

## PROLEX™ STREPTOCOCCAL GROUPING LATEX KIT

### IMPIEGO PREVISTO

Prolex™ Streptococcal Grouping Latex kit è un metodo rapido per l'identificazione sierologica degli streptococchi beta-emolitici di gruppo A, B, C, D, F e G di Lancefield.

### INTRODUZIONE E OBIETTIVO DEL TEST

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  $\beta$ -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).

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 di streptococchi, da colture primarie in piastra.

### PRINCIPIO DEL METODO

Il nuovo metodo Prolex™ Streptococcal Grouping implica una estrazione chimica degli antigeni gruppo specifici degli streptococchi mediante reagenti sviluppati specificatamente 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. L'estratto neutralizzato può essere facilmente identificato usando le particelle di lattice blu a cui sono legate le immunoglobuline specifiche e purificate di coniglio.

Le particelle di lattice agglutinano con decisione in presenza di antigeni omologhi e non agglutinano quando gli antigeni non sono presenti.

### REAGENTI

Ogni kit consente l'effettuazione di 60 test per il gruppaggio degli streptococchi. Il materiale fornito è pronto per l'uso.

- Latex Suspension (sospensione di particelle di lattice): 6 fiale, ognuna contenente 3.0 ml di particelle di lattice blu a cui sono legati anticorpi purificati di coniglio per i gruppi A, B, C, D, F e G degli streptococchi. Le particelle di lattice blu sono sospese in un tampone fosfato a pH 7.4, contenente 0.098% di sodio azide come conservante.
- Polyvalent Positive Control (controllo positivo polivalente): 1 fiala contenente 2 ml di antigene polivalente pronto per l'uso estratto da streptococchi inattivati di gruppo A, B, C, D, F e G di Lancefield. Gli antigeni sono sospesi in un tampone fosfato a pH 7.4, contenente 0.098% di sodio azide come conservante.
- Extraction Reagent 1 (reattivo di estrazione 1): un flacone con contagocce contenente 3.2 ml del reagente di estrazione n°1 con 0.98% di sodio azide come conservante.
- Extraction Reagent 2 (reattivo di estrazione 3): un flacone con contagocce contenente 3.2 ml del reagente di estrazione n°2.
- Extraction Reagent 3 (reattivo di estrazione 3): 2 flaconi con contagocce contenenti ciascuno 8 ml del reagente di estrazione n°3 con 0.98% di sodio azide come conservante.
- Cards per l'esecuzione del test
- Bastoncini per mescolare
- Istruzioni per l'uso

**Tutti i componenti del kit sono disponibili separatamente:**

<b>Blue Latex Suspension Group A</b>	<b>PL031</b>
<b>Blue Latex Suspension Group B</b>	<b>PL032</b>
<b>Blue Latex Suspension Group C</b>	<b>PL033</b>
<b>Blue Latex Suspension Group D</b>	<b>PL034</b>
<b>Blue Latex Suspension Group F</b>	<b>PL035</b>
<b>Blue Latex Suspension Group G</b>	<b>PL036</b>
<b>Extraction Reagent 1</b>	<b>PL037</b>
<b>Extraction Reagent 2</b>	<b>PL038</b>
<b>Extraction Reagent 3</b>	<b>PL039</b>
<b>Polyvalent Positive Control</b>	<b>PL040</b>
<b>Mixing Sticks</b>	<b>PL091</b>
<b>Latex Reaction Cards</b>	<b>PL092</b>

**MATERIALE RICHIESTO E NON FORNITO**

- Anse per inoculazione o ago
- Pipette pasteur
- Cuvette da 12 x 75 mm
- Timer

**STABILITÀ E CONSERVAZIONE**

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

**AVVERTENZE**

1. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.
2. Alcuni reagenti contengono sodio azide, che può reagire in modo esplosivo con il rame e il piombo se lasciato accumulare. Sebbene la quantità di sodio azide nei reagenti sia minima, dovrebbe essere usata molta acqua qualora i reagenti fossero versati nel lavandino.
3. I reagenti di estrazione contengono sostanze corrosive. In caso di contatto con la pelle, lavare immediatamente con sapone e molta acqua; sciacquare abbondantemente (almeno per 15 minuti) con acqua in caso di contatto con gli occhi.
4. È opportuno seguire appropriate misure di sicurezza nel maneggiare, processare ed eliminare tutti i campioni clinici in quanto potrebbero essere presenti organismi patogeni. Tutti i reagenti devono essere considerati potenzialmente infettivi durante e dopo l'uso e devono essere 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 specificate in queste istruzioni.
7. Questi reagenti contengono materiali di origine animale e devono essere maneggiati come un potenziale vettore e trasmettitore della malattia.

**PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE DELLE COLTURE**

Per le procedure specifiche riguardanti il campionamento e la preparazione delle colture primarie riferirsi ad un manuale di normali tecniche microbiologiche. Generalmente si utilizza per il test una coltura fresca di 18-24 ore cresciuta su agar sangue. Per il gruppaggio, dovrebbero essere sufficienti da una a quattro grosse colonie; in ogni caso, se le colonie sono piccole, utilizzare un numero maggiore di colonie.

**PROCEDIMENTO**

Tutti i componenti del kit devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'uso.

1. Risospingere il reagente al lattice capovolgendo delicatamente il flacone contagocce più volte. Esaminare il flacone contagocce per assicurarsi che le particelle di lattice siano correttamente risospese prima dell'uso. Non utilizzare se il lattice non riesce a risospendersi.
2. Siglare una provetta per ogni campione.
3. Aggiungere 1 goccia del Reagente di estrazione 1 in ogni provetta.  
Selezionare 1-4 colonie  $\beta$ -emolitiche con un'ansa o un ago sterile e sospenderle nel Reagente di estrazione 1. Se le colonie sono piccole, prenderne alcune ben isolate e aggiungerne fino ad ottenere una sospensione torbida. In tutti i casi le colonie devono essere prelevate da un'area della piastra che presenta la minima contaminazione da parte di altre colonie batteriche.
4. Aggiungere una goccia di Reagente di estrazione 2 ad ogni provetta.
5. Mescolare la soluzione tappando il tubo con un dito per 5-10 secondi.
6. Aggiungere 5 gocce del Reagente di estrazione 3 ad ogni provetta e mescolare come al punto 5.
7. Porre una goccia di ciascuna sospensione di lattice blu nei diversi cerchi sulla Card.
8. Usando una pipetta Pasteur, porre una goccia dell'estratto accanto ad ogni goccia della sospensione di lattice.
9. Miscelare il lattice blu e l'estratto con i bastoncini forniti, distribuendo su tutta l'area delimitata dalla circonferenza. Per ogni reagente deve essere utilizzato un nuovo bastoncino.
10. Far oscillare la Card in modo tale che la soluzione fluisca lentamente lungo tutto il cerchio.
11. Dopo 1 minuto osservare la presenza di agglutinazione.

**PROCEDURE DI CONTROLLO QUALITÀ**

Le normali procedure di controllo di qualità per ogni kit di Prolex™ implicano il controllo di tutti i componenti del kit (la sospensione di lattice blu, il controllo positivo polivalente e i reagenti di estrazione) mediante estratti di streptococchi di ogni gruppo (A, B, C, D, F, e G) usando ceppi ATCC elencati in questa sezione. L'estratto da questi ceppi agglutina con il reagente al lattice omologo. Il controllo positivo polivalente è utilizzato per testare i singoli reagenti al lattice.

Organismo	Gruppo di Lancefield	Referenza
-----------	----------------------	-----------

<i>Streptococcus pyogenes</i>	<b>Gruppo A</b>	ATCC 19615
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<b>Gruppo B</b>	ATCC 12386
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis</i>	<b>Gruppo C</b>	ATCC 12388
<i>Enterococcus faecalis</i>	<b>Gruppo D</b>	ATCC 19433
<i>Streptococcus sp. Tipo 2</i>	<b>Gruppo F</b>	ATCC 12392
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis</i>	<b>Gruppo G</b>	ATCC 12392

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

**Risultati positivi:** un'aggregazione rapida ed intensa delle particelle di lattice blu di uno solo dei reagenti indica una identificazione specifica del ceppo di streptococco. Se si ottiene una debole reazione per un singolo reagente, ripetere il test usando un inoculo più pesante. Il test così ripetuto è considerato positivo se si osserva una agglutinazione visibile con uno solo dei reagenti. La figura 1 illustra uno schema per il gruppaggio degli streptococchi.

**Risultati negativi:** nessuna agglutinazione visibile delle particelle di lattice blu. Anche se si osservano tracce di agglutinazione il test deve essere considerato negativo.

**Risultato dubbio:** debole aggregazione o reazione non specifica (viscosità), presente nel cerchio di prova dopo 20 secondi, il test deve essere ripetuto utilizzando una subcoltura fresca. Se si ottiene lo stesso risultato anche dopo la seconda prova, dovrebbe essere utilizzato un test biochimico per identificare l'isolato.

**Risultato non interpretabile:** in rare occasioni si può vedere agglutinazione con più di un gruppo. In questo caso si prega di verificare la purezza della cultura utilizzata per eseguire il test. Se sembra pura, ripetere il test e confermare l'identificazione del campione isolato con test biochimici.

### LIMITI DEL METODO

1. Falsi negativi e falsi positivi possono avvenire se il kit non viene utilizzato in modo appropriato o se viene usata una quantità insufficiente di coltura per l'estrazione.
2. Il kit è adatto all'identificazione degli streptococchi  $\beta$ -emolitici. Se vengono identificati streptococchi  $\alpha$  o non-emolitici, è necessario confermare il risultato 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, 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 quali gruppo D mediante il test della bile-esculina. Alcuni ceppi di *Enterococcus faecium* e *Streptococcus bovis* possono essere difficili da identificare.
5. *Listeria monocytogenes* può cross-reagire con i Streptococcal latex reagent del gruppo B e/o del gruppo G, dato che *L. monocytogenes* esibisce una antigenicità simile al gruppo B e G degli streptococchi. 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 come aiuto ulteriore per il differenziamento.
6. Alcuni ceppi di *Streptococcus milleri* (*Streptococcus anginosus*) tipicamente non-emolitico possiedono antigeni A, C, F o G e possono dare reazione positiva con i reagenti al lattice Strep A, C, F o G. La morfologia delle colonie su agar sangue e test biochimici possono essere utilizzati per identificare questi organismi.

### PERFORMANCE DEL METODO

#### A. Studi di cross-reattività:

Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit è stato testato per la cross-reattività con 33 ceppi ATCC di riferimento. Il kit ha individuato 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 organismi non-streptococchi (n=10).

#### B. Studi clinici:

1. Il kit Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit è stato valutato nell'ambito di un confronto tra cinque kit di gruppaggio dello streptococco disponibili in commercio. Lo studio è stato condotto da S. Davies et. al. presso l'Ospedale Northern General a Sheffield, in Inghilterra. Tutti i kit sono stati provati con un pannello di 302 streptococchi beta-emolitici composto da 64, 67, 44, 55, 56 e 4 ceppi di gruppi Lancefield A, B, C, D, G e F, rispettivamente. I risultati hanno mostrato che 12 dei ceppi non sono stati identificati con nessuno dei kit testati. Dei restanti 290 ceppi il Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit ne ha correttamente identificati 286 (98,6%). Gli autori hanno concluso che il Kit si è rivelato accurato e rapido, con una sensibilità e specificità del 99% e 100% rispettivamente. Inoltre, il tempo medio di agglutinazione è sostanzialmente inferiore a quello ottenuto con tre degli altri quattro kit valutati. 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 (pirrolidonil-aminopeptidasi test). Le colture primarie sono state

parallelamente testate usando il Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit e un kit alternativo. In questo studio, è stata riscontrata una concordanza del 99% tra i risultati ottenuti con Prolex™ e con il metodo di Lancefield (109 su 110 colonie), mentre tra il kit alternativo e il metodo di Lancefield è stata riscontrata una concordanza del 96.3% (106 su 110). Le 110 culture primarie usate nello studio comprendevano 15 gruppo A, 40 gruppo B, 13 gruppo C, 4 gruppo D, 11 gruppo F, 12 gruppo G e 15 ceppi non raggruppabili.

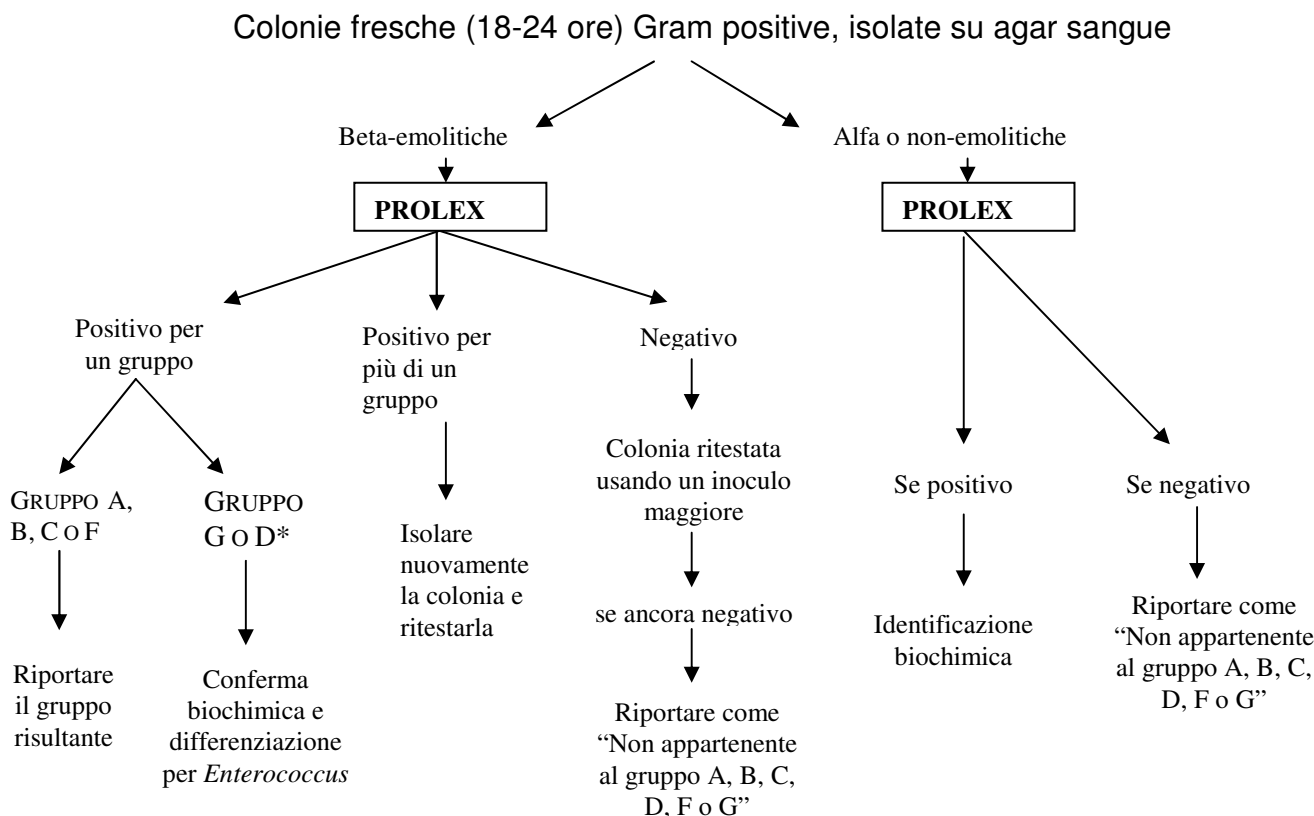
**BIBLIOGRAFIA**

- 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.
- EL Kholy, A., Wannamaker, L.W. and Krause, R.M. (1974). Simplified Extraction Procedure for Serological Grouping of Beta-Hemolytic Streptococci. *Appl. Microbiol.*, 28, 836.
- Elliot, S.D. and Tai, J.Y. (1978). The Type-Specific Polysaccharides of Streptococcus suis. *J. Exp.Med.*,148, 1699.
- 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.
- Facklam R.R. (1977). Physiological Differentiation of Viridans Streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, 5, 184.
- Fuller, A.T. (1938). The Formamide Method for the Extraction of Polysaccharides from Haemolytic Streptococci. *Brit. J. Exp. Path.*, 19, 130.
- Maxted, W.R. (1948). Preparation of Streptococcal Extracts for Lancefield Grouping. *Lancet*, ii, 255.
- Nowlan, S.S. and Deibel, R.H. (1967). Group Q Streptococci. I. Ecology, Serology, Physiology and Relationships to Established Enterococci. *J. Bact.*, 94, 291.
- Petts, D.N. (1984). Early Detection of Streptococci in Swabs by Latex Agglutination Before Culture. *J. Clin. Microbiol.*, 19, 432.
- Rantz, L.A. and Randall, E. (1955). Use of Autoclaved Extracts of Haemolytic Streptococci for Serological Grouping. *Stanford Med. Bull.*, 13, 290.
- 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.




**CONFEZIONE**

**17PL030 PROLEX™ STREPTOCOCCAL GROUPING LATEX KIT (6 X 60 test)**







**Figura 1: SCHEMA SUGGERITO PER IL GRUPPAGGIO DEGLI STREPTOCOCCHI**



\* 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].

<p>PL.037</p>	 <p><b>Avvertimento:Componenti pericolosi: nitrito di sodio</b> Nocivo per ingestione. Altamente tossico per gli organismi acquatici.</p> <p>Non disperdere nell'ambiente. Non mangiare, bere o fumare durante l'uso. Lavare accuratamente le mani dopo averlo maneggiato. Raccogliere la fuoriuscita. <b>IN CASO DI INGESTIONE:</b> contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico in caso di malessere. Smaltire il prodotto e il recipiente secondo tutte le normative locali, regionali, nazionali e internazionali.</p>
<p>PL.038</p>	 <p><b>Pericolo: Componenti pericolosi: cido acetico</b> Può essere corrosivo per i metalli. Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.</p> <p>Indossare guanti protettivi. Indossare le protezioni per gli occhi o il viso: si raccomandano occhiali protettivi con protezioni laterali. Indossare indumenti protettivi: si consiglia il camice da laboratorio. Conservare soltanto nei contenitori originali. <b>IN CASO DI INALAZIONE:</b> trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. <b>IN CASO DI INGESTIONE:</b> contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Non provoca il vomito. <b>IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE</b> (o con i capelli): Togliersi immediatamente gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle con acqua o fare una doccia. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. <b>IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI:</b> Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Smaltire il prodotto e il recipiente secondo tutte le normative locali, regionali, nazionali e internazionali.</p>
<p>PL.039</p>	 <p><b>Avvertimento</b> Provoca grave irritazione oculare. Provoca irritazione cutanea.</p> <p>Indossare guanti protettivi. Indossare le protezioni per gli occhi o il viso: si raccomandano occhiali protettivi con protezioni laterali. Lavare accuratamente le mani dopo averlo maneggiato. <b>IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI:</b> sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Rimuovere le lenti a contatto, se presenti ed è agevole farlo. Continuare a sciacquare.</p>

**LEGENDA**

	Per esclusivo uso diagnostico in vitro
	Lotto di fabbricazione
	Codice di catalogo
	Intervallo di temperatura per la conservazione
	Data di scadenza (anno – mese)
	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
	Consultare le istruzioni operative
	Produttore

**Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit è prodotto in Canada da Pro-Lab, Inc.**  
**Ultima revisione ProLab: giugno 2015**



**CND W0105011101**