



OBIETTIVO:

Determinare la presenza o meno nel siero in esame di anticorpi anti O-streptolisinici e valutarne il titolo.

PRINCIPIO:

La O-streptolisina è una emolisina prodotta da *Streptococcus pyogenes* beta emolitico. La O-streptolisina provoca sulla membrana delle emazie dei fori dai quali fuoriesce l'emoglobina. Gli anticorpi che si fissano alla tossina, (reazione di neutralizzazione) impediscono l'evento. Come sistema rivelatore della presenza o meno di anticorpi nel siero si usano le emazie. Se i globuli rossi più il siero in esame, vengono lisati dall'aggiunta di O-streptolisina non si è verificata una reazione di neutralizzazione, dunque nel siero non sono presenti anticorpi anti O-streptolisinici. Viceversa l'assenza di lisi segnala la presenza di anticorpi capaci di legare e neutralizzare la tossina.

MATERIALI E STRUMENTI:

MATERIALI BIOLOGICI

O-streptolisina titolata, globuli rossi di coniglio al 5%

MATERIALI CHIMICI

Soluzione tampone a pH 6,5

VETRERIA, ...

Pipette in vetro o pipette automatiche, puntali, provette da sierologia, portaprovette

STRUMENTI

Centrifuga, bagnomaria

METODICA
(1ª FASE)



Diluire il siero

1/10 = 0,2 ml di siero + 1,8 ml di soluzione tampone
 1/100 = 0,5 ml siero 1/10 + 4,5 ml “ “
 1/500 = 1 ml siero 1/100 + 4 ml “ “



Lavare la sospensione di globuli rossi almeno 3 volte con il tampone, centrifugando ogni volta a 1500-2000 rpm per 5'. Dopo il lavaggio finale preparare la sospensione al 5% in tampone.

3 Disporre 14 provette come da schema:

	1:10		1:100					1:500					Controlli	
provetta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
siero diluito	0,8	0,2	1	0,8	0,6	0,4	0,3	1	0,8	0,6	0,4	0,2	-	-
tampone	0,2	0,8	-	0,2	0,4	0,6	0,7	-	0,2	0,4	0,6	0,8	1,5	1
reagente o-streptolisina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5
Agitare ed incubare a 37° per 15'														
emazie al 5%	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Agitare e incubare a 37° per 45', ripetere l'agitazione dopo 15'. Centrifugare le provette per 1-2' a 1000-1500rpm														

Il titolo del siero in esame è espresso dalla più alta diluizione che è capace di inibire l'emolisi. L'emolisi nelle provette è caratterizzata dal colore rosso della soluzione in esame. Le unità anti-o-streptolisiniche sono espresse come il reciproco del titolo di anticorpi come nello schema:

provetta	diluizione	provetta	diluizione
1	1/12	8	1/500
2	1/50	9	1/625
3	1/100	10	1/833
4	1/125	11	1/1250
5	1/166	12	1/2500
6	1/250	13	non vi deve essere emolisi
7	1/333	14	vi deve essere emolisi completa