

INFORMAZIONI PER L'ORDINE

Formato	Codice	Composizione
Kit 6 x 50 det.	CSI087315	-
Kit 1 x 50 det.	CSI087331	n° 1 flacone x 1,5 ml
Kit 1 x 50 det.	CSI087332	n° 1 flacone x 1,5 ml
Kit 1 x 50 det.	CSI087333	n° 1 flacone x 1,5 ml
Kit 1 x 50 det.	CSI087334	n° 1 flacone x 1,5 ml
Kit 1 x 50 det.	CSI087335	n° 1 flacone x 1,5 ml
Kit 1 x 50 det.	CSI087336	n° 1 flacone x 1,5 ml
Kit 1 x 50 det.	CSI087337	n° 1 flacone x 2 ml
-	CSI087338	n° 1 flacone x 1 ml
Kit 1 x 50 det.	CSI087339	n° 2 flacone x 1,5 ml n° 2 flaconi x 2,5 ml

INTRODUZIONE

Il metodo classico per il gruppaggio degli streptococchi, secondo Lancefield, si basa sulla estrazione degli antigeni solubili e la loro identificazione mediante anticorpi specifici. Tale classificazione sierologica è comunemente adottata anche se possono manifestarsi patologie nell'uomo attribuibili a streptococchi non classificabili con il metodo sierologico proposto da Lancefield, in quanto non provvisti di antigeni gruppo-specifici. Oltre alla procedura di estrazione con acido a caldo citata, sono descritte altre metodiche tra cui quella di Fuller con formamide a caldo ed anche altre, più semplici e rapide. Il metodo Sclavo Diagnostics utilizza una procedura chimica semplice che consente di identificare i gruppi A, B, C, F e G senza reazioni crociate. Inoltre i ceppi che mostrano risultati negativi vengono analizzati di nuovo usando una tecnica diretta o una estrazione enzimatica dedicate all'antigene di gruppo D. La reazione sierologica è rivelata tramite l'uso di particelle di lattice sensibilizzate con l'anticorpo specifico, una sospensione per gruppo.

PRINCIPIO DEL METODO

Alcune colonie isolate sono stemperate nei reattivi chimici al fine di liberare l'antigene di gruppo. L'antigene così ottenuto viene distribuito sulla superficie delle cellette del cartoncino. Si aggiunge il lattice sensibilizzato con gli anticorpi specifici per i singoli gruppi. Se l'antigene corrispondente è presente nel campione, la reazione antigene-anticorpo causerà una agglutinazione visibile. Se il campione mostra una reazione negativa con il lattice dei gruppi A, B, C, F e G, selezionare altre colonie morfologicamente simili alle precedenti e trattarle con il reattivo per l'estrazione enzimatica. Analizzare l'antigene ottenuto con il lattice per il gruppo D. Un estratto polivalente di streptococchi dei sopra menzionati gruppi è fornito come controllo della funzionalità dei lattici.

COMPONENTI

Le concentrazioni indicate si riferiscono ai reattivi pronti per l'uso.

Reattivo Estraeante 1

1x1,5 mL, soluzione di sodio nitrito, pronta per l'uso.

Reattivo Estraeante 2

1x1,5 mL, soluzione di acido acetico, pronta per l'uso.

Reattivo Estraeante 3

2x2,5 mL, soluzione di ammonio carbonato, pronta per l'uso.
Contiene sodio azide 0,9 g/L come conservante.

Reattivo Estraeante E

1x2,0 mL, liofilizzato. Lisozima in tampone tris pH 8,2 ± 0,2.
Contiene stabilizzante non reattivo e sodio azide 0,9 g/L come conservante.
Sciogliere prima dell'uso con 2,0 mL di acqua distillata sterile.

Lattice A 1 x 1,5 mL

Sensibilizzato con anticorpi (da coniglio) anti streptococchi di gruppo A.
Contiene sodio azide 0,9 g/L come conservante.

Lattice B 1 x 1,5 mL

Sensibilizzato con anticorpi (da coniglio) anti streptococchi di gruppo B.
Contiene sodio azide 0,9 g/L come conservante.

Lattice C 1 x 1,5 mL

Sensibilizzato con anticorpi (da coniglio) anti streptococchi di gruppo C.
Contiene sodio azide 0,9 g/L come conservante.

Lattice D 1 x 3 mL

Sensibilizzato con anticorpi (da coniglio) anti streptococchi di gruppo D.
Contiene sodio azide 0,9 g/L come conservante.

Lattice F 1 x 1,5 mL

Sensibilizzato con anticorpi (da coniglio) anti streptococchi di gruppo F.
Contiene sodio azide 0,9 g/L come conservante.

Lattice G 1 x 1,5 mL

Sensibilizzato con anticorpi (da coniglio) anti streptococchi di gruppo G.
Contiene sodio azide 0,9 g/L come conservante.

Controllo Positivo

1x1,0 mL, liofilizzato. Antigeni di streptococchi di gruppo A, B, C, D, F e G in soluzione fisiologica. Contiene stabilizzante non reattivo e sodio azide 0,9 g/L come conservante.
Sciogliere prima dell'uso con 1,0 mL di acqua distillata sterile.

Stuzzicadenti numero 300.

Cartoncini monouso a fondo nero numero 50.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reattivi al lattice e i reattivi estraenti 1, 2, e 3, sono pronti per l'uso. Portare a temperatura ambiente ed agitare dolcemente i reattivi al lattice per ottenere una sospensione omogenea delle particelle. Dopo l'apertura il reagente è stabile fino a data di scadenza se mantenuto nelle condizioni indicate in "Conservazione e stabilità". Il Reattivo Estraeante E ed il Controllo Positivo sono in forma liofila e devono essere risospesi in acqua distillata sterile prima dell'uso. Se conservati a 2-8° C e preservati da contaminazioni, i reattivi ricostituiti sono stabili per 3 mesi.

Conservazione e stabilità



= Temperatura di conservazione 2-8 °C

Conservati a 2-8°C, evitando la luce diretta, i reattivi sono stabili fino alla data di scadenza riportata sulla etichetta. Non congelare. Evitare contaminazione microbica. Verifiche di stabilità ripetute su tre lotti diversi di reattivo hanno confermato una validità totale del reattivo di 36 mesi a 2°-8° C. Una leggera variazione nella composizione dei reattivi può verificarsi da lotto a lotto, senza interferire sui risultati del test.

REAGENTI e APPARECCHIATURE NECESSARI MA NON FORNITI

- Anse per la raccolta delle colonie
- Tubi per l'estrazione degli antigeni
- Pipette da 15 µl
- Contenitori adeguati per lo smaltimento di materiale infetto

RACCOLTA E CONSERVAZIONE CAMPIONI

Per una corretta identificazione è importante che le colonie (che devono essere bene isolate su Agar Sangue) siano prelevate fresche. Prima dell'analisi sierologica, è consigliabile osservare l'attività emolitica ed allestire un vetrino con la colorazione di Gram per assicurarsi della purezza del ceppo da esaminare.

PROCEDIMENTO

Controllo qualità

Usare il controllo positivo e soluzione fisiologica come se fossero estratti di un campione. L'assenza di reazioni rispettivamente positive o negative è indice di alterazione dei reattivi e/o dei controlli.

Tecnica con Estrazione chimica

1. Trasferire 30 µL (una goccia) di Reattivo Estraeante 1 in una provetta.
2. Prelevare 5-6 colonie con uno stuzzicadenti, prestando attenzione a non raccogliere parte del terreno di coltura, e stemperarle sul fondo della provetta.
3. Aggiungere 30 µL (una goccia) di Reattivo Estraeante 2.
4. Lasciare a temperatura ambiente per almeno 5 minuti ma non per più di 10 minuti. Un tempo di estrazione prolungato diminuisce la sensibilità del test.
5. Aggiungere 60 µL (due gocce) di Reattivo Estraeante 3 e miscelare. Utilizzare entro 15 minuti.
6. Riportare in sospensione il lattice del reattivo da usare (es. A, B, C, F e/o G) agitando bene il flacone.
7. Tenendo il contagocce verticalmente, trasferire una goccia di lattice in una celletta del cartoncino. Ripetere su cellette diverse per gli altri eventuali lattici da usare.



8. Aggiungere 15 µL di estratto antigenico in ogni celletta.
9. Usando uno stuzzicadenti pulito per ogni celletta, miscelare la reazione accuratamente. Scartare le bacchette usate.
10. Roteare il cartoncino. Al termine di un minuto, osservare ciascuna celletta per accertare la presenza o meno di agglutinazione. Agglutinazioni successive sono da considerarsi aspecifiche.

In caso di risultati negativi, procedere con la tecnica per l'identificazione degli streptococchi di gruppo D.

Tecnica Diretta

(Procedura che permette di identificare circa il 70% dei ceppi di gruppo D)

1. Trasferire 30 µL (una goccia) di Reattivo Estraeante 3 in una celletta del cartoncino.
2. Prelevare 2-3 colonie con uno stuzzicadenti pulito, prestando attenzione a non raccogliere parte del terreno di coltura, e stemperarle accuratamente sulla stessa celletta del cartoncino.
3. Aggiungere una goccia di Lattice D.
4. Roteare il cartoncino. Al termine di un minuto, osservare la celletta per accertare la presenza o meno di agglutinazione. Agglutinazioni successive sono da considerarsi aspecifiche.

In caso di risultati negativi, procedere con la tecnica di estrazione enzimatica.

Tecnica con Estrazione Enzimatica

(Procedura che permette di identificare più del 95% dei ceppi di gruppo D)

1. Trasferire, dopo ricostituzione, 60 µL di Reattivo Estraeante E in una provetta.
2. Prelevare 4-5 colonie con uno stuzzicadenti pulito, prestando attenzione a non raccogliere parte del terreno di coltura, e stemperarle sul fondo della provetta.
3. Incubare a 37°C per 10 minuti.
4. Tenendo il contagocce verticalmente, aggiungere una goccia di lattice D in una celletta del cartoncino.
5. Aggiungere 15 µL di estratto antigenico alla celletta.
6. Usando uno stuzzicadenti pulito, miscelare la reazione accuratamente. Scartare le bacchette usate.
7. Roteare il cartoncino. Al termine di un minuto, accertare la presenza di agglutinazione. Agglutinazioni successive sono da considerarsi aspecifiche.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Tecnica con estrazione chimica

Positivo (per la presenza di antigeni dei Gruppi A,B,C,F o G): agglutinazione nella celletta del campione in esame rispettivamente con i lattici A,B,C,F o G.

Negativo (per la presenza di antigeni dei Gruppi A,B,C,F o G): nessuna agglutinazione nella celletta del campione in esame rispettivamente con i lattici A,B,C,F o G.

Tecnica diretta

Positivo (per la presenza di antigene del Gruppo D): agglutinazione nella celletta del campione in esame con il lattice D.

Negativo (per la presenza di antigene del Gruppo D): nessuna agglutinazione nella celletta del campione in esame con il lattice D.

Tecnica con estrazione enzimatica

Positivo (per la presenza di antigene del Gruppo D): agglutinazione nella celletta del campione in esame con il lattice D.

Negativo (per la presenza di antigene del Gruppo D): nessuna agglutinazione nella celletta del campione in esame con il lattice D.

Avvertenze

Un insufficiente quantitativo di coltura batterica utilizzata può causare risultati falsamente negativi.

TEST DI VALIDAZIONE

Sensibilità

L'identificazione con la tecnica di estrazione chimica dei gruppi A,B,C,F e G degli streptococchi, eseguita sia su ceppi liofili di collezione sia su isolati clinici, ha dato una sensibilità del 98%.

L'identificazione del gruppo D con la tecnica diretta ha dato una sensibilità del 74,3%.

L'identificazione del gruppo D con estrazione enzimatica ha dato una sensibilità del 92%.

Precauzioni d'uso

I reattivi estraenti 1 e 2 risultano dannosi. Consultare le Schede di Sicurezza relative ai rischi e misure di sicurezza (**Identificazione del rischio: Reattivo 1 : GHS03 - H272,**

GHS06 - H301, GHS09 - H400; Reattivo 2: GHS07 - H315, H319). Oltre alle indicazioni di rischio relative a componenti attivi, i reagenti possono contenere componenti non attivi quali conservanti e detergenti. La concentrazione totale di tali componenti è inferiore ai limiti riportati nella direttiva 1272/2008 CE e successive modifiche e integrazioni. Si raccomanda comunque di manipolare i reagenti secondo le norme di buona pratica di Laboratorio.

Il prodotto è conforme al D.L. 8 Settembre 2000, n. 332 "Attuazione della direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico diagnostici in vitro".


Smaltimento reagenti

Lo smaltimento deve avvenire in accordo con le disposizioni comunitarie in materia di rifiuti o con le disposizioni nazionali o regionali vigenti.

Bibliografia


1. Arcuri F., Molina A.M., Calegari L., Fontana G (1963). Anticorpi antistreptococchi nei sieri umani. Applicazione della reazione di agglutinazione al latex per la dimostrazione degli anticorpi anti.M. L'Igiene moderna. 56, 147.
2. Fanini A., Vignola D., Strapparava E., Zanini (1969) Quad Sclavo Diagn 5, 419
3. Lancefield R.C.(1928). The Antigenic Complex of Streptococcus haemolyticus: I. Demonstration of a type-specific substance in extracts of Streptococcus Haemolyticus. J Exp Med • 47, 91-103.
4. Molina A.M., Saletti M. (1961) Ann Sclavo 3, 755.
5. Pianigiani A. (1965) Quad Sclavo Diagn 1, 36.
6. Pianigiani A., Pianigiani M. (1963) Ann Sclavo 5, 623.
7. Romanzi C.A. (1966). Biology of *Streptococcus pyogenes* and immunological response to streptococcal antigens in rheumatic disease. Giorn Mal Infett Parass, 18, 375-411,.
8. Rossolini A., Lecchini L., Forte D., Benedetti P.A. (1963) Antibody M in children affected by streptococcal infections. Riv Clin Ped, 72, 268-291.
9. Facklam R.F., Martin D.R., Lovgren M., Johnson D.R., Efstratiou A., Thompson T.A., Gowan S., Kriz P., Tyrrell G.J. Kaplan E. and Beall B. (2002) Extension of the Lancefield classification for group A streptococci by addition of 22 new M protein gene sequence types from clinical isolates: emm 103 to emm 124. Clin. Infect Dis. 34 (1):28-38.

Simboli utilizzati

 = Dispositivo medico diagnostico in vitro

 = Numero di catalogo


 = Numero del lotto

 = Fabbricante

 = Data di scadenza

 = Temperatura di conservazione

 = Istruzioni per l'uso

 = Attenzione, leggere il foglietto illustrativo

