



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 MICROREACTIA VDRL

Cod:

Editia :

Revizia :

Data aplicarii :

Avertisment Documentul de fata este proprietatea I.N.C.D.M.I. « CANTACUZINO »
Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul I.N.C.D.M.I. «CANTACUZINO»
Copiile sunt numerotate si controlate.

Exemplar nr : _____

Destinatarul: _____

Exemplar : controlat necontrolat

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURĂ SPECIFICĂ DETECTAREA ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN MICROREACȚIA VDRL cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

CUPRINS

CUPRINS.....	3
1. SCOP.....	4
2. DOMENIUL DE APLICARE.....	4
3. DOCUMENTE DE REFERINȚĂ.....	4
4. DEFINIȚII ȘI ABREVIERI.....	4
4.1. Definiții.....	4
4.2. Abrevieri.....	4
5. DESCRIEREA ACTIVITĂȚII.....	4
5.1. Condiții prealabile.....	4
5.2. Resurse necesare.....	5
5.2.1. Reactivii furnizați de trusa Antigen Cardiolic tip VDRL.....	5
5.2.2. Reactivi și materiale nefurnizate de trusa.....	5
5.3. Execuția microreacției VDRL.....	5
5.3.1. Etape preliminare.....	5
5.3.2. Pregătirea probelor (seruri, LCR) pentru testare.....	6
5.3.3. Pregătirea suspensiei antigenice de lucru.....	6
5.3.4. Tehnica microreacției calitative pentru seruri.....	6
5.3.5. Tehnica microreacției semicantitative pentru seruri.....	6
5.3.6. Tehnica microreacției calitative/ cantitative pentru LCR.....	7
5.3.7. Validarea testării / Controlul calității testării.....	7
5.3.8. Aprecierea și formularea rezultatelor.....	7
5.4. Interpretarea clinică a rezultatelor.....	7
5.5. LIMITELE TESTULUI.....	8
6. RESPONSABILITĂȚI.....	8
7. FORMULARE / INREGISTRARI, DOCUMENTE CONEXE.....	8
7.1. FORMULARE / INREGISTRARI.....	8
7.2. DOCUMENTE CONEXE.....	9
8. ANEXE.....	9

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURĂ SPECIFICĂ DETECTAREA ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN MICROREAȚIA VDRL cod :	Exemplar nr.
		Ediția:
		Revizia:
		Data aplicării:

1. SCOP

Procedura descrie operațiunile necesare executării microreacției VDRL, cu trusa Antigen Cardioliipinic tip VDRL(IC), pentru detectarea anticorpilor antilipoidici în probele biologice de la bolnavii de sifilis.

Antigenul cardioliipinic VDRL este o soluție etanolică de cardioliipina, lecitina și colesterol în cantități optime pentru a avea specificitate și sensibilitate maximă cu serul și LCR provenit de la bolnavii de sifilis.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se execută pe probe de ser și LCR, de către personalul autorizat în cadrul Laboratorului ITS - **I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO**, pentru diagnosticul serologic al sifilisului.

Testul este utilizat :

- **pe probe de ser** pentru depistarea sifilisului și urmărirea eficienței tratamentului;
- **pe probe de LCR** pentru confirmarea neurosifilisului la pacienți cu serologie pozitivă.

3. DOCUMENTE DE REFERINȚĂ

- 3.1. Manualul de management cod MM-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. Ordinul MS pentru aprobarea programului de supraveghere și control al ITS, 1070/ 2004.
- 3.5. Instrucțiunile de utilizare din trusa, livrate de către producător.

4. DEFINIȚII ȘI ABREVIERI

4.1. Definiții

Microreacția VDRL: test serologic netreponemic/cardioliipinic care detectează anticorpii antilipoidali/lipoidici în probe biologice provenite de la pacienți cu sifilis, printr-o reacție de microaglutinare..

4.2. Abrevieri

I.N.C.D.M.I. Cantacuzino: Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie

LNR : Laboratorul Național de Referință

ITS : Infecții cu Transmitere Sexuală

VDRL : Venereal Diseases Research Laboratory (Atlanta, USA)

BFP : Reacții Biologice Fals Pozitive

ID/SN : număr de identificare/număr de serie

MM : Manualul de Management

5. DESCRIEREA ACTIVITĂȚII

5.1. Condiții prealabile

- Probele sunt transportate în containere speciale și la primire se înregistrează și etichetează cu număr unic , după care sunt depozitate la +2+8°C maximum 5 zile sau la -20°C mx. 1 luna
- Probele de testat trebuie să corespundă din punct de vedere cantitativ (min. 0.5ml) și calitativ. Nu se testează probe de ser/LCR hemolizate, lipemice, contaminate bacterian/fungic sau LCR amestecat cu sânge, decât în cazuri excepționale, când recoltarea altei probe nu mai este posibilă și numai cu obținerea acordului clientului și menționarea acestui lucru în Buletinul de analiză, la rubrica Conformitate la recepție/detalii. **Nu se testează probe de plasmă.**
- Personalul desemnat să execute testările trebuie să aibă calificarea/experiența necesară.

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURĂ SPECIFICĂ DETECTAREA ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN MICROREAȚIA VDRL cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

5.2 Resurse necesare

5.2.1 Reactivii furnizati in trusa Antigen Cardiolic tip VDRL(IC)

- Antigen VDRL
- Diluent 1x , gata de lucru
- Control pozitiv si Control negativ
- Flacon brun pentru transferul antigenului din fiola
- Flacon pentru diluarea antigenului
- Picator antigen diluat pentru testarea serului: 1 picatura = 1/60 mL (17 microL)
- Picator antigen diluat pentru testarea LCR : 1 picatura = 1/100 mL(10 microL)
- placi cu godeuri, pentru executarea testului

5.2.2. Reactivi si materiale nefurnizate de trusa

- Solutie salina 0.9% pentru diluarea serurilor in reactia semicantitativa (dilutii binare) si pentru matorul antigen
- Solutie salina 10% pentru diluarea antigenului 1/2, la testarea LCR

5.2.3. Echipamente/dispozitive

- Agitator rotativ, cu 20mm diametru de rotatie, reglat la 180 rpm
- Baie de apa termostata, pentru inactivarea serurilor la + 56°C±0.1°C
- Centrifuga de masa , pentru centrifugarea probelor daca este cazul
- Pipeta automata 10-100μl , conuri de prelevare galbene, de unica folosinta
- Pipete gradate de sticla 1ml si 5ml
- Lupa, lampa cu bec de halogen, hartie neagra
- Stative pentru tuburi
- Hartie de filtru
- Vas cu solutie dezinfectanta pentru materialele folosite, recipient colectare deseuri contaminate
- Manusi latex
- Termometru de camera
- Frigider, Congelator

5.3. Executia microreactiei VDRL

Reactia se poate executa calitativ (pe proba nediluata) sau semicantitativ (dilutii binare de ser in solutie salina 0.9%) direct in placile de plastic cu godeuri.

Executia operatiunilor in succesiunea lor, verificarile si rezultatele se inregistreaza in Fisa de Lucru

Cod :

5.3.1. Etape preliminare

- Se pune in functiune baia de apa termostata (+56°C)
- Se verifica temp. camerei de lucru (+23+29°C) si se inregistreaza in Fisa de lucru
- Se pregateste spatiul de lucru pentru executarea procedurii și asigurarea măsurilor de biosiguranta (manusi latex, halat, vasul cu dezinfectant, recipientul deseuri contaminate)
- Se scot reactivii, probele, serurile de control si diluentul VDRL 1x din frigider (+2+8°C) (sau congelator, -20°C, daca este cazul) si se lasa in repaos la temperatura de lucru 30min. Se noteaza in Fisa de lucru :Trusa de reactivi, Lotul, Data de expirare.
- Se verifica starea de functionare a echipamentelor utilizate pentru efectuarea testului si anume:

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURĂ SPECIFICĂ DETECTAREA ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN MICROREACȚIA VDRL cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

- numărul de rotații/min al agitatorului rotativ care trebuie să fie 180 rpm (se numără rotațiile 15 sec x 4) și se înregistrează în Fișa de lucru
- temperatura apei din baia termostată, care trebuie să ajungă la $+56^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$;
- centrifuga de masă, funcțională.

5.3.2. Pregătirea probelor (seruri, LCR) pentru testare

- Se controlează aspectul serurilor și, dacă este nevoie, se clarifică prin centrifugare (5 min la 1200 rpm).
- Se inactivează serurile de testat 30 min la $+56^{\circ}\text{C}$ în Baia de apă. După inactivare serurile se reexaminează și se centrifughează din nou, dacă se constată apariția unor particule în suspensie, după care se lasă în repaus pe masă 30 min pentru a ajunge din nou la temperatura camerei.
- **LCR nu se inactivează**

5.3.3. Pregătirea suspensiei antigenice de lucru

- Se pipetează în flaconul de diluție, cu capac, direct pe fund, 0.4 ml diluent 1x. Prin rotirea ușoară a flaconului se asigură răspândirea uniformă a diluentului.
- Se adaugă cu o pipetă 0.5 ml antigen, picătură cu picătură, direct în diluent (cu vârful pipetei în treimea superioară a flaconului), în timp ce flaconul se rotește continuu, dar ușor, pe o suprafață plană. Durata operației este de aproximativ 6 secunde (18-20 rotații).
- Se elimină forțat ultima picătură de antigen și se continuă rotirea flaconului încă 10 sec.
- Se adaugă 4.1 ml diluent după care se astupă flaconul și se agită prin rasturnare de aproximativ 30 x, încă 10 sec.
- Suspensia antigenică este gata de utilizare pentru tot cursul zilei. Ori de câte ori este folosită, suspensia se amestecă ușor numai prin rotirea flaconului. Este utilizată numai o zi.

5.3.4. Tehnica microreacției calitative pentru seruri

Pe fiecare placă se includ obligatoriu martorii de reacție: seruri de control pozitiv, negativ și martorul de antigen.

- În godeurile plăcii de testare se repartizează câte 0.05 ml seruri control și probe; pentru martorul antigen se repartizează 0.05 ml soluție salină 0.9%.
- Se agită ușor, prin rotire, recipientul cu suspensia antigenică și se umple picatorul prevăzut cu acul calibrat pentru repartizarea suspensiei antigenice
- După ce se lasă să curgă primele două-trei picături din picator, se depune câte o picătură de suspensie antigenică (1/60 ml) în fiecare godeu.
- Se acoperă placa cu capac și se agită pe agitatorul rotativ (180 rotații/min) timp de 4 min.
- Rezultatele se citesc imediat, cu ajutorul unei lupe, prin transluminare pe fond negru.

Deoarece după câteva minute poate apărea un grad de aglutinare și la serurile negative, se execută maximum 20 reacții o dată.

5.3.5. Tehnica microreacției semicantitative pentru seruri

Se execută pentru probele cu rezultat pozitiv în testul calitativ, pentru cele care prezintă efectul de prozonă, sau pentru controlul eficacității tratamentului.

Testul se execută pe diluții binare de ser (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) în soluție salină 0.9%, în volum final de 0.05 ml.

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURĂ SPECIFICĂ DETECTAREA ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN MICROREAȚIA VDRL cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

In schema de lucru se includ obligatoriu si martori: serurile de control si martorul de antigen.

- Pentru fiecare ser de testat se repartizeaza in godeurile corespunzatoare ,cu exceptia primului, cate 0.05ml solutie salina, dupa care se adauga in primele doua godeuri cate 0.05mL de ser. Cu acelasi con de prelevare se procedeaza la executia dilutiilor binare, incepand cu godeul doi, prin transferul unui volum de 0.05ml in godeurile succesive (1/2→1/32). Din ultima dilutie se arunca 0.05ml.
- Se executa etapele de la pct. 5.3.4.(testarea calitativa), incepand cu repartizarea suspensiei antigenice.

5.3.6. Tehnica microreactiei calitative/semicantitative pentru LCR

Pentru probele de LCR executia testului se desfasoara cu urmatoarele modificari fata de tehnica pentru ser :

- Antigenul, preparat ca pentru ser, se va dilua 1/2 cu solutie salina 10%;
- Suspensia antigenica este utilizabila maximum 2 ore;
- Se repartizeaza cu acul calibrat astfel ca o picatura = 1/100ml (10µl)
- Agitarea placii se face timp de 8min.

5.3.7. Validarea testarii / Controlul calitatii testarii (Fisa de lucru :)

Citirea rezultatelor incepe obligatoriu cu controlul negativ, pozitiv si martorul de antigen.

- Testarea se valideaza daca rezultatele martorilor sunt cele asteptate si anume:
 - martorul antigen si martorul negativ = lichid partial clar, fara flocoane(granulatie fina)
 - martorul pozitiv = lichid clar sau partial clar, cu flocoane
- Calitatea testarii este asigurata de respectarea/documentarea conditiilor prealabile enumerate la pct. 5.1. si de executarea corecta a etapelor de lucru enumerate in procedura

5.3.8. Aprecierea si inregistrarea rezultatelor

Rezultatele se inregistreaza in Fisa de lucru si, dupa validarea lor de catre responsabilul de analiza, in Registrul rezultate serologie sifilis si apoi se completeaza Buletinul de analiza .

Rezultat negativ: lichid slab turbid, fara flocoane (aspect asemanator martorului negativ si martorului antigen).

Rezultat indeterminat (±) = flocoane mici in lichid turbid

Rezultat slab pozitiv (1+) = flocoane mici in lichid slab turbid.

Rezultat pozitiv mediu (2+) = flocoane evidente in lichid partial clar.

Rezultat intens pozitiv (3 sau 4+) = flocoane mari in lichid clarificat.

Rezultatele apreciate cu intensitatea 1+ pana la 4+ sunt considerate pozitive

Titrul serului pozitiv, in testarea semicantitativa, este reprezentat de ultima dilutie care produce un rezultat slab pozitiv (1+).

Manifestarea unui fenomen de prozona, impune repetarea testarii pe dilutii de ser.

5.3.9. Estimarea incertitudinii de masurare

Daca se solicita declararea incertitudinii de masurare, dar laboratorul identifica toate componentele si face o estimare rezonabila a contributiei fiecaruia la bugetul de incertitudine

5.4. Interpretarea clinica a rezultatelor

- Fara suport clinico-epidemiologic pentru sifilis, **un test VDRL pozitiv, izolat**, indica de obicei un BFP (reactie biologic fals pozitiva).

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURĂ SPECIFICĂ DETECTAREA ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN MICROREAȚIA VDRL cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

- Valoarea predictivă a unui test VDRL pozitiv în diagnosticul serologic al sifilisului este amplificată de un test treponemic pozitiv (TPHA sau FTA-Abs). Un test treponemic negativ în condițiile unui VDRL pozitiv, validează o reacție biologic fals pozitivă.
- Când se execută testul VDRL semicantitativ la pacienții cu sifilis :
 - Creșterea de patru ori a titrului (două diluții) la repetarea testului pe o nouă probă poate sugera evoluția infecției active și/ sau lipsa tratamentului;
 - Scăderea de patru ori a titrului (două diluții) în sifilisul recent, sub tratament, indică eficacitatea acestuia.
- Când se execută testul semicantitativ pentru diagnosticul sifilisului la nou născut, titrul \geq cu titrul mamei infectate sugerează sifilisul congenital.
- Când se execută testul pe probă de LCR provenit de la un pacient cu serologie pozitivă (test treponemic), un rezultat pozitiv la VDRL confirmă **neurosifilisul**.

5.5. LIMITELE TESTULUI

- Poate să apară ocazional reacție de prozonă. Fenomenul de prozonă (inhibiția completă sau parțială a reactivității prin exces de anticorpi) apare cu serul nediluat ; maximum de reactivitate se obține numai cu serul diluat. Fenomenul de prozonă 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 VDRL calitativ dau o reacție cât de cât grunjoasă (dubios/la limită), trebuie retestate prin procedura semicantitativă.
- Testul VDRL poate fi pozitiv la persoane din țări în care sunt endemice treponematoze neveneriene ca pianul (T.pertenue), sau pinta(T.carateum).
- Reacții biologice fals pozitive față de antigene cardiolipinice pot să apară ocazional la persoane cu **boli autoimune**(lupus eritematos), în mononucleoză, lepra, malarie, toxoplasmoză, hepatită virală, pneumonii atipice, tuberculoză, bruceloză,persoane vaccinate recent. BFP apar destul de frecvent în **sarcina**.
- 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. De fapt, acești indivizi pot să rămână "serofast", păstrând un titru scăzut de reactivitate pentru toată viața.

5.5. Operațiuni finale

- Se depozitează probele la frigider/congelator
- Se evacuează materialele contaminate
- Se curată și dezinfectează masa de lucru
- Se deconectează baia de apă la sfârșitul zilei de lucru

6. RESPONSABILITĂȚI

Asistentul medical execută procedura.

Responsabilul de analiză și Șeful de laborator verifică executarea procedurii și aprobă Buletinul de analiză.

7. FORMULARE / INREGISTRARI, DOCUMENTE CONEXE

7.1. FORMULARE / INREGISTRARI

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURĂ SPECIFICĂ DETECTAREA ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN MICROREAȚIA VDRL cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

- 7.1.1. FISA LUCRU TEST VDRL/RPR/TPHA Cod :
7.1.2. REGISTRUL DE RECEPȚIE PROBE – ELIBERARE BULETINE REZULTATE Cod:
7.1.3. REGISTRU GESTIUNE CONTRAPROBE Cod:
7.1.4. BULETIN ANALIZA INDIVIDUAL Cod:

7.2. DOCUMENTE CONEXE

8. ANEXE

- Anexa 1. Model FISA LUCRU TEST VDRL / RPR /TPHA cod :
Anexa 2. Model REGISTRU RECEPȚIE PROBE-REZULTATE ANALIZE Cod:
Anexa 2. Model BULETIN DE ANALIZA cod :

Anexa 1.

FISA DE LUCRU VDRL / RPR / TPHA Cod :

Nr. din data.....

Temperatura camerei: Ora:
Temperatura baie apa: Ora:

Reactivi : Trusa

✓ Ag. Cdp tip VDRL	_____	Lot :	Expira :
✓ Ag. Cdp tip RPR	_____	Lot :	Expira :
✓ TPHA	_____	Lot :	Expira :

Verificare calibrare ac de repartizare antigen VDRL / RPR

	Specificat	Rezultat	Validare
✓ VDRL/RPR ser Nr. picaturi / ml : 60 ± 2			DA / NU
✓ VDRL LCR Nr. picaturi / ml : 100 ± 2			DA / NU
Verificare turatie agitator :	180±2rpm(VDRL)		DA / NU
	100±2rpm(RPR)		DA / NU

Rezultate martori test

<u>Martori test VDRL</u>	Antigen	Ser pozitiv	Ser slab pozitiv	Ser negativ
Rezultat specificat trusa	-	+++ /++++	++	-
Rezultat obținut				
Validare test	DA [] NU []			

<u>Martori test RPR</u>	Ser pozitiv	Ser negativ
Rezultat specificat trusa	Reactiv (R)	Nereactiv (N)
Rezultat obținut		
Validare test	DA [] NU []	

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURĂ SPECIFICĂ DETECTAREA ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN MICROREAȚIA VDRL cod :					Exemplar nr.
						Editia:
						Revizia:
						Data aplicării:

	Hematii martor			Hematii sensibilizate		
	Diluent	Ser negativ	Ser pozitiv	Diluent	Ser negativ	Ser pozitiv
<u>Martori test TPHA</u>						
Rezultat specificat trusa	-	-	-	-	-	++++
Rezultat obținut						
Validare test	DA	[]	NU	[]		

Rezultate citire test :

Nr. si tip proba	Test	Reciproca dilutiei ser / plasma / LCR						Interpretare
		1	2	4	8	16	32	
	VDRL	1	2	4	8	16	32	
	RPR	1	2	4	8	16	32	
	TPHA	80	160	320	640	1280		
	VDRL	1	2	4	8	16	32	
	RPR	1	2	4	8	16	32	
	TPHA	80	160	320	640	1280		

Anexa 2 **REGISTRU RECEPTIE PROBE-REZULTATE ANALIZE** Cod:

Nr. crt.	Data / Nr. fișă lucru	Nr. probă reg. unic	Nr. probă solicitant	Nume prenume, vârstă	Trimis de :	Diagnostic

V.D.R.L. / R.P.R.						TPHA ser				TPHA LCR		ELISA IgM	FTA Abs	Inregistrat de:
1	2	4	8	16	32	80	160	320	640	4	20			

