échantillons dans chaque puits de la plaque.

2. Ajouter 25 µl de l'échantillon positif dans le premier puits.
3. Faire des dilutions par doublement, en mélangeant soigneusement avant de transférer dans chaque puits, et procéder à l'élimination des 25 µl en excès présents dans le dernier puits, comme indiqué dans le schéma suivant. **Éviter la formation de bulles.**

Bande 1x8	A	B	C	D	E	F	G
Sample	25	25	25	25	25	25	25
Diluent (µl)							
Sérum (µl)	25	25	25	25	25	25	25
Mélanger et transférer (µl)							
Dilution/ Titre	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128

Procéder à l'élimination des 25 µl excédentaires

4. Suivre la procédure décrite pour le test de dépistage du point 4 au point 7.

Le titre sera donné par la dernière dilution trouvée réactive avec l'analyseur.

9. VALIDATION DU TEST SUR AUTO-DAT

Utiliser les contrôles fournis à chaque session.

Procéder comme décrit au paragraphe « APPLICATION INSTRUMENTALE AVEC AUTO-DAT ».

Si le résultat est différent de celui attendu, contacter l'assistance scientifique :

Tél : 0039 0577 319554
 Fax : 0039 0577 366605
 adresse : scientificsupport@diesse.it
 mail :

10. INTERPRÉTATION DU TEST

APPLICATION INSTRUMENTALE AVEC AUTO-DAT

À la fin du test, l'analyseur imprime les résultats non réactifs (N), douteux (D), réactifs (P).

Il est conseillé de vérifier visuellement les résultats obtenus pour confirmer le rapport.

ATTENTION : Le non ajout d'antigène à l'échantillon entraîne des faux positifs.

11. LIMITES DU TEST

Le produit est destiné à être utilisé uniquement par des utilisateurs de laboratoire professionnels et n'est pas destiné au dépistage des donneurs de sang ou de tissus.

Le test ne s'applique pas aux types d'échantillons autres que le sérum.

La présence de faux négatifs dus à l'effet pro-zone d'échantillons hautement positifs ne peut être exclue. Pour cette raison, tous les échantillons donnant des résultats ambigus ou réactifs (positifs) doivent être confirmés par la procédure semi-quantitative.

Des réactions biologiques faussement positives surviennent parfois avec les antigènes de la cardioline, par exemple en cas de toxicomanie, ou dans certaines maladies comme le lupus érythémateux, la mononucléose, le paludisme, la lèpre.

Tous les résultats obtenus nécessitent une interprétation prudente qui doit tenir compte d'autres indicateurs relatifs au patient. De fait, le dosage ne peut être utilisé seul pour poser un diagnostic clinique et son résultat doit être évalué avec l'histoire clinique du patient et/ou d'autres analyses diagnostiques.

12. SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE

3 échantillons (2 négatifs et 1 positif) ont été additionnés aux facteurs potentiellement interférents suivants puis analysés :

Bilirubine (45 mg/dl)
 Triglycérides (1500 mg/dl)
 Hémoglobine (10 mg/ml)

La présence dans l'échantillon de sérum des substances interférentes ci-dessus n'altère pas le résultat du test.

13. RÉACTIONS CROISÉES

42 échantillons positifs à *Toxoplasma gondii*, Rubéole, Herpès simplex (Type 1 et Type 2), Cytomégalovirus, Virus Epstein-Barr, Virus varicelle-zona, *Borrelia*, Facteur rhumatoïde et Anti-CCP ont été analysés.

Aucune réaction croisée significative n'a été décelée

14. ÉTUDES COMPARATIVES

Dans un essai externe, 218 échantillons ont été analysés avec le kit Diesse.

Les données de l'essai sont résumées ci-dessous :

		Référence		
		+	-	Total
Diesse	+	41	3	44
	-	0	174	174
	Total	41	177	218

Percent Positive Agreement (~Sensibilité Diagnostique) :
 100,0 % CI 95 % : 91,4-99,9

Percent Negative Agreement (~Spécificité Diagnostique) :
 98,3 % CI 95 % : 95,1-99,4

Valeur prédictive positive (PPV) : 93,2 % CI 95 % : 89,9-96,5

Valeur prédictive négative (NPV) :

100,0 % CI 95 % : 100,0 à 100,0

Le niveau de concordance entre les deux méthodes s'avère optimal avec une valeur K (Coefficient de Cohen) de 0,97.

15. PRÉCISION ET REPRODUCTIBILITÉ

La précision et la reproductibilité ont été évaluées sur des répliques d'échantillons négatifs et positifs, dans trois lots différents, avec différents opérateurs réalisant le test, à des jours différents et avec des instruments différents.

Tous les résultats obtenus rentrent dans les critères d'acceptation (Concordance % ≥ 95 % entre les résultats attendus et ceux obtenus) démontrant la précision et la reproductibilité de la méthode.

16. BIBLIOGRAPHIE

1. Larsen S.A et All. Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS (1995), p. 1–21
2. Antonio Fuertes Ortiz de Urbina Syphilis (Livre)
3. WHO guidelines for the treatment of Treponema pallidum (Syphilis) (2016)
4. Morshed M.G. et All. Recent Trends in the Serologic Diagnosis of Syphilis. Clinical and Vaccine Immunology (2015) Volume 22 Number 2
5. Meredith E. et All. RPR and the Serologic Diagnosis of Syphilis. JAMA. Author manuscript (2019)
6. Tuddenham S. et All. Syphilis Laboratory Guidelines: Performance Characteristics of Nontreponemal Antibody Tests. Clinical Infectious Diseases (2020):71 (Suppl 1)

17. RAPPORT D'INCIDENT

En cas de survenue d'un incident grave en relation avec ce dispositif sur le territoire du marché de l'Union européenne, le signaler sans délai au fabricant et à l'autorité compétente de son État membre.

18. RÉSUMÉ CONCERNANT LA SÉCURITÉ ET LES PERFORMANCES

Le présent document, disponible sur la base de données Eudamed, fait partie de la Documentation Technique.

	EN ES IT	Date of manufacture Fecha de fabricación Data di fabbricazione	FR EL PT	Date de fabrication Ημερομηνία Παραγωγής Data de fabrico
	EN ES IT	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro	FR EL PT	Utiliser jusqu'à 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 EL PT	Attention voir notice d'instructions Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα Atenção, consulte a documentação incluída
	EN ES IT	Manufacturer Fabricante Fabbrikante	FR EL PT	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante
	EN ES IT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR EL 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 EL 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 EL 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 EL PT	Risques biologiques Βιολογικοί κίνδυνοι Risco biológico
	EN ES IT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo	FR EL 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 EL 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 EL PT	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote
	EN ES IT	CE marking of conformity Marcado CE de conformidad Marcatura CE di conformità	FR EL PT	Marquage de conformité CE Σημανση συμμορφωσης CE Marcação CE de conformidade