

USO

Dispositivo medico-diagnostico in vitro, immunocromatografico, per la determinazione rapida, qualitativa, dell'antigene streptococcico A in tamponi faringei, nella diagnosi di infezioni sostenute da ceppi di Streptococco di gruppo A

PRINCIPIO DEL METODO

Si tratta di una metodica qualitativa su membrana, rapida, con un solo passaggio analitico (*one step*), basata sul principio immunocromatografico "a sandwich", per la ricerca dell'antigene carboidratico dello Streptococco gruppo A

In questa procedura analitica, anticorpi specifici diretti contro l'antigene carboidratico dello streptococco di gruppo A sono immobilizzati nella regione della linea del test (T) sulla membrana del supporto di reazione. Quando il campione estratto dal tampone faringeo viene inoculato nel pozzetto del campione, reagisce con anticorpi che rivestono le relative particelle disperse nella membrana. Tali complessi migrano per cromatografia attraverso la superficie della membrana del supporto di reazione e reagiscono con gli anticorpi specifici immobilizzati nella regione T. Se il campione contiene l'antigene di gruppo A, si sviluppa una linea colorata in corrispondenza della regione del test (T), ad indicare un risultato positivo. Se il campione non contiene l'antigene di gruppo A, la linea colorata non appare, indicando un risultato negativo. Quale controllo procedurale, dovrà sempre apparire una linea colorata in corrispondenza della regione del controllo (C), ad indicare che la procedura analitica è stata effettuata correttamente.

CONTENUTO DEL KIT

- Card reattive monouso: supporti di reazione in sacchetto individuale sigillato
- Provette di estrazione monouso
- Puntali contagocce monouso
- Tamponi sterili (in Dacron)
- Reagente 1 (Nitrito di sodio 2M)

<p>Reagente 1 (Nitrito di sodio 2M)</p> 	<p>Conservare fuori dalla portata dei bambini Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. IN CASO DI INGESTIONE accompagnata da malessere: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.</p>
---	---

- Reagente 2 (0.027M Acido citrico)
- Controllo positivo (ceppo di streptococco Gr. A non-vitali in NaN₃ allo 0.09%)
- Controllo negativo (ceppo di streptococco Gr. C non-vitali in NaN₃ allo 0.09%)
- Istruzioni per l'uso

CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Il kit può essere mantenuto in frigorifero o a T. A. (2-30°C); **non congelare** e non utilizzare dopo la data di scadenza indicata sul sacchetto sigillato contenente il supporto di reazione. I supporti di reazione sono stabili solo se conservati nei relativi sacchetti sigillati.

PREPARAZIONE DEI REATTIVI

Tutti i reagenti sono pronti all'uso

MATERIALE AGGIUNTIVO

- Timer

PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico professionale *in vitro*. Non utilizzare oltre la data di scadenza.
- Non mangiare, bere o fumare nell'area di manipolazione dei campioni e dei reagenti.
- Manipolare tutti i campioni come se contenessero agenti infettanti. Osservare le disposizioni di legge vigenti stabilite nei confronti di rischi biologici durante tutta la procedura e seguire le procedure standard per il corretto smaltimento dei campioni.
- Durante la manipolazione dei campioni indossare indumenti protettivi, quali camici da laboratorio, guanti monouso e dispositivi di protezione oculare.
- I reagenti/campioni utilizzati devono essere smaltiti secondo la Normativa Vigente.
- L'umidità e la temperatura elevata possono alterare i risultati del test.
- Non utilizzare la card reattiva, qualora il sacchetto sigillato risulti danneggiato.
- Il Reagente 2 contiene acido in soluzione: qualora tale soluzione venga a contatto con la pelle o gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
- I controlli POSITIVO e NEGATIVO contengono sodio azoturo (NaN₃) quale conservante.
- Non scambiare tra loro i tappi di ciascun reagente
- Non scambiare tra loro i tappi di ciascun controllo

RACCOLTA DEI CAMPIONI e PREPARAZIONE

- Utilizzare i tamponi sterili e i reagenti inclusi nella confezione. Possono anche essere utilizzati tamponi di trasporto contenenti terreno di Stuart modificato o tamponi con terreno di trasporto Amies. Strofinare la parte posteriore della faringe, le tonsille e le altre parti infiammate. Evitare di toccare la lingua, le guance e i denti con il tampone.
- Il test dovrebbe essere eseguito al più presto dopo la raccolta del campione. I tamponi inoculati con campione possono essere conservati in provette pulite e asciutte fino a 8 ore a T.A. o fino a 72 ore a 2-8°C
- Qualora si desidera allestire anche la coltura batterica strofinare delicatamente il tampone su agar sangue selettivo per Streptococchi di Gruppo A (GAS), prima di utilizzare il tampone con la presente procedura analitica.



Tutti i campioni biologici impiegati devono essere considerati **POTENZIALMENTE INFETTI** e, come tali, manipolati secondo la B.P.L.

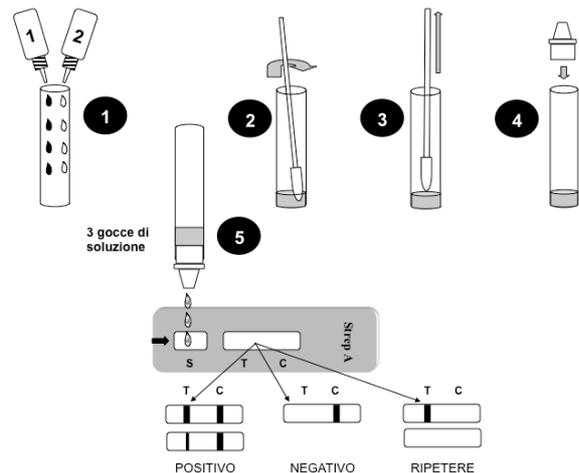


Figura 1

PROCEDURA OPERATIVA (fare riferimento alla figura 1)

Portare i reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso (15-30°C)

1. Togliere il supporto di reazione dall'involucro di protezione, tagliando il sacchetto lungo il bordo sigillato e porlo su una superficie piana, avendo cura di identificare ciascun supporto: risultati ottimali si ottengono se il supporto di reazione viene utilizzato entro breve tempo dall'apertura.
2. Seguire lo schema operativo: tenendo il flacone del Reagente 1 in posizione verticale, dispensare 4 gocce di liquido (~240 µL) (colore rosso) in una provetta di estrazione, evitando la formazione di bolle d'aria. Tenendo il flacone del Reagente 2 in posizione verticale, dispensare 4 gocce di liquido (~160 µL) (incoloro) nella medesima provetta di estrazione, evitando la formazione di bolle d'aria. Mescolare la soluzione per leggera agitazione della provetta di estrazione. L'aggiunta del reagente 2 determinerà una variazione della colorazione della miscela dal rosso al giallo.
3. Effettuare il prelievo dall'orofaringe ed immergere il tampone nella provetta di estrazione contenente la miscela gialla. Agitare il tampone 15 volte nella provetta e quindi lasciarlo in estrazione per 1 minuto. Quindi, spingere il tampone contro le pareti della provetta e premere sul fondo. Togliere il tampone ed eliminarlo.
4. Inserire il puntale contagocce sulla provetta di estrazione. Porre il supporto di reazione su una superficie piana e pulita. Dispensare 3 gocce di miscela di estrazione (~100 µL) nel pozzetto del campione (S) presente sul supporto di reazione e far partire il timer.
5. Attendere la formazione della/e linee rosse. Leggere il risultato dopo 5 minuti esatti. Non interpretare il risultato oltre i 10 minuti.

Nota: comunque non interpretare mai i risultati oltre i 10 minuti.

Nota: la velocità di sviluppo della banda colorata può essere influenzata dalla temperatura ambiente: tanto più quest'ultima è elevata, tanto più rapidamente può svilupparsi la colorazione.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Facendo riferimento alla Figura 1, si potranno ottenere tre tipi di risultati:

POSITIVO: in aggiunta alla banda del controllo (C), si evidenzia in modo netto una banda colorata nella zona di reazione positiva (T). L'intensità della colorazione rossa in questa zona dipende dalla concentrazione di emoglobina nel campione; comunque, anche la formazione di una debole banda rosata è indicativo di positività del test.

NEGATIVO: si sviluppa la banda colorata soltanto nella zona di controllo (C); non appare la banda nella zona di reazione positiva

INDETERMINATO (RIPETERE): se non si evidenziano distinte bande colorate, sia nella zona del controllo che nella zona di reazione positiva, il test è da considerarsi "non valido": si raccomanda di ripetere il test.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Controllo di qualità interno

Controlli interni della procedura sono inclusi nel metodo stesso: lo sviluppo di una linea rossa nella regione del controllo (C) rappresenta il controllo procedurale positivo, a conferma di una corretta esecuzione della metodica.

Controllo di qualità esterno

In aggiunta ai consueti controlli standard di qualità del Laboratorio, è raccomandabile testare, all'apertura di un nuovo kit, un controllo positivo ed uno negativo: ciò per verificare il corretto funzionamento del supporto di reazione e dei reagenti: questi controlli sono forniti nel kit:

1. Dispensare 4 gocce di Reagente 1 e 4 gocce di Reagente 2 in una provetta di estrazione: mescolare, riscendendo delicatamente la soluzione dal fondo della provetta.
 2. Aggiungere 1 goccia di controllo Positivo (o Negativo) alla soluzione in provetta di estrazione, mantenendo il flacone verticale.
 3. Inserire un tampone sterile nella provetta: agitare il tampone 15 volte nella provetta e quindi lasciarlo in estrazione per 1 minuto. Quindi, spingere il tampone contro le pareti della provetta e premere sul fondo. Togliere il tampone ed eliminarlo.
 4. Proseguire come descritto al punto 4 della PROCEDURA OPERATIVA
- Qualora i controlli non forniscano il risultato atteso, non eseguire il test sui campioni. Ripetere i controlli negativo e positivo e/o contattare il rivenditore.

LIMITAZIONI DEL METODO

1. Il presente kit è stato formulato esclusivamente per determinazioni *in vitro*. Il test deve essere eseguito esclusivamente per la ricerca dell'antigene streptococcico A in tamponi faringei. Trattandosi di un metodo qualitativo per la ricerca dell'antigene streptococcico A, non è in grado di fornire indicazioni sulla concentrazione batterica.
2. La metodica descritta indica, esclusivamente, la presenza di antigene streptococcico A in campioni contenenti streptococchi di gruppo A, sia vitali che non.
3. Un risultato negativo dovrebbe essere confermato con metodi colturali. Un risultato negativo si può

riscontrare quando la concentrazione dell'antigene streptococcico A è scarsa o al di sotto del limite di rilevabilità del metodo.

- Una raccolta eccessiva di sangue e/o muco sul tampone possono interferire nella corretta interpretazione dei risultati (falsi positivi). Durante il prelievo, evitare di toccare la lingua, le guance, i denti¹ o zone sanguinanti della gola con il tampone.
- Come tutti i test di laboratorio, l'interpretazione ai fini della diagnosi deve essere supportata da tutte le altre indagini necessarie ed informazioni cliniche

VALORI ATTESI

Il 15% circa delle faringiti che colpiscono i bambini dai 3 mesi ai 5 anni di età sono causate da streptococchi β-emolitici di Gruppo A². Nei bambini in età scolare e negli adulti le infezioni delle vie aeree sostenute da streptococchi raggiungono il 40% di incidenza³. Queste patologie insorgono, generalmente, in inverno ed all'inizio della primavera, nelle regioni temperate³.

PRESTAZIONI DEL METODO

Sensibilità e Specificità

Utilizzando 3 diverse strutture sanitarie per una corretta valutazione, sono stati raccolti 525 tamponi da pazienti che mostravano sintomi di faringite. Ciascun tampone è stato collezionato con mezzo di trasporto agar sangue e testato con il presente metodo. È stata, quindi, effettuata la coltura e le piastre incubate a 37°C in atmosfera di CO₂ al 5-10% con dischetto di bacitracina, per 18-24h. Le piastre risultate negative sono state mantenute in incubazione per ulteriori 18-24h. Le colonie producenti gas sono state isolate e confermate con metodica commerciale per identificazione di gruppo (agglutinazione su lattice).

Dei 525 campioni totali, 401 sono risultati negativi dopo coltura e 125 positivi. Durante lo studio, sono stati isolati ceppi di streptococco Gruppo F che hanno dato risultato positivo con il presente metodo. Uno di questi ceppi è stato re-isolato, ritestato ed è risultato negativo. Tre ulteriori ceppi di streptococco Gruppo F sono stati, quindi, posti in coltura e testati per eventuale cross-reattività, dando risultato negativo. (vedi Tabella seguente)

Metodo	Coltura		Risultati totali	
	Risultati	Positivi		Negativi
Strep A Device	Positivi	117	11	128
	Negativi	7	390	397
Risultati totali		124	401	525

Sensibilità relativa: 94,4% (88,7-97,7%)^{*}

Specificità relativa: 97,3% (95,1-98,6%)^{*}

Accuratezza: 96,6% (94,6-98,0)

(* Al 95% dell'intervallo di confidenza)

CLASSIFICAZIONE DELLE COLTURE POSITIVE	Strep A Device	% CONCORDANZA
Rare	10/12	83,3%
1+	20/22	90,9%
2+	18/20	90,0%
3+	31/32	96,9%
4+	38/38	100,0%

CROSS-REATTIVITÀ

I batteri indicati sono stati testati alla concentrazione di 1 x 10⁷ organismi per piastra e sono risultati tutti negativi quando analizzati con il presente metodo. Non è stata effettuata valutazione riguardante i micobatteri.

Streptococchi Gr. B
Streptococchi Gr. F
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus mutans
Staphylococcus aureus
Corynebacterium diphtheriae
Candida albicans
Pseudomonas aeruginosa
Neisseria meningitidis
Neisseria secca
Branhamella catarrhalis

Streptococchi Gr. C
Streptococchi Gr. G
Streptococcus sanguinis
Enterococcus faecalis
Staphylococcus epidermidis
Serratia marcescens
Klebsiella pneumoniae
Bordetella pertussis
Neisseria gonorrhoeae
Neisseria subflava
Haemophilus influenzae

CARATTERISTICHE DIAGNOSTICHE

Lo *Streptococcus pyogenes* è un batterio a forma di cocco, immobile, gram-positivo, compreso nel gruppo Lancefield A, in grado di causare gravi infezioni quali faringiti ed altre patologie respiratorie, impetigine, endocarditi, sepsi puerperale ed aritmi¹. In assenza di terapia, queste infezioni possono provocare severe conseguenze, inclusa la febbre reumatica ed accessi peritonillari². Le procedure classiche per l'identificazione di streptococchi di gruppo A, prevedono la coltura e l'isolamento di forme vitali del batterio e richiedono 24-48 ore (talvolta tempi maggiori)^{3,4}.

Il metodo qui descritto (su tampone faringeo) rappresenta un test rapido, in grado di rilevare qualitativamente la presenza degli antigeni di Streptococco Gr.A, entro 5 minuti dall'esecuzione del test. La metodica impiega anticorpi specifici diretti contro lo streptococco di gruppo A, in grado di rilevare l'antigene di gruppo A in campioni prelevati con tampone faringeo.

BIBLIOGRAFIA

- Murray, P.R., et al. Manual of Clinical Microbiology, 6th Edition, ASM Press, Washington D.C., 1995, p. 299-307.
- Webb, KH. Does Culture Confirmation of High-sensitivity Rapid Streptococcal Tests Make Sense? A Medical Decision Analysis. Pediatrics (Feb 1998), 101:2. 2.
- Bisno AL, Gerber MA, Gwaltney JM, Kaplan EL, Schwartz RH. Diagnosis and Management of Group A Streptococcal Pharyngitis. Clinical Infectious Diseases (1997), 25: 574-83.
- Needham CA, McPherson KA, Webb KH. Streptococcal Pharyngitis: Impact of a High-sensitivity Antigen Test on Physician Outcome. Journal of Clinical Microbiology (Dec 1998), 36: 3468-3473.
- Shea, Y.R., Specimen Collection and Transport, Clinical Microbiology Procedures Handbook, Isenberg, H.D., American Society of Microbiology, Washington D.C., 1.1.1-1.1.30, 1992.
- Nussinovitch, M, Finkelstein Y, Amir J, Varsano, I. Group A beta-hemolytic streptococcal pharyngitis in preschool children aged 3 months to 5 years. Clinical Pediatrics (June 1999), 38: 357-360.
- Woods WA, Carter CT, Stack M, Connors Jr AF, Schlager TA. Group A Streptococcal Pharyngitis in Adults 30 to 65 years of age. Southern Medical Journal (May 1999), 491-492.

Indice dei Simboli

	Attenzione, seguire le istruzioni per l'uso		Tests per kit		Rappresentante Autorizzato
	Per uso esclusivo "in vitro"		Utilizzare entro		Non riutilizzare
	Conservare a 2-30°C		Numero di Lotto		N. Catalogo #
	Non utilizzare se la confezione è danneggiata				

Codici di Riordino:

C2540 Strep A Device

20 test



Bio Plastic Sas - 00100 Roma