

SET DI REAGENTI DI ESTRAZIONE PROLEX™

(per uso diagnostico *in vitro*)



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

ISTRUZIONI PER L'USO

IMPIEGO PREVISTO

Quando utilizzato in combinazione con i reagenti al lattice per il gruppaggio degli streptococchi Prolex™, il set di reagenti d'estrazione Prolex™ 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 microbiologico⁴. 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 metodo di gruppaggio degli streptococchi Prolex™ 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 specificatamente per una estrazione con acido nitroso modificato. I reagenti d'estrazione n° 1 e 2 forniti nel set contengono un composto chimico capace di estrarre gli antigeni specifici del gruppo di streptococchi 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 set contiene reagenti sufficienti per 150 estrazioni idonee alla tipizzazione con l'impiego dei reagenti al lattice per streptococchi Prolex™ PL.031, PL.032, PL.033, PL.034, PL.035 o PL.036. I materiali forniti sono pronti per l'uso.

- reagente di estrazione 1 (PL.047): un flacone con contagocce contenente 8,0 ml di reagente d'estrazione modificato con lo 0,098% di sodio azide come conservante.
- reagente di estrazione 2 (PL.048): un flacone con contagocce contenente 8,0 ml di reagente d'estrazione modificato.
- reagente di estrazione 3 (PL.049): un flacone con contagocce contenente 8,0 ml di reagente d'estrazione modificato con lo 0,098% di sodio azide come conservante.

MATERIALE NECESSARIO, MA NON FORNITO

- Reagenti al lattice (PL.031 - PL.036): 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 (PL.040): fiala con contagocce contenente 2.0 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.
- Schede di Prova
- Bastoncini di Miscelazione
- 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 congelare.** I reagenti conservati in queste condizioni resteranno stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta del prodotto.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.
- Non usare i reagenti oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.
- 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.
- 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.
- Per ottenere risultati attendibili, è necessario seguire scrupolosamente le procedure, le condizioni di conservazione, le precauzioni e le limitazioni descritte in queste istruzioni.
- Per i pericoli e le precauzioni, fare riferimento ai pittogrammi riportati sull'etichetta e alle informazioni fornite nella tabella sottostante. Consultare la Scheda di sicurezza all'indirizzo www.pro-lab.com.

PL.047	 Attenzione Ingrediente pericoloso: Nitrito di sodio, Metanolo Nocivo se ingerito (H302). Lavare con cura mani e viso dopo la manipolazione (P264). Smaltire i contenuti/contenitori in conformità alle normative locali (P501).
PL.048	 Pericolo Ingrediente pericoloso: Acido acetico Provoca gravi ustioni cutanee e danni agli occhi (H314). Non respirare nebbie/vapori (P260). Indossare occhiali protettivi, guanti protettivi, indumenti protettivi (P280). IN CASO DI INGESTIONE: Sciacquare la bocca. NON provocare il vomito (P301+P330+P331). IN CASO DI CONTATTATO CON LA PELLE (o con i capelli): Togliere di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle con acqua (P303+P361+P353). IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare (P305+P351+P338). Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI / un medico (P310). Smaltire i contenuti/contenitori in conformità alle normative locali (P501).

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 capovolgendo delicatamente i flaconi con contagocce per consentire la corretta sospensione delle particelle di lattice prima dell'uso. Non utilizzare se il lattice non risulta risospeso.

Revisione: 2026 03

2. Siglare 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 1 goccia 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.

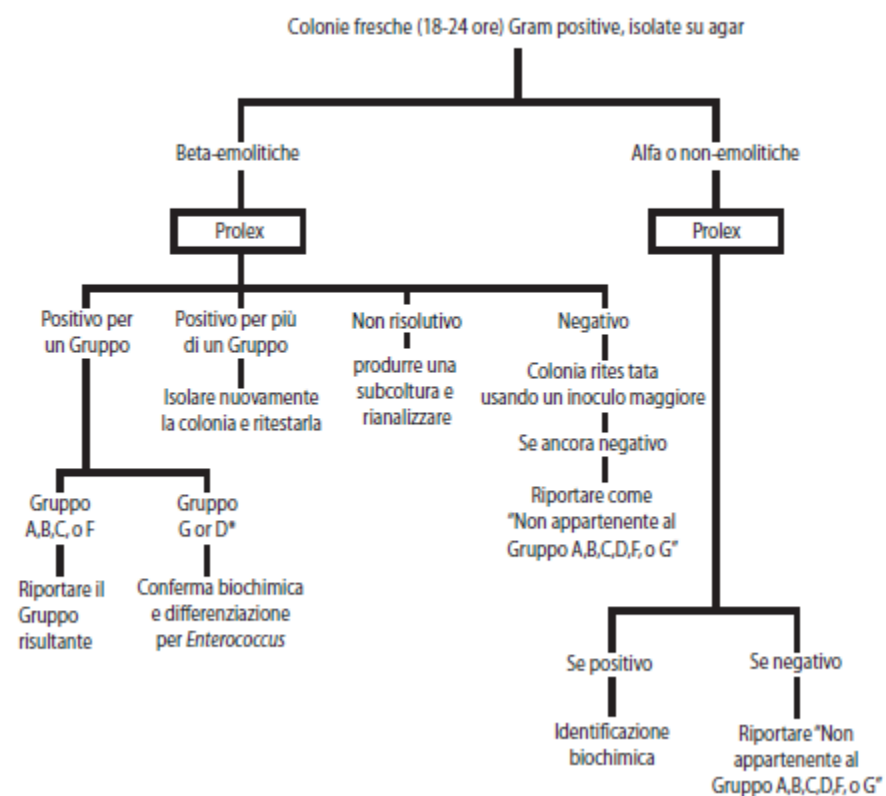
Risultato aspecifico: In rari casi potrebbe riscontrarsi agglutinazione in più di un gruppo. In questo caso si consiglia di verificare la purezza della coltura utilizzata per eseguire il test. Se sembra pura, ripetere il test e verificare l'identificazione dell'isolato con strumenti biochimici.

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.

- 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*.
- 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.
- 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.

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].

PERFORMANCE DEL METODO

A. Studi di cross-reattività:

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:

- 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.

- 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 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.

DISPONIBILITÀ

N. Cat	Descrizione
PL.031	Reagente al Lattice Gruppo A
PL.032	Reagente al Lattice Gruppo B
PL.033	Reagente al Lattice Gruppo C
PL.034	Reagente al Lattice Gruppo D
PL.035	Reagente al Lattice Gruppo F
PL.036	Reagente al Lattice Gruppo G
PL.040	Controllo Positivo Polivalente
PL.091P	Bastoncini di Miscelazione
PL.092-48	Schede di Prova

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

GLOSSARIO DEI SIMBOLI

	Produttore
	Data di scadenza
	Codice di lotto
	Numero di catalogo
	Limite di temperature
	Consultare le istruzioni per l'uso in formato elettronico
	Dispositivo medico diagnostico in vitro
	Quantità sufficiente per (n) test
	Marchio CE (Conformità europea)
	Marchio UKCA (Conformità Regno Unito)
	Rappresentante autorizzato
	Persona responsabile nel Regno Unito

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