

Determinazione di anticorpi contro antigeni febbrili (Salmonella Tifo, Salmonella Paratifo A, Salmonella Paratifo B, Brucella, Proteus).
Test per agglutinazione rapida su vetrino (qualitativo di screening) o in provetta (semiquantitativo).

REF RT1060 6x5 mL (Reagenti) + 4x1 mL (Controlli)

METODO E PRINCIPIO

Gli antigeni colorati presenti nel kit (reagenti da 1 a 6) sono sospensioni standardizzate di batteri uccisi utilizzabili per la determinazione qualitativa e semi quantitativa di specifici anticorpi che si sviluppano in corso di infezioni come brucellosi, salmonellosi e rickettsiosi.

Gli anticorpi testati sono sia quelli somatici che flagellari (O e H).

Il test di screening (qualitativo) è basato su una agglutinazione su vetrino tra il reagente specifico ed il siero del paziente. Diluizioni scalari in provetta del campione in esame consentono il test semi quantitativo.

SIGNIFICATO CLINICO

Un certo numero di microrganismi patogeni per l'uomo (batteri) sono responsabili di varie infezioni (brucellosi, salmonellosi e rickettsiosi) con stati febbrili nel paziente. L'accertamento diretto dell'antigene responsabile dell'infezione rimane il test di elezione per stabilire l'eziologia di una malattia infettiva. Tuttavia, queste tecniche colturali potrebbero essere difficili da usare, per cui i test sierodiagnostici diventano uno strumento importante per rilevare gli anticorpi prodotti nel siero del paziente durante l'infezione (metodo indiretto di diagnosi). Il risultato del test deve sempre essere interpretato alla luce dei segni clinici, dell'anamnesi e di altri esami diagnostici.

COMPOSIZIONE DEI REAGENTI

Reagenti da 1 a 6: Sospensione in soluzione tamponata e stabilizzata di batteri uccisi e colorati. (6x5 mL)

- R1: Brucella Abortus
- R2: Proteus OX19
- R3: Salmonella Paratifo A-H
- R4: Salmonella Paratifo B-H
- R5: Salmonella Tifo - H
- R6: Salmonella Tifo - O

Reagente 7: Siero Controllo Negativo (1x1 mL)

Reagenti da 8 a 10: Sieri di Controllo Positivi (3x1 mL)

- R8: Brucella Controllo Positivo
- R9: Proteus Controllo Positivo
- R10: Salmonella Controllo Positivo

Reagenti liquidi e pronti all'uso, stabili fino alla data di scadenza indicata, se conservati come indicato sull'etichetta ed evitando contaminazione, evaporazione ed esposizione prolungata alla luce diretta. Non congelare i reagenti.

CAMPIONI

Raccogliere il siero utilizzando provette standard di prelievo. Utilizzare campioni di siero freschi.

Se il test non può essere eseguito immediatamente, conservare il campione a +2 a +8°C per un massimo di 7 giorni. Per una conservazione più lunga, congelare il siero a -20° C per 3 mesi. Centrifugare i campioni contenenti precipitato prima di eseguire il test.

PROCEDURA

Materiali richiesti e non forniti nel kit:

- Cartoncini plastificati di supporto (oppure vetrini) per la reazione di agglutinazione (test di screening).
- Provette in plastica monouso per la reazione di agglutinazione (test semi quantitativo).
- Barrette in plastica monouso per agitare la miscela sul vetrino.
- Agitatore meccanico regolabile.
- Pipette automatiche per vari volumi e provette
- Soluzione Fisiologica per diluire i campioni da titolare.

Test Qualitativo

- Portare i reagenti e i campioni del test a temperatura ambiente.
- Risospingere delicatamente i flaconi dei reagenti (antigeni) aspirando diverse volte le soluzioni con il contagocce per ottenere una accurata miscelazione.
- Pipettare 5 volte 50 µL di siero in esame in cinque punti diversi del supporto dove avverrà l'agglutinazione (per tutti gli antigeni tranne la Brucella) ed 1 volta 20 µL di siero in esame nel punto del supporto dove avverrà l'agglutinazione per la sola Brucella.
- Pipettare 1 goccia di ogni controllo in 4 punti del supporto dove avverrà l'agglutinazione.
- Aggiungere 1 goccia di ogni appropriata sospensione, opportunamente agitata ed omogeneizzata, accanto ad ogni volume di campione o controllo distribuito in precedenza.
- Mescolare ogni campione o controllo con il proprio reagente utilizzando barrette in plastica monouso, applicando un movimento rotatorio per ricoprire una discreta area.
- Porre il supporto di reazione su un agitatore orbitante a lenta velocità (100 r.p.m.)
- Attendere 1 minuto ed osservare immediatamente sotto una fonte di luce adatta l'agglutinazione che si dovesse generare.

Test Semi Quantitativo

- **Per ogni antigene da testare**, usando la Soluzione Fisiologica come diluente, effettuare in una provetta, una diluizione 1:20 (1,9 mL di fisiologica + 0,1 mL di campione).
- A partire da questa diluizione, fare 5 ulteriori diluizioni a raddoppio in nuove provette (1 mL della diluizione precedente + 1 mL di Soluzione Fisiologica) fino a realizzare le seguenti ulteriori diluizioni del campione: 1:40 – 1:80 – 1:160 – 1:320 – 1:640. Scartare l'ultimo volume di 1 mL affinché nell'ultima provetta rimanga il volume di 1 mL di diluito.
- Predispone anche una provetta con solo 1 mL di Soluzione Fisiologica (Controllo della Sospensione Batterica).
- Allestire altre due provette per i Controlli Negativo e Positivo con 1 mL di Soluzione Fisiologica e due gocce del rispettivo controllo.
- Ad ogni provetta (le diluizioni dei campioni, il Controllo Sospensione ed i Controlli negativo e positivo) aggiungere 100 µL del Reagente (Antigene) appropriato.
- Agitare bene ed incubare a 37° C per 24 h. (alternativamente, l'antigene somatico Salmonella Tifo O ed il Proteus possono essere incubati per 4 ore a 48 – 50° C, invece gli antigeni flagellari

H possono essere incubati a 48 – 50° C per 2 ore).

- Leggere le agglutinazioni macroscopiche che dovessero verificarsi annotando l'ultima diluizione in cui esse sono presenti. Per leggere meglio l'agglutinazione, agitare lievemente la provetta. La risospensione delle cellule, se non agglutinate, forma un vortice tipico e ben differente da cellule agglutinate che chiarificano anche il liquido surnatante
- La provetta con la sola Sospensione Batterica ed il Controllo Negativo non devono dare alcuna agglutinazione.
- Il Controllo Positivo deve dare agglutinazione evidente.

RISULTATI

Risultati Test Qualitativo

Non reattivo: in un risultato negativo non si evidenzia alcuna agglutinazione (nessuna presenza di anticorpi).

Reattivo: in un risultato positivo si osservano lievi ma definiti e intensi aggregati.

Risultati Test Semi Quantitativo

Come nel test qualitativo. Il titolo del campione è riportato come la più grande diluizione che mostra reattività. La successiva diluizione dovrebbe essere negativa. Se la massima diluizione testata è ancora reattiva (positiva) ripetere il test con diluizioni del campione successive all'ultima testata.

CONTROLLO QUALITA'

Utilizzare il materiale del controllo di qualità di **MTD Diagnostics** incluso nel kit.

VALORI DI RIFERIMENTO

Non reattivo.

Per Brucella e Salmonella antigene somatico O, un titolo maggiore di 1:40 (cioè a partire da 1:80) indica una infezione recente.

Per Salmonella antigene H un titolo maggiore di 1:80 (cioè a partire da 1:160) indica una infezione recente.

Per Proteus sono significativi i titoli a partire da 1:160

Una infezione in atto mostra una variazione di titolo significativa su prelievi effettuati a distanza di 15 giorni uno dall'altro. Un titolo elevato, se confermato a distanza di due settimane, sarebbe indicativo di infezione recente ma non attiva.

INTERFERENZE E SPECIFICITA'

Emoglobina (<10 g/dL), Bilirubina (<20 mg/dL) e Lipemia (<1000 mg/dL) non interferiscono. Il Fattore Reumatoide (> 300 UI/mL) interferisce. Altre sostanze possono interferire.

NOTE

1. Reazioni falsamente negative possono verificarsi in corso di test qualitativo di screening a causa del possibile effetto prozona. Una diluizione del campione evidenzierà l'esistenza di anticorpi (agglutinazione). Questa procedura (diluizione del campione) deve essere fatta ogni volta si sospetti una forte positività, cioè paziente con evidenti segni clinici e test di screening negativo.
2. Falsi negativi possono anche verificarsi in caso di malattia da poco in atto (effetto finestra) o in caso di immunodeficienza congenita o acquisita.
3. Falsi positivi per Brucella possono verificarsi da cross reazione con anticorpi contro alcuni ceppi di Vibrione Colerico, Campilobacter, Pastorella, Proteus e Yersinia come pure in soggetti vaccinati contro il Vibrione Colerico.

PRECAUZIONI

I sieri umani presenti nel Reagente R7-R10 (controlli) sono stati testati con metodi marcati CE e approvati FDA e sono stati trovati negativi per presenza di HBsAg, HIV 1&2, HCV. I batteri presenti nel preparato R1 – R6 sono uccisi e non sono in grado di trasmettere malattie infettive all'uomo. Tuttavia, questo prodotto deve essere maneggiato come se fosse rischioso e potenzialmente capace di trasmettere malattie infettive di ogni tipo, in accordo con le norme di Buona Pratica di Laboratorio. Il prodotto non contiene altre sostanze o miscele pericolose secondo la regolamentazione CE n° 1272/2008 ovvero le loro concentrazioni sono tali da non essere considerate persistenti, bioaccumulanti o tossiche (PBT). Il prodotto è classificato ed etichettato secondo le direttive CE o le corrispondenti normative nazionali. Sodio Azide inferiore a 0.1%.

Tuttavia, in osservanza alle normali norme di prudenza che ognuno deve osservare allorchè maneggi qualunque sostanza chimica o reagente di laboratorio, in caso di contatto dei Reagenti con l'operatore, occorre applicare i seguenti interventi di primo soccorso:

S26 (P305 – P351 – P338): In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico.

S28 (P302 – P352): In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente ed abbondantemente.

S36/37/39 (P280): Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46 (P301 – P310): In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta. Se la vittima è cosciente, lavare la bocca con acqua.

S56 (P273): Smaltire questo materiale e relativi contenitori in un punto di raccolta autorizzato per rifiuti pericolosi o speciali.

S63 (P304 – P340): In caso di incidente per inalazione, allontanare l'infortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo.

Tutti i campioni in esame, calibratori e controlli devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo capace di trasmettere HIV ed epatiti

PER OGNI ALTRA INDICAZIONE, RICHIEDERE LA SCHEDA DI SICUREZZA AL PRODUTTORE.

SIMBOLOGIA

| | | | |
|------------|---|--|-------------------------------------|
| | Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79 CE) | | |
| | Dispositivo medico diagnostico in vitro | | Limiti temperatura di conservazione |
| | Consultare istruzioni per l'uso | | Dimensione / numero test |
| REF | Numero di catalogo | | Scadenza |
| LOT | Numero di lotto | | Fabbricante |

BIBLIOGRAFIA

Felix, A. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 37: 321 (1944).

Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. Wld. Hlth. Org. Tech. Rep. Ser. 148: 1 (1958).