

IMPIEGIO PREVISTO

Il Prolex™ Streptococcal Xtra Select Kit costituisce una piattaforma per l'identificazione sierologica degli streptococchi beta-emolitici appartenenti ai gruppi di Lancefield A e B.

INTRODUZIONE E SPIEGAZIONE

Studi clinici, epidemiologici e microbiologici hanno dimostrato la necessità di un metodo di identificazione più rapido per i gruppi primari di streptococchi A e B data l'elevata prevalenza e associazione con le patologie umane. La diagnosi delle infezioni dovute a streptococchi basate sui 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 (1,2,6,7,10,11,12). Il Prolex™ Streptococcal Xtra Select 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 e B da colture primarie di streptococchi in piastra.

PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo di gruppaggio del Prolex™ Streptococcal Xtra Select Kit implica un'estrazione enzimatica degli antigeni gruppo specifici per mezzo di enzimi litici appositamente selezionati. Il reagente di estrazione Streptococcal Xtra presente nel kit contiene una formulazione proprietaria di enzimi litici in grado di estrarre antigeni gruppo specifici di streptococchi a temperatura ambiente. Gli estratti possono essere facilmente identificati usando particelle di lattice di polistirene blu sensibilizzate con immunoglobuline gruppo specifiche purificate di coniglio. Le particelle di lattice agglutinano con decisione in presenza di antigeni omologhi e non agglutinano quando gli antigeni non sono presenti.

MATERIALI FORNITI

Ogni kit è sufficiente per 120 test. Il materiale fornito è pronto per l'uso.

- **Reagenti al lattice:** Il cliente sceglie quale delle due provette di reagenti al lattice blu per gruppaggio vuole nel kit. 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 o B. Le particelle di lattice blu sono sospese in una soluzione tampone con pH 7,4 contenente lo 0,098% di sodio azide come conservante. I reagenti al lattice disponibili sono:

| Reagente | Numero catalogo |
|------------------------------|-----------------|
| Reagente al lattice gruppo A | PL.1031 |
| Reagente al lattice gruppo B | PL.1032 |

- **Reagente di estrazione Streptococcal Xtra (PL.1037):** Due flaconi con contagocce contenenti 6,0 ml di reagente di estrazione con conservante.
- **Controllo positivo polivalente (PL.1040):** Un flacone 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.
- Mixing Stick in plastica
- Test card
- Istruzioni per l'uso

MATERIALE NECESSARIO, MA NON FORNITO

- Aghi o anse per inoculazione
- Pipette Pasteur
- Provette da 12 mm x 75 mm
- Timer

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

Tutti i componenti del kit devono essere mantenuti a 2 - 8°C. I reagenti conservati in queste condizioni resteranno stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta del prodotto. Non congelare.

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. Al momento della manipolazione, elaborazione e smaltimento di tutti i campioni clinici è necessario adottare precauzioni universali. Tutti i materiali del test devono essere considerati potenzialmente infettivi sia durante che dopo l'uso e pertanto vanno maneggiati e smaltiti adeguatamente.
4. I reagenti sono previsti esclusivamente per un uso diagnostico *in vitro*.
5. Per ottenere risultati attendibili, è necessario seguire scrupolosamente le procedure, le condizioni di conservazione, le precauzioni e le limitazioni descritte in queste istruzioni.
6. I reagenti contengono materiali di origine animale e devono essere manipolati come potenziale 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.

PROTOCOLLO DEL TEST

Tutti i componenti del kit devono essere portati a temperatura ambiente (18-22°C), prima dell'uso.

1. Rispondere il reagente al lattice capovolgendo delicatamente e più volte il flacone con contagocce. Prima dell'uso esaminare con attenzione il flacone con contagocce verificando che le particelle di lattice siano adeguatamente in sospensione. Non utilizzare se il lattice non risulta risospeso.
2. Siglare una provetta per ciascun ceppo da testare.
3. Aggiungere una goccia di reagente di estrazione 2 in ogni provetta.
4. Selezionare una colonia beta-emolitica con l'impiego di un'ansa o di un ago usa e getta e sospenderla nel reagente di estrazione Streptococcal Xtra. In tutti i casi la colonia di streptococchi deve essere prelevata da un'area che presenti la minima probabilità di contaminazione da parte di un altro organismo.
5. Mescolare la reazione tappando la provetta e lasciare sviluppare per 60 secondi.
6. Versare una goccia di reagente al lattice di ciascun gruppo su diversi cerchi della test card.
7. Usando una pipetta Pasteur, versare una goccia di estratto accanto ad ogni goccia di reagente al lattice.
8. Miscelare il lattice e l'estratto con i bastoncini forniti distribuendoli su tutta l'area del cerchio. Per ogni test deve essere utilizzato un nuovo

bastoncino.

9. Inclinare delicatamente la test card in modo da consentire alla miscela di scorrere lentamente nell'intero cerchio.
10. Osservare la presenza di agglutinazione per max. 30 secondi.

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 del reagente di estrazione Streptococcal Xtra con ciascun gruppo di streptococchi A e B 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 n. 19615 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Gruppo B | ATCC n. 12386 |

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Risultati positivi: Una forte e rapida agglutinazione delle particelle di lattice blu entro 30 secondi con uno dei reagenti al lattice indica l'identificazione specifica del ceppo di streptococchi.

Risultati negativi: nessuna agglutinazione delle particelle di lattice blu.

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).
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. *Listeria monocytogenes* può cross-reagire con i reagenti al lattice del gruppo di streptococchi B dato che presenta un'antigenicità simile al gruppo di streptococchi B. 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.
5. 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.







CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Le prestazioni del Prolex™ Streptococcal Xtra Select Kit sono state testate in strutture ospedaliere del Regno Unito utilizzando 293 ceppi di streptococchi beta-emolitici. I ceppi comprendevano 61 *Streptococcus pyogenes* (Gruppo di Lancefield A Strep), 91 *Streptococcus agalactiae* (Gruppo di Lancefield B Strep), 19 *Streptococcus sp.* Gruppo C, 65 *Enterococcus faecalis* gruppo D, 4 *Streptococcus sp.* Gruppo F e 53 *Streptococcus* gruppo G. Il kit ha dimostrato una sensibilità e una specificità del 100% verso entrambi i reagenti al lattice quando testati contro gli isolati. Il tempo medio per una reazione positiva verso reagenti del Gruppo A e del Gruppo B è stato, rispettivamente, di 13 secondi e 12 secondi.



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 Kholly, 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.
12. **Slifkin, M., Cumbie, R.** (1987) Serogrouping Single Colonies of Beta-Hemolytic Streptococci with Achromopeptidase Extraction. *J. Clin. Microbiol.* 25, 1555.

| | |
|---|---|
|  | = Produttore |
|  | = Mandatario nella Comunta Europea |
|  | = Quantita 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.