

SET DE REACTIVOS DE EXTRACCIÓN PROLEX™

(para uso en Diagnóstico *in vitro*)



REF PL.046 REF PL.047 REF PL.048 REF PL.049

INSTRUCCIONES DE USO

USO PREVISTO

El conjunto de reactivos de extracción Prolex™, cuando se usa en combinación con los Reactivos de látex de determinación de grupos estreptocócicos látex Prolex™ aporta una plataforma rápida para la identificación serológica de estreptococos beta-hemolíticos pertenecientes a los grupos de Lancefield A, B, C, D, F y G.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Estudios clínicos, epidemiológicos y microbiológicos han demostrado de forma concluyente que el diagnóstico de las infecciones estreptocócicas basado en los síntomas clínicos exige siempre verificación microbiológica⁴. Los estreptococos beta-hemolíticos son los patógenos humanos aislados con más frecuencia entre los representantes del género *Streptococcus*. Casi todos los estreptococos beta-hemolíticos poseen antígenos carbohidratos específicos (antígenos del grupo estreptocócico). Lancefield demostró que estos antígenos pueden extraerse en forma soluble e identificarse mediante reacciones de precipitación con antisueños homólogos. Actualmente se utilizan diferentes procedimientos para la extracción de los antígenos estreptocócicos^{1,2,6,7,10,11}. El método de determinación de grupos estreptocócicos Prolex™ se basa en la liberación de antígenos específicos de las paredes celulares de las bacterias mediante extracción por ácido nitroso modificado. El antígeno extraído conjuntamente con la aglutinación de látex ofrece un método rápido, sensible y específico para la identificación de los grupos estreptocócicos A, B, C, D, F y G a partir de placas de cultivo primarias.

PRINCIPIO DEL TEST

El método de Determinación de Grupos Estreptocócicos Prolex™ conlleva la extracción química de antígenos carbohidratos específicos de grupo usando reactivos de extracción de ácido nitroso desarrollados especialmente. Los Reactivos de Extracción 1 y 2 facilitados en el kit contienen una sustancia química capaz de extraer los antígenos específicos del grupo estreptocócico a temperatura ambiente. El reactivo 3 de extracción contiene una solución neutralizadora. Los extractos neutralizados pueden identificarse fácilmente usando partículas de látex de poliestireno azul sensibilizadas con inmunoglobulinas de conejo purificadas específicas de grupo. Estas partículas de látex azul se aglutinan muy fuertemente en presencia del antígeno homólogo y no se aglutinan cuando el antígeno homólogo está ausente.

MATERIALES SUMINISTRADOS

Cada conjunto contiene reactivos suficientes para 150 extracciones, idóneas para tipificar usando los Reactivos de Látex Estreptocócicos Prolex™ PL.031, PL.032, PL.033, PL.034, PL.035 o PL.036. Los materiales se suministran listos para usar.

- Reactivo de Extracción 1 (PL.047): Un frasco gotero con 8.0 ml del reactivo de extracción modificado con azida sódica al 0.098% como conservante.
- Reactivo de Extracción 2 (PL.048): Un frasco gotero con 8.0 ml de reactivo de extracción modificado.
- Reactivo de Extracción 3 (PL.049): Un frasco gotero con 8.0 ml del reactivo de extracción modificado con azida sódica al 0.098% como conservante.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Reactivos de Látex (PL.031 - PL.036): Cada frasco gotero contiene 3.0 ml de partículas de látex azul revestidas con anticuerpos de conejo purificados frente a los grupos de Lancefield A, B, C, D, F o G. Las partículas de látex azul están suspendidas en un tampón de pH 7.4 que contiene azida sódica al 0.098% como conservante.
- Control Positivo Polivalente (PL.040): Frasco gotero con 2.0 ml de antígenos polivalentes listos para usar extraídos de estreptococos inactivados de los grupos de Lancefield A, B, C, D, F y G. Los antígenos están suspendidos en un tampón con azida sódica al 0.098% como conservante.
- Tarjetas de Test
- Palillos de Mezcla
- Asa o aguja de inoculación
- Pipetas de Pasteur
- Tubos de ensayo de 12 mm x 75 mm
- Temporizador

ESTABILIDAD Y CONSERVACIÓN

Todos los componentes del kit deben conservarse a 2-8 °C. **No congelar.** Los reactivos conservados en estas condiciones permanecerán estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta del producto.
- Algunos reactivos contienen una pequeña cantidad de azida sódica. La azida sódica puede reaccionar explosivamente con las tuberías de cobre o plomo si se permite que se acumule. Aunque la cantidad de azida sódica en los reactivos es mínima, debe utilizarse una gran cantidad de agua si se eliminan los restos de reactivos por el desagüe.
- Deben tomarse precauciones universales al manipular, procesar y desechar todas las muestras clínicas. Todos los materiales del test deben considerarse potencialmente infecciosos durante y después de su uso, y deben manipularse y desecharse de forma adecuada.
- Para obtener resultados válidos deben seguirse los procedimientos, condiciones de conservación, precauciones y limitaciones especificadas en estas instrucciones de uso.
- Para conocer los peligros y las precauciones, consulte los pictogramas de la etiqueta y la información que se proporciona en la tabla siguiente. Consulte la ficha de datos de seguridad en www.pro-lab.com.

PL.047	 Atención Ingrediente peligroso: Nitrito de Sodio, Metanol Nocivo en caso de ingestión (H302). Lavarse manos y la piel expuesta concienzudamente tras la manipulación (P264). Eliminar el contenido/el recipiente De conformidad con la normativa local (P501).
PL.048	 Peligro Ingrediente peligroso: Ácido Acético Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves (H314). No respirar los vapores/la niebla (P260). Llevar gafas/guantes/prendas de protección (P280). EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagar la boca. NO provocar el vómito (P301+P330+P331). EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente toda la ropa contaminada. Enjuagar la piel con agua (P303+P361+P353). EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado (P305+P351+P338). Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico (P310). Eliminar el contenido/el recipiente De conformidad con la normativa local (P501).

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA Y PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS

Para procedimientos específicos sobre la recogida y preparación de las muestras de los cultivos primarios, véase un libro de texto estándar de microbiología. Debe utilizarse un cultivo nuevo (18-24 horas) en agar sangre. De una a cuatro

colonias grandes deben ser suficientes para la determinación del grupo; sin embargo, si las colonias son pequeñas, debe usarse un número mayor de colonias (un asa llena).

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Todos los componentes deben estar a temperatura ambiente antes de su uso.

1. Resuspenda los reactivos de látex de prueba invirtiendo suavemente los frascos goteros para asegurar que las partículas de látex estén adecuadamente suspendidas antes del uso. No usar si no es posible resuspender las partículas de látex.
2. Marcar un tubo de ensayo para cada aislado que se vaya a estudiar.
3. Añadir 1 gota del reactivo de extracción 1 a cada tubo.
4. Seleccionar 1-4 colonias beta-hemolíticas usando un asa o aguja desechable y suspenderlas en el reactivo de extracción 1. Si las colonias son pequeñas, tomar varias colonias bien aisladas para estudiar, de modo que la solución de reactivo de extracción 1 pase a ser turbia. En todos los casos, las colonias estreptocócicas deben tomarse de un área que permitirá la menor probabilidad de contaminación con otro organismo.
5. Añadir 1 gota del reactivo de extracción 2 a cada tubo.
6. Mezclar la reacción golpeando suavemente el tubo con un dedo durante 5-10 segundos.
7. Añadir 1 gota del reactivo de extracción 3 a cada tubo y mezclar golpeando suavemente el tubo con un dedo durante 5-10 segundos.
8. Dispensar una gota de cada reactivo de látex de grupo en círculos separados en tarjetas separadas marcada con cada aislado que se estudia.
9. Utilizando una pipeta de Pasteur, poner una gota de extracto para cada prueba junto a cada gota de reactivo de látex.
10. Mezclar el látex y el extracto con los palillos suministrados, usando el área completa de los círculos. Debe utilizarse un nuevo palillo con cada círculo de test.
11. Balancear suavemente las tarjetas, permitiendo que la mezcla fluya lenta-mente sobre la superficie entera del círculo de reacción.
12. Observar si se produce aglutinación durante hasta un minuto.

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

El procedimiento rutinario de control de calidad de cada lote Prolex™ conlleva la el estudio del látex y los reactivos de extracción con cada grupo estreptocócico A, B, C, D, F y G usando las cepas ATCC o equivalentes, como se indica en esta sección. El extracto de estas cepas se aglutinará con el reactivo de látex homólogo. Se usa el control positivo polivalente para estudiar los reactivos de látex individuales.

Organismo	Grupo de Lancefield	Referencia
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Grupo A	ATCC 19615
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Grupo B	ATCC 12386
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis</i>	Grupo C	ATCC 12388
<i>Enterococcus faecalis</i>	Grupo D	ATCC 19433
<i>Streptococcus sp. Tipo 2</i>	Grupo F	ATCC 12392
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis</i>	Grupo G	ATCC 12394

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Resultado positivo: La aglutinación fuerte rápida de las partículas de látex azul en un minuto con uno de los reactivos de látex indica la identificación específica del aislado estreptocócico. Una reacción débil con un reactivo de látex único debe repetirse con un inóculo más grande. La prueba repetida se considera positiva si se produce aglutinación con sólo uno de los reactivos de látex. La Figura 1 ilustra un esquema sugerido para la determinación de los grupos de estreptococos.

Resultado negativo: Ninguna aglutinación de las partículas de látex. Si se ven trazas de granulación en el círculo de reacción, la prueba debe considerarse también como negativa.

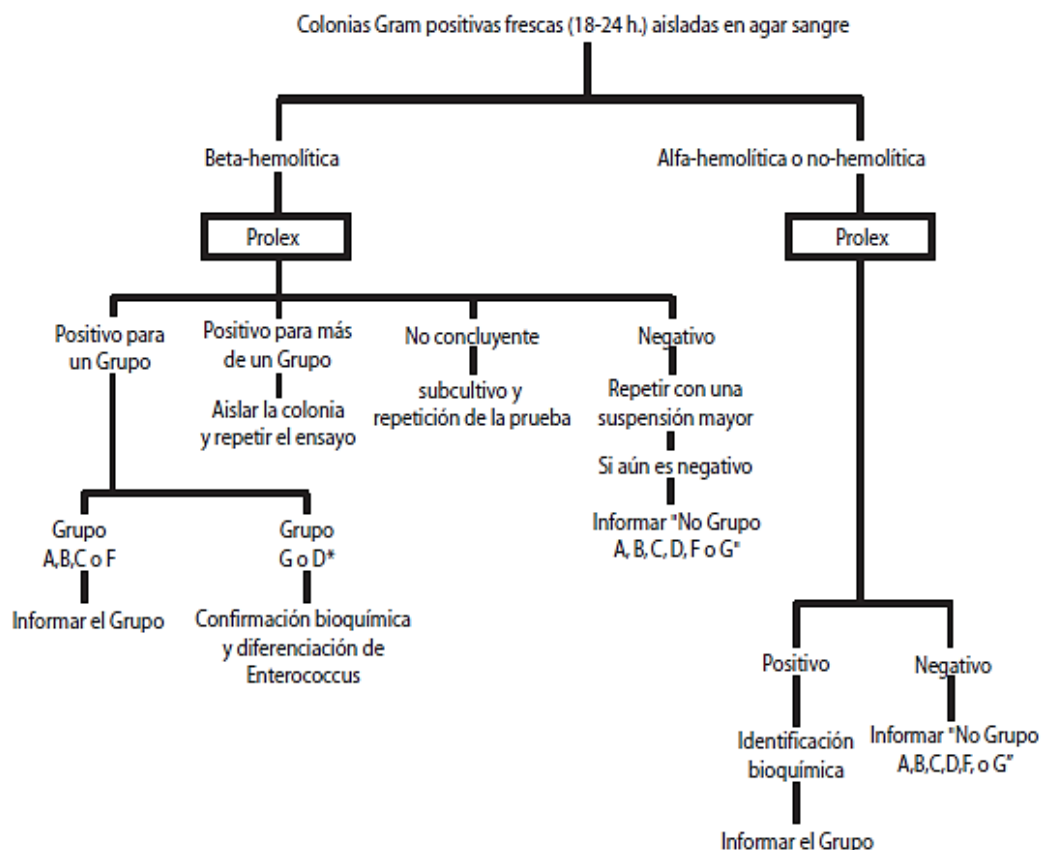
Resultado no concluyente: Si se observa agrupación débil o una reacción no específica (filamentos) en el círculo de reacción después de un minuto, debe repetirse la prueba con un subcultivo nuevo. Si se observa el mismo resultado después de repetir el test, debe realizarse un test bioquímico para identificar el aislado.

Resultado inespecífico: En raras ocasiones, puede ver aglutinación con más de un grupo. Si esto ocurre, compruebe la pureza del cultivo empleado para realizar la prueba. Si parece puro, repita la prueba y confirme la identificación del aislado con pruebas bioquímicas.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Pueden producirse falsos negativos y falsos positivos si el kit no se utiliza según lo indicado y si se utiliza una cantidad de cultivo indebida para la extracción.
2. El kit está pensado para uso exclusivo en la identificación de estreptococos beta-hemolíticos. Si se estudian estreptococos no hemolíticos, la identificación debe confirmarse mediante pruebas bioquímicas^{5, 9} (Consulte el esquema sugerido para la determinación de los grupos de los estreptococos).
3. Se sabe que se han producido reacciones falsas positivas con organismos de géneros no relacionados, p. ej., *Escherichia coli*, *Klebsiella* o *Pseudomonas*^{3,8}. Es probable que aglutinen de forma inespecífica todos los reactivos de látex.
4. Se ha observado que algunas cepas de estreptococos de grupo D reaccionan de forma cruzada con antisueros de grupo G; estas cepas pueden confirmarse como grupo D mediante la prueba de bilis-esculina. Podría resultar difícil agrupar algunas cepas de *Enterococcus faecium* y *Streptococcus bovis*.
5. *Listeria monocytogenes* puede reaccionar de forma cruzada con los reactivos de látex estreptocócicos de grupos B y G. Puede realizarse la prueba de catalasa para distinguir entre *Listeria*, que son catalasa positivas y estreptococos, que son catalasa negativos. Pueden realizarse tinción de Gram y pruebas de motilidad como adyuvantes para la diferenciación.
6. Algunas cepas de *Streptococcus milleri* (*Streptococcus anginosus*) normalmente no hemolíticas poseen antígenos A, C, F o G y producirán una reacción positiva con reactivos de látex Strep A, C, F o G. Deben utilizarse pruebas bioquímicas y de morfología en agar sangre para identificar estos organismos.

Figura 1. ESQUEMA SUGERIDO PARA IDENTIFICAR EL GRUPO DE ESTREPTOCOS



* Algunas cepas de Grupo D han mostrado reacción cruzada con antisuero de Grupo G.
[Harvey, C. L. and McIlmurray, M.B (1984) Eur. J. Clinical Microbiol,10,641].

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

A. Estudios de reactividad cruzada:

El Kit de Determinación de Grupos Estreptocócicos con Látex Prolex™ ha sido estudiado en cuanto a reactividad cruzada usando 33 cepas de referencia de ATCC. El kit identificó satisfactoriamente los grupos de todos los

estreptococos que contenían los grupos de Lancefield A, B, C, D, F y G (N=16). No se observó reactividad cruzada durante la prueba de otras cepas estreptocócicas (n = 8) ni con otros organismos no estreptocócicos (n=10).

B. Estudios de rendimiento clínico:

1. El Kit de Determinación de Grupos Estreptocócicos con Látex Prolex™ se ha evaluado como parte de una comparación de cinco kits de determinación de grupos estreptocócicos disponibles comercialmente. El estudio fue realizado por S. Davies et. al. en el Northern General Hospital de Sheffield, Inglaterra. Todos los kits se expusieron a un panel de 302 estreptococos beta-hemolíticos compuesto de 64, 67, 44, 55, 56 y 4 cepas de los grupos de Lancefield A, B, C, D, G y F, respectivamente. Los resultados demostraron que 12 de las cepas no se pudieron agrupar con ninguno de los kits estudiados. De las restantes 290 cepas, el Kit Prolex™ de identificación de grupos estreptocócicos en látex identificó correctamente 286 (98.6%). Los autores concluyeron que el Kit Prolex™ de identificación de grupos estreptocócicos con látex demostró ser exacto y rápido, con una sensibilidad y especificidad del 99% y el 100%, respectivamente. Además, el promedio de tiempo hasta la aglutinación fue sustancialmente menor que el alcanzado por tres de los otros cuatro kits evaluados. Datos disponibles bajo pedido.
2. Se realizó un segundo estudio de rendimiento en un Centro de Salud en Ontario, Canadá. En este estudio, se incluyeron 111 cultivos primarios (110 estudiados, 1 inadecuado). Todas las cepas fueron agrupadas originalmente mediante reacciones de precipitación de Lancefield. Todos los estreptococos de grupo D fueron confirmados aún más bioquímicamente usando un protocolo de ensayo de BE (bilis-esculina) y PY (Pirrolidónil aminopeptidasa). Los cultivos principales se estudiaron en paralelo usando el Kit Prolex™ de identificación de grupos estreptocócicos con látex y un kit alternativo de detección de grupos. En este estudio, la concordancia global entre los resultados con Prolex™ y Lancefield se produjo con 109 de 110 aislados estudiados (99%), mientras que se produjo concordancia global entre el kit alternativo y los resultados de Lancefield con 106 de 110 aislados estudiados (96.3%). Los 110 aislados primarios empleados en este estudio incluyeron 15 cepas de grupo A, 40 de grupo B, 13 de grupo C, 4 de grupo D, 11 de grupo F, 12 de grupo G y 15 cepas no agrupables.

DISPONIBILIDAD

N.º Cat	Descripción
PL.031	Reactivo de Látex de Grupo A
PL.032	Reactivo de Látex de Grupo B
PL.033	Reactivo de Látex de Grupo C
PL.034	Reactivo de Látex de Grupo D
PL.035	Reactivo de Látex de Grupo F
PL.036	Reactivo de Látex de Grupo G
PL.040	Control Positivo Polivalente
PL.091P	Palillos de Mezcla
PL.092-48	Tarjetas de Test

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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-Hemolytic Streptococci. Appl. Microbiol., 23, 285.
2. 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.
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.

GLOSARIO DE SÍMBOLOS

	Fabricante
	Fecha de caducidad
	Número de lote
	Número de catálogo
	Límite de temperatura
	Consulte las instrucciones de uso electrónicas
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Contiene suficiente cantidad para <n> pruebas
	Indica conformidad europea
	Indica conformidad con el Reino Unido
	Representante autorizado
	Persona responsable del Reino Unido

UKRP Pro-Lab Diagnostics U.K.
 3 Bassendale Road,
 Bromborough, Wirral,
 Merseyside CH62 3QL
 United Kingdom
 Tel.: 0151 353 1613
 www.pro-lab.co.uk
 E-mail: uksupport@pro-lab.co.uk

 **Pro-Lab Diagnostics Canada**
 20 Mural Street, Unit #4
 Richmond Hill, Ontario
 L4B 1K3
 Canada
 Tel.: 905-731-0300
 www.pro-lab.com
 E-mail: support@pro-lab.com

Pro-Lab Diagnostics U.S.A.
 1301 Blue Ridge Drive, Suite
 #101
 Georgetown, Texas 78626-3269
 United States
 Tel.: 512-832-9145
 www.pro-lab-direct.com
 E-mail: support@pro-lab.us

 Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Floor, Tower Street, Swatar, BKR 4013 Malta