

IMPIEGO PREVISTO

Il Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit costituisce una piattaforma per l'identificazione sierologica degli streptococchi beta-emolitici appartenenti ai gruppi di Lancefield A, B, C, D, F e G.

INTRODUZIONE E SPIEGAZIONE

Studi clinici, epidemiologici e microbiologici hanno dimostrato che la diagnosi delle infezioni dovute a streptococchi, basate su sintomi clinici, richiede sempre una verifica di tipo microbiologico⁽⁴⁾. I patogeni umani più frequentemente isolati nel genere *Streptococcus* sono quelli beta-emolitici. Quasi tutti gli streptococchi β-emolitici possiedono antigeni specifici (carboidrati), comunemente riferibili al gruppo. Lancefield dimostrò che questi antigeni possono essere estratti in forma solubile e identificati con una reazione di precipitazione mediante un antisiero omologo. Sono normalmente in uso differenti procedure di estrazione degli antigeni degli streptococchi^(1,2,6,7,10,11). Il Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit si basa sulla liberazione di specifici antigeni dalla parete batterica mediante una estrazione con acido nitroso modificato. Questo metodo di estrazione combinato con l'agglutinazione con lattice, offre un metodo rapido, sensibile e specifico per l'identificazione dei gruppi A, B, C, D, F e G, da colture primarie di streptococchi in piastra.

PRINCIPIO DEL METODO

Il nuovo metodo Prolex™ Streptococcal Grouping implica una estrazione chimica degli antigeni gruppo specifici degli streptococchi mediante reagenti sviluppati specificamente per una estrazione con acido nitroso modificato. I reagenti di estrazione n° 1 e 2 forniti con il kit contengono un composto chimico capace di estrarre gli antigeni specifici a temperatura ambiente. Il reagente n° 3 è una soluzione per la neutralizzazione della reazione. Gli estratti neutralizzati possono essere facilmente identificati usando le particelle di lattice di polistirene blu sensibilizzate con immunoglobuline gruppo specifiche purificate di coniglio. Queste particelle di lattice blu agglutinano con decisione in presenza di antigeni omologhi e non agglutinano quando gli antigeni non sono presenti.

MATERIALI FORNITI

Ogni kit è sufficiente per 60 test. Il materiale fornito è pronto per l'uso.

- **Reagenti al lattice:** ciascun flacone con contagocce contiene 3,0 ml di particelle di lattice blu rivestite di anticorpi di coniglio purificati appartenenti ai gruppi di Lancefield A, B, C, D, F o G. Le particelle di lattice blu sono sospese in una soluzione tampone con pH 7,4 contenente lo 0,098% di sodio azide come conservante.
- **Controllo positivo polivalente:** una fiala con contagocce contenente 2 ml di antigeni polivalenti pronti all'uso estratti da streptococchi inattivati dei gruppi di Lancefield A, B, C, D, F e G. Gli antigeni vengono sospesi in un tampone contenente lo 0,098% di sodio azide come conservante.
- **Extraction Reagent 1 (reagente di estrazione 1):** un flacone con contagocce contenente 3,2 ml di reagente con lo 0,098% di sodio azide come conservante.
- **Extraction Reagent 2 (reagente di estrazione 2):** un flacone con contagocce contenente 3,2 ml del reagente di estrazione n°2.
- **Extraction Reagent 3 (reagente di estrazione 3):** due flaconi con contagocce contenenti ciascuno 8 ml di reagente con lo 0,098% di sodio azide come conservante.
- Test card
- Mixing stick
- Istruzioni per l'uso

Tutti i componenti di questo kit sono disponibili separatamente per l'acquisto:

Reagente o componente	Numero catalogo
Reagente al lattice gruppo A	PL.031
Reagente al lattice gruppo B	PL.032
Reagente al lattice gruppo C	PL.033
Reagente al lattice gruppo D	PL.034
Reagente al lattice gruppo F	PL.035
Reagente al lattice gruppo G	PL.036
Reagente di estrazione 1	PL.037
Reagente di estrazione 2	PL.038
Reagente di estrazione 3	PL.039
Controllo positivo polivalente	PL.040
Mixing stick	PL.091P
Test card	PL.092-48

MATERIALE NECESSARIO, MA NON FORNITO

- Ago o ansa per inoculazione
- Pipette Pasteur
- Provette da 12 mm x 75 mm
- Timer

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

Tutti i componenti del kit devono essere conservati a 2 - 8°C. **Non congelarli.** I reagenti conservati in questo modo sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.

AVVERTENZE

1. Non usare i reagenti oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.
2. Alcuni reagenti contengono una minima quantità di sodio azide. Il sodio azide può reagire in modo esplosivo con le condutture in rame o piombo se lasciato accumulare. Benché la quantità di sodio azide nei reagenti sia minima, è necessario utilizzare una grande quantità di acqua quando si scaricano nel lavandino i reagenti utilizzati.
3. I reagenti di estrazione contengono una sostanza leggermente corrosiva. In caso di contatto con la pelle lavare immediatamente l'area con sapone e abbondanti quantità d'acqua. In caso di contatto del reagente con gli occhi, sciacquare con acqua per almeno 15 minuti.
4. Al momento della manipolazione, elaborazione e smaltimento di tutti i campioni clinici è necessario adottare precauzioni universali. Tutti i materiali dei test devono essere considerati potenzialmente infettivi sia durante che dopo l'uso e pertanto vanno maneggiati e smaltiti adeguatamente.
5. Il kit è destinato esclusivamente ad uso diagnostico *in vitro*.
6. Per ottenere risultati attendibili, è necessario seguire scrupolosamente le procedure, le condizioni di conservazione, le precauzioni e le limitazioni descritte in queste istruzioni.
7. Questi reagenti contengono materiali di origine animale e devono essere manipolati come potenziali portatori e trasmettitori di malattie.

RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE DELLE COLTURE

Per le procedure specifiche di raccolta e preparazione delle colture primarie, fare riferimento ad un manuale di normali tecniche microbiologiche. È necessario utilizzare una coltura fresca (18 - 24 ore) su agar sangue. Per il gruppaggio si devono utilizzare da una a quattro grosse colonie; comunque se le colonie sono piccole, è

necessario usare un numero maggiore di colonie.

PROTOCOLLO DEL TEST

Prima dell'uso tutti i componenti devono essere a temperatura ambiente.

1. Risospendere i reagenti al lattice utilizzati nel test capovolgendo più volte e delicatamente il flacone con contagocce. Prima dell'uso esaminare con attenzione i flaconi con contagocce verificando che le particelle di lattice siano adeguatamente in sospensione. Non utilizzare se il lattice non risulta risospeso.
2. Sigilare una provetta per ciascun ceppo da testare.
3. Aggiungere una goccia di Extraction Reagent 1 ad ogni provetta.
4. Selezionare 1 - 4 colonie beta-emolitiche con l'impiego di un'ansa o di un ago usa e getta e sospenderle nel reagente di estrazione 1. Se le colonie sono piccole, prenderne alcune ben isolate in modo da ottenere una sospensione torbida. In tutti i casi le colonie di streptococchi devono essere prelevate da un'area che presenti la minima probabilità di contaminazione da parte di un altro organismo.
5. Aggiungere una goccia di Extraction Reagent 2 ad ogni provetta.
6. Mescolare la reazione per 5 - 10 secondi tappando delicatamente la provetta con un dito.
7. Aggiungere 5 gocce di reagente di estrazione 3 in ciascuna provetta e mescolare per 5 - 10 secondi tappando delicatamente la provetta con un dito.
8. Versare una goccia di reagente al lattice di ciascun gruppo formando cerchi separati su diverse test card etichettate in base a ciascun ceppo da testare.
9. Usando una pipetta Pasteur per ciascun test porre una goccia di estratto accanto ad ogni goccia di reagente al lattice.
10. Miscelare il lattice e l'estratto con i bastoncini forniti distribuendoli su tutta l'area dei cerchi. Per ogni cerchio deve essere utilizzato un nuovo bastoncino.
11. Inclinare delicatamente le test card in modo da consentire alla miscela di scorrere lentamente sull'intera area circolare.
12. Osservare la presenza di agglutinazione per max. un minuto.

PROCEDURE DI CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Le procedure di routine di controllo della qualità applicate a ciascun lotto Prolex™ prevedono la verifica dei reagenti al lattice e dei reagenti di estrazione con ciascun gruppo di streptococchi A, B, C, D, F e G utilizzando i ceppi ATCC o equivalenti conformemente a quanto elencato nella presente sezione. L'estratto di questi ceppi agglutina con il reagente al lattice omologo. Il controllo positivo polivalente viene utilizzato per testare i singoli reagenti al lattice.

Organismo	Gruppo di Lancefield	Riferimento
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Gruppo A	ATCC 19615
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Gruppo B	ATCC 12386
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis</i>	Gruppo C	ATCC 12388
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gruppo D	ATCC 19433
<i>Streptococcus sp. tipo 2</i>	Gruppo F	ATCC 12392
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis</i>	Gruppo G	ATCC 12394

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Risultato positivo: Una forte e rapida agglutinazione delle particelle di lattice blu entro un minuto con uno dei reagenti al lattice indica l'identificazione specifica del ceppo di streptococchi. In caso di reazione debole con un singolo reagente al lattice ripetere il test usando un inoculo più pesante. Il test così ripetuto è considerato positivo se si osserva una agglutinazione con uno solo dei reagenti al lattice. La figura 1 illustra uno schema per il gruppaggio degli streptococchi.

Risultato negativo: nessuna agglutinazione delle particelle di lattice. In presenza di tracce di granulazione all'interno del cerchio è necessario considerare il risultato come negativo.



Risultato non risolutivo: In caso di comparsa di una debole aggregazione o di una reazione aspecifica (viscosità) all'interno del cerchio dopo un minuto, ripetere il test utilizzando una sottocoltura fresca. Se dopo il nuovo test si ottiene lo stesso risultato, utilizzare strumenti biochimici per identificare l'isolato.

Risultato aspecifico: In rari casi potrebbe riscontrarsi agglutinazione in più di un gruppo. In questo caso si consiglia di verificare la purezza della coltura utilizzata per eseguire il test. Se sembra pura, ripetere il test e verificare l'identificazione dell'isolato con strumenti biochimici.

LIMITI DEL METODO

1. Sono possibili risultati falsi negativi e falsi positivi in caso di utilizzo del kit in modo non conforme alle istruzioni e se viene usata una quantità insufficiente di coltura per estrazione.
2. Il kit è stato concepito esclusivamente per l'identificazione di streptococchi beta-emolitici. In caso di test su streptococchi alfa o non-emolitici è necessario verificare il risultato dell'identificazione mediante test biochimici (5,9) (Fare riferimento allo schema suggerito per il gruppaggio degli streptococchi).
3. Falsi positivi possono essere rilevati con organismi di generi diversi ad es. *Escherichia coli*, *Klebsiella* o *Pseudomonas* (3,8). Questi ceppi inducono reazioni di agglutinazione aspecifiche con tutti i reagenti al lattice.
4. Alcuni ceppi del gruppo D cross-reagiscono con l'antisiero del gruppo G; questi ceppi possono essere confermati come appartenenti al gruppo D mediante il test della bile-esculina. Potrebbe risultare difficile raggruppare alcuni ceppi di *Enterococcus faecium* e *Streptococcus bovis*.
5. *Listeria monocytogenes* può cross-reagire con i reagenti al lattice dei gruppi di streptococchi B e G. Può essere utilizzato il test della catalasi per distinguere tra *Listeria*, che è catalasi positiva, e gli streptococchi, che sono catalasi-negativi. La colorazione Gram e la motilità possono essere utilizzati per un ulteriore differenziamento.
6. Alcuni ceppi di *Streptococcus milleri* (*Streptococcus anginosus*) tipicamente non emolitici possiedono antigeni A, C, F o G e possono produrre reazione positiva con reagenti al lattice Strep A, C, F o G. Deve essere utilizzata la morfologia su agar sangue e test biochimici per identificare tali organismi.

PERFORMANCE DEL METODO

A. Studi di cross-reattività:

1. Il Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit è stato testato per la cross-reattività con 33 ceppi ATCC di riferimento. Il kit individua con efficacia tutti i gruppi di streptococchi contenenti gruppi di Lancefield A, B, C, D, F e G (N=16). Non è stata osservata cross-reattività durante le prove con altri ceppi di streptococchi (n=7) o con altri ceppi di non-streptococchi (n=10).

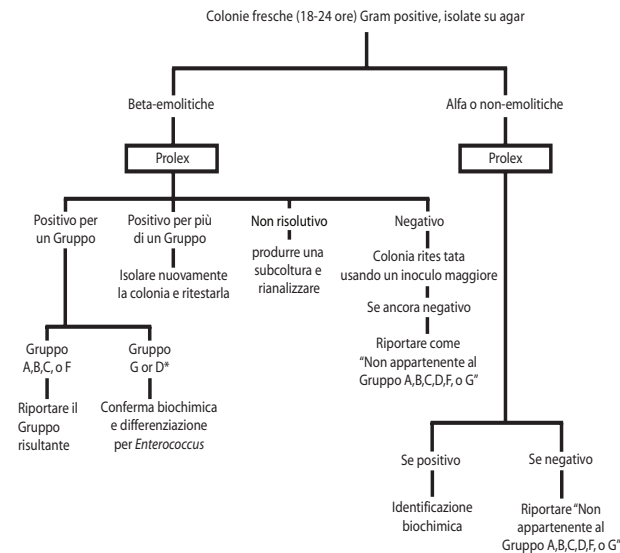
B. Studi clinici:

1. Il Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit è stato valutato mediante confronto con cinque kit di gruppaggio degli streptococchi disponibili in commercio. Lo studio è stato condotto da S. Davies et al. presso il Northern General Hospital di Sheffield, Inghilterra. Tutti i kit sono stati messi a confronto con un panel di 302 streptococchi beta-emolitici composti rispettivamente da 64, 67, 44, 55, 56 e da 4 ceppi dei gruppi di Lancefield A, B, C, D, G ed F. I risultati hanno mostrato che 12 dei ceppi non rientravano in nessuno dei kit testati. Dei restanti 290 ceppi il Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit ne ha identificati correttamente 286 (98,6%). I ricercatori sono giunti alla conclusione che il Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit si è dimostrato veloce e preciso con una sensibilità e una specificità, rispettivamente, del 99% e del 100%. Inoltre, il tempo medio di agglutinazione è stato sostanzialmente inferiore a quello ottenuto da tre degli altri quattro kit testati. Dati disponibili su richiesta.
2. Un secondo studio è stato realizzato dal Health Centre, Ontario, Canada. In questo studio, sono state incluse 111 colture primarie (110 testate, 1 ritenuta non adeguata). Tutti i ceppi sono stati inizialmente caratterizzati attraverso la reazione di precipitazione di Lancefield. Tutti i gruppi D sono stati ulteriormente confermati mediante saggi biochimici, quali BE (bile-esculina test) e PYR (pirrolididone-aminopeptidasi test). Le colture primarie sono state parallelamente testate usando il Prolex001TM 002Streptococcal Grouping Latex Kit e un kit alternativo. In questo studio, è stata riscontrata una concordanza del 99% tra i risultati ottenuti con Prolex001TM002 e con il metodo di Lancefield (109 su 110 colonie), mentre tra i due kit è stata riscontrata una concordanza del 96.3% (106 su 110). Le 110 colture primarie usate nello studio comprendevano 15 del gruppo A, 40 del gruppo B, 13 del gruppo C, 4 del gruppo D, 11 del gruppo F, 12 del gruppo G e 15 ceppi non raggruppabili.




BIBLIOGRAFIA







1. Ederer, G.M., Herrmann, M.M., Bruce, R. Matsen, J.M. and Chapman, S.S. (1972). Rapid Extraction Method with Pronase B for Grouping Beta-Haemolytic Streptococci. Appl. Microbiol., 23, 285.
2. EL Kholi, A., Wannamaker, L.W. and Krause, R.M. (1974). Simplified Extraction Procedure for Serological Grouping of Beta-Hemolytic Streptococci. Appl. Microbiol., 28, 836.
3. Elliot, S.D. and Tai, J.Y. (1978). The Type-Specific Polysaccharides of *Streptococcus suis*. J. Exp. Med., 148, 1699.
4. Facklam, R.R. (1980). Streptococci and Aerococci, Ch. 8 in Manual of Clinical Microbiology, 3rd Ed., Edited by Lennette, E.H. Balows, A., Hausler, W.J., and Truant, J.P. American Society for Microbiology, Washington, D.C. page 88-110.
5. Facklam R.R. (1977). Physiological Differentiation of Viridans Streptococci. J. Clin. Microbiol., 5, 184.
6. Fuller, A.T. (1938). The Formamide Method for the Extraction of Polysaccharides from Haemolytic Streptococci. Brit. J. Exp. Path., 19, 130.
7. Maxted, W.R. (1948). Preparation of Streptococcal Extracts for Lancefield Grouping. Lancet, ii, 255.
8. Nowlan, S.S. and Deibel, R.H. (1967). Group Q Streptococci. I. Ecology, Serology, Physiology and Relationships to Established Enterococci. J. Bact., 94, 291.
9. Petts, D.N. (1984). Early Detection of Streptococci in Swabs by Latex Agglutination Before Culture. J. Clin. Microbiol., 19, 432.
10. Rantz, L.A. and Randall, E. (1955). Use of Autoclaved Extracts of Haemolytic Streptococci for Serological Grouping. Stanford Med. Bull., 13, 290.
11. Watson, B.K., Moellering, R.C. and Kunz, L.J. (1975). Identification of Streptococci. Use of Lysozyme and Streptomyces albus filtrate in the Preparation of Extracts of Lancefield Grouping. J. Clin. Microbiol., 1, 274.

Figura 1: SCHEMA SUGGERITO PER IL GRUPPAGGIO DEGLI STREPTOCOCCI



* Si è riscontrato che alcuni ceppi del gruppo D cross-reagiscono con gli antisieri del gruppo G. [Harvey, C. L. and McIlmurray, M.B (1984) Eur. J. Clinical Microbiol, 10, 641].

PL.037	 <p>Avvertenza Ingrediente pericoloso: nitrito di sodio Nocivo se ingerito. Altamente tossico per gli organismi acquatici.</p> <p>Evitare il rilascio nell'ambiente. Non mangiare, bere né fumare mentre si utilizza questo prodotto. Lavarsi molto bene le mani dopo averlo maneggiato. Raccogliere eventuali fuoriuscite. IN CASO DI INGESTIONE: In caso di malessere rivolgersi ad un CENTRO ANTIVELENI o ad un medico. Smaltire il contenuto e il contenitore conformemente a tutte le normative locali, regionali, nazionali e internazionali vigenti.</p>
PL.038	 <p>Pericolo Ingrediente pericoloso: Acido acetico Potrebbe essere corrosivo per i metalli. Provoca gravi ustioni cutanee e danni oculari.</p> <p>Indossare guanti protettivi. Indossare una protezione per gli occhi o per il viso: Si consiglia: occhiali di sicurezza con protezioni laterali. Indossare indumenti protettivi: Si consiglia: camicia da laboratorio. Conservare esclusivamente nel contenitore originale. IN CASO DI INALAZIONE: Spostare la persona all'aria aperta e lasciarla riposare in una posizione che favorisca la respirazione. Chiamare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. IN CASO DI INGESTIONE: Chiamare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. NON indurre il vomito. IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o i capelli): Togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare con acqua o sotto la doccia. Chiamare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Chiamare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Smaltire il contenuto e il contenitore conformemente a tutte le normative locali, regionali, nazionali e internazionali vigenti.</p>
PL.039	 <p>Avvertenza Causa grave irritazione oculare. Causa irritazione cutanea.</p> <p>Indossare guanti protettivi. Indossare una protezione per gli occhi o per il viso: Si consiglia: occhiali di sicurezza con protezioni laterali. Lavarsi molto bene le mani dopo averlo maneggiato. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare cautamente con acqua per diversi minuti. In presenza di lenti a contatto si consiglia di toglierle se possibile. Continuare a sciacquare.</p>

	= Produttore
	= Mandatario nella Comunità Europea
	= Quantità sufficiente per (n) test
	= Dispositivo medico diagnostico in vitro
	= Limiti di temperatura
	= Per l'uso consultare le istruzioni

Le presenti istruzioni per l'uso sono state accuratamente tradotte dalla versione originale in lingua inglese. In caso di ambiguità o apparente discrepanza rivolgersi al servizio assistenza Pro-Lab.