

#### USO PROPUESTO

El kit Prolex™ Streptococcal-Select Grouping Latex Kit proporciona un método rápido para la identificación serológica de los grupos A, B, C, D, F y G de los grupos de Lancefield de los estreptococos en crecimiento en placas de agar.

#### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los estudios clínicos, epidemiológicos y microbiológicos han mostrado concluyentemente que el diagnóstico de las infecciones estreptocócicas basadas en síntomas clínicos siempre requieren verificación microbiológica (4). Los estreptococos beta-hemolíticos son los patógenos humanos más frecuentemente aislados entre los representativos del género Streptococcus. Casi todos los Streptococci beta-hemolíticos poseen carbohidratos antígenos específicos (antígenos de grupo estreptococales). Lancefield mostró que esos antígenos pueden ser extraer en forma soluble e identificar por reacciones de precipitación con antisueros homólogos. Actualmente están en uso diferentes procedimientos de extracción de los antígenos estreptocócicos (1,2,6,7,10,11). El kit Prolex™ Streptococcal-Select Grouping Latex Kit se basa en la liberación de los antígenos específicos de las paredes celulares de las bacterias, por extracción modificada de ácido nitroso. La extracción de los antígenos, en conjunción 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 de cultivos primarios en placa de agar.

#### PRINCIPIO DEL TEST

El método de identificación del kit Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit incluye la extracción química de los carbohidratos antígenos específicos, usando reactivos especialmente desarrollados para la extracción con ácido nitroso. Los reactivos de extracción 1 y 2 suministrados en el kit contienen sustancias químicas capaces de extraer a temperatura ambiente los antígenos estreptocócicos específicos de grupo. El reactivo de extracción 3 contiene una solución neutralizante. Los extractos neutralizados pueden ser identificados fácilmente usando partículas de látex azul sensibilizadas con inmunoglobulinas purificadas de conejo específicas para cada grupo. Estas partículas de látex azul aglutinan fuertemente en presencia del antígeno homólogo y no aglutinarán cuando el antígeno homólogo está ausente.

#### REACTIVOS

Cada kit es suficiente para 60 tests de identificación de grupos estreptocócicos. Los materiales son suministrados listos para su uso.

#### Componentes del kit

Reactivo de Extracción 1	PL.037
Reactivo de Extracción 2	PL.038
Reactivo de Extracción 3	PL.039
Control Positivo Polivalente	PL.040
Palillos de mezcla	PL.091
Tarjetas desechables para el test	PL.092-48

Control Positivo Polivalente ("Polyvalent Positive Control"): Un vial que contiene 2 ml de antígenos polivalentes listos para su uso, extraídos de estreptococos inactivados de los grupos A, B, C, D, F y G de Lancefield. Las cepas para la preparación de los antígenos son cepas ATCC listadas en la sección "MATERIALES PRECISADOS PERO NO SUMINISTRADOS".

Reactivo de Extracción 1: Un vial gotero que contiene 3,2 ml de reactivo de extracción 1 con 0,098% de azida sódica como preservante.

Reactivo de Extracción 2: Un vial gotero que contiene 3,2 ml de reactivo de extracción 2.

Reactivo de Extracción 3: Dos viales goteros que contienen 8 ml cada uno de reactivo de extracción 3 con 0,098% de azida sódica como preservante.

#### Componentes adicionales – Los clientes seleccionan seis viales de suspensión de látex para acompañar el Prolex™ Streptococcal-Select Grouping Latex Kit:

Suspensión de látex azul del Grupo A	PL.031
Suspensión de látex azul del Grupo B	PL.032
Suspensión de látex azul del Grupo C	PL.033
Suspensión de látex azul del Grupo D	PL.034
Suspensión de látex azul del Grupo F	PL.035
Suspensión de látex azul del Grupo G	PL.036

Suspensiones de Látex: Cada vial contiene 3,0 ml de partículas de látex azul recubiertas de anticuerpos purificados de conejo anti antígenos estreptocócicos del Grupo A, Grupo B, Grupo C, Grupo D, Grupo F o Grupo G. Las partículas de látex azul están suspendidas en tampón de pH 7,4 que contiene 0,098% de azida sódica como preservante.

#### PRECAUCIONES

- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta del producto.
- Algunos reactivos contienen azida sódica como preservante. ⚠ La azida sódica puede reaccionar explosivamente con el cobre y el plomo, si se producen acumulaciones. Aunque la cantidad de azida sódica en los reactivos es mínima, debe utilizarse una gran cantidad de agua cuando se eliminen los restos de reactivos por el desagüe.
- Los reactivos de extracción ⚠ contienen un agente cáustico. En caso de contacto con la piel, lavar inmediatamente la zona con jabón y grandes cantidades de agua. En caso de contacto con los ojos, enjuague de inmediato con agua abundante (al menos durante 15 min.)
- Se deben tomar medidas de seguridad como si un organismo patógeno estuviera presente, cuando se manipulen, procesen y eliminen todas las muestras clínicas.
- Este kit está destinado para un uso exclusivo en diagnóstico in vitro.
- Para obtener resultados válidos deben seguirse los procedimientos, condiciones de conservación, precauciones y limitaciones especificadas en estas instrucciones de uso.

#### ESTABILIDAD Y CONSERVACIÓN

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

#### RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA Y PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS

En general, debe utilizarse un cultivo fresco (18-24 horas) de agar sangre (5% de sangre de cordero) con un aislamiento Gram positivo, de colonias de estreptococos beta-hemolíticos. Procedimientos específicos de coleccionamiento de muestras y preparación de cultivos primarios, pueden ser consultados en un manual general de microbiología.

Se precisan de una a cuatro colonias para la identificación de los grupos; sin embargo, si las colonias son diminutas, debe usarse un número mayor de colonias (hasta completar un asa bacteriológica).

#### MATERIALES SUMINISTRADOS

Control positivo polivalente ("Polyvalent positive control") que contiene un extracto polivalente que presenta los antígenos de los grupos estreptocócicos A, B, C, D, F y G.

Reactivos de Extracción ("Extraction Reagents") 1, 2 y 3.

Tarjetas desechables con 10 círculos de reacción.

Palillos de mezcla desechables.

Según lo solicitado: Suspensiones de látex azul para cada grupo de estreptococos Grupo A, Grupo B, Grupo C, Grupo D, Grupo F y Grupo G.

#### MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

Asas bacteriológicas, pipetas Pasteur, tubos de vidrio borosilicato de 12 x 75 mm, reloj.

Las siguientes cepas ATCC se recomiendan para su uso en control de calidad:

*Streptococcus pyogenes* grupo A (ATCC# 19615),  
*Streptococcus* sp. grupo B (ATCC# 12386),  
*Streptococcus* sp. grupo C (ATCC# 12388),  
*Enterococcus faecalis* grupo D (ATCC# 19433),  
*Streptococcus* sp. Tipo 2, grupo F (ATCC# 12392),  
*Streptococcus* sp. grupo G (ATCC# 12394)

#### PROTOCOLO DEL TEST

Todos los componentes deben estar a temperatura ambiente (20-28 °C) antes de su uso

- Etiquetar un tubo de vidrio para cada muestra.
- Dispensar 1 gota de Reactivo de Extracción 1 ("Extraction Reagent 1") a cada tubo.
- Seleccionar de 1 a 4 colonias beta-hemolíticas con un asa bacteriológica desechable y suspenderlas en el Reactivo de Extracción 1. Si las colonias son diminutas, tomar varias colonias bien aisladas y suspenderlas hasta que el Reactivo de Extracción 1 aparezca como una solución turbia. En todos los casos las colonias estreptocócicas deben ser tomadas de un área con mínima cantidad de contaminación.
- Dispensar 1 gota de Reactivo de Extracción 2 ("Extraction Reagent 2") a cada tubo.
- Mezclar la reacción en cada tubo golpeando suavemente con los dedos durante 5-10 segundos.
- Dispensar 5 gotas de Reactivo de Extracción 3 ("Extraction Reagent 3") a cada tubo. Mezclar la reacción en cada tubo como en el paso 5.
- Dispensar 1 gota de cada suspensión de látex azul bien homogeneizada, en círculos separados de la tarjeta del test.
- Usando una pipeta Pasteur, colocar una gota del extracto de la muestra analizada cerca de cada gota de látex azul, en cada círculo de reacción de la tarjeta del test.
- Mezclar la gota de látex azul y la gota del extracto de la muestra, con un palillo de mezcla desechable, extendiendo la mezcla por toda la superficie del círculo de reacción. Debe utilizarse un palillo de mezcla nuevo con cada látex y en cada círculo de reacción.
- Balancear suavemente la tarjeta del test, permitiendo que la mezcla fluya lentamente sobre la superficie entera del círculo de reacción.
- Observar la aparición de aglutinación al cabo de 1 minuto, bajo condiciones normales de iluminación.

#### PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

Los procedimientos rutinarios de control de calidad de cada lote Prolex™, incluyen ensayos de los componentes del kit (suspensiones de látex azul, control positivo polivalente y reactivos de extracción) con extractos de cada grupo de estreptococos A, B, C, D, F y G, utilizando las cepas ATCC listadas en la sección "MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS". Además, cada suspensión de látex azul es ensayada para comprobar la ausencia de reacciones cruzadas con extractos de los siguientes microorganismos ATCC: *Escherichia coli* ( ATCC #25922), *Klebsiella pneumoniae* ( ATCC #13883),

*Staphylococcus aureus* (ATCC #25923) y *Haemophilus influenzae* tipo b (ATCC #10211). Sin embargo, se recomiendan los siguientes procedimientos para comprobar el buen funcionamiento de los reactivos:

1. El control positivo es usado para comprobar el funcionamiento de cada látex azul individual. El reactivo de látex azul debe mostrar una aglutinación evidente con el control positivo del kit. Este control positivo polivalente no debe usarse para comprobar la especificidad de los reactivos de látex azul, ni para asegurar que los pasos de la extracción se han efectuado bien y que han funcionado correctamente.
2. El extracto de una cepa conocida debe aglutinar con los reactivos de látex azul homólogos. Consultar la lista de cepas de referencia ATCC recomendadas para este uso en la sección "MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS".
3. Como prueba de ausencia de autoaglutinación, los reactivos de látex azul no deben mostrar aglutinación cuando son mezclados con solución salina normal.

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

**Resultado positivo:** La aparición de una aglutinación significativamente fuerte y rápida, de las partículas de látex azul de un único reactivo de látex, sólo en un círculo de reacción, indica la identificación específica del aislamiento de estreptococos. Una débil reacción con un único reactivo de látex azul se debe repetir usando un inóculo más duro. El repetido test se considera positivo si tiene lugar una aglutinación con sólo uno de los reactivos de látex azul. La figura 1 presenta un esquema sugerido para la determinación del grupo de los estreptococos.

**Resultado negativo:** No aparece una aglutinación visible de las partículas de látex azul con ninguno de los reactivos de látex del kit, en ninguno de los círculos de reacción.

#### LIMITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

1. Resultados falsos negativos y falsos positivos pueden aparecer si se usan cantidades insuficientes de cultivo o de reactivos de extracción.
2. Este kit está destinado a la identificación de estreptococos beta-hemolíticos. Si se identifican estreptococos alfa-hemolíticos, o no hemolíticos, la identificación debe ser confirmada por test bioquímicos (5, 9). (Consultar el esquema sugerido para la identificación de los grupos de estreptococos).
3. Reacciones positivas falsas se han observado con organismos de géneros no relacionados, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* o *Pseudomonas* (3,8). Estas reacciones parecen aglutinaciones inespecíficas con todos los reactivos de látex.
4. Algunas cepas de estreptococos de Grupo D han mostrado reacciones cruzadas con el antisuero del Grupo G; estas cepas pueden ser confirmadas como Grupo D con el test bilis-escolina.
5. Enterococos pueden ser diferenciados de los estreptococos del Grupo D por test bioquímicos.
6. *Listeria monocytogenes* puede reaccionar con el Grupo B y/o reactivos de látex G Streptococcal, ya que *L. monocytogenes* muestra un antígeno similar a los estreptococos de los Grupos B y G. El test de catalasía se ha de realizar para distinguir entre *Listeria*, que es catalasía positiva y estreptococos que son catalasías negativas. La tinción de Gram y los test de motilidad pueden realizarse como ayudas adicionales para la diferenciación.

#### CARACTERÍSTICAS DE FIABILIDAD

##### A. Estudios de reacciones cruzadas:

El kit Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit ha sido ensayado para comprobar la posible reactividad cruzada, usando 33 cepas de referencia ATCC. El kit identificó correctamente todos los estreptococos de los grupos de Lancefield A, B, C, D, F y G (N=16). No se observó ninguna reacción cruzada durante los test con otras cepas de estreptococos (n=7) ni durante los test con otros organismos no estreptococos (n=10).

##### B. Estudios de fiabilidad clínica:

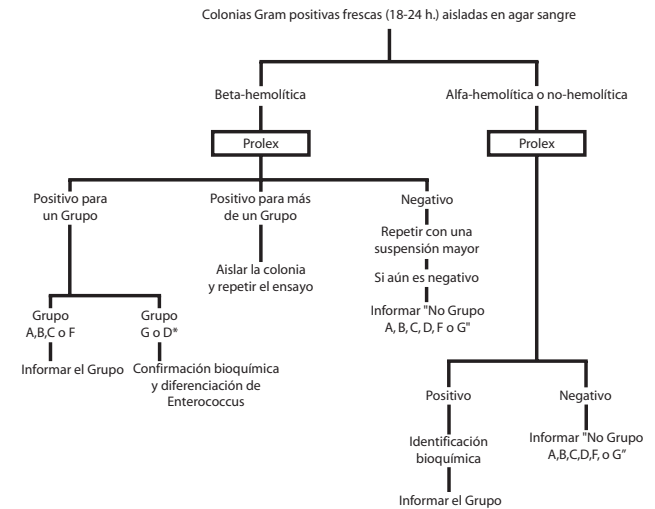
1. La fiabilidad del kit Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit ha sido evaluada en un estudio de un Centro Microbiológico de Oxford, Inglaterra (datos en archivo de Pro-Lab Inc., Richmond Hill, Ontario, Canadá). En este estudio se ensayaron 468 cultivos primarios con el kit Prolex™ y un kit alternativo para la identificación del grupo de estreptococos. La coincidencia global entre los dos kits después del ensayo inicial apareció en 452 de los 468 aislamientos ensayados (96,6%). Los resultados anómalos (n=16; todos de colonias diminutas) fueron repetidos usando un inóculo mayor. Trece de los 16 resultados anómalos coincidieron después de repetir el test, obteniéndose 1 grupo A, 2 grupo B, 3 grupo D, 1 grupo F, 5 grupo G y 1 cepa de grupo no definible. Dos de los tres aislamientos con identificación discrepante fueron posteriormente identificados como cepas no beta-hemolíticas. El tercer aislamiento con identificación discrepante fue identificado como grupo D con el kit Prolex™ y como estreptococo de grupo no identificable con el kit alternativo. Después, esta cepa mostró también un resultado positivo como estreptococo de grupo D con el kit alternativo, realizando el ensayo a partir de un subcultivo. La concordancia global entre el kit Prolex™ y el kit alternativo para la identificación del grupo de estreptococos, después de repetir el test de los resultados anómalos, se observó en 463 de los 468 aislamientos ensayados (99,4%). Los 460 aislamientos usados en este estudio incluyeron 127 estreptococos de grupo A, 93 de grupo B, 30 de grupo C, 28 de grupo D, 8 de grupo F, 107 de grupo G y 75 cepas de grupo no definible.
2. Se ha realizado un segundo estudio de fiabilidad en un Centro de Salud de Ontario, Canadá. En este estudio se incluyeron 111 cultivos primarios (110 ensayados, 1 inadecuado). Todas las cepas fueron originalmente identificadas por reacciones de precipitación de Lancefield. Todos los grupos D fueron posteriormente confirmados usando protocolos de análisis BE (bilis-escolina) y PYR (pirrolidoniol aminopeptidasa). Los cultivos primarios fueron ensayados en paralelo usando el kit Prolex™ Streptococcal Grouping Kit y un kit alternativo para la identificación del grupo de estreptococos. En este estudio, la concordancia global entre el kit Prolex™ y los resultados de precipitación de Lancefield se mostró en 109 de los 110 aislamientos ensayados (99%), mientras que la concordancia global entre el kit alternativo y los resultados de Lancefield, apareció en 106 de los 110 aislamientos ensayados (96,3%). Los 110 aislamientos primarios ensayados en este estudio incluyeron 15 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 de cepas de grupo no definible.

#### REFERENCIAS

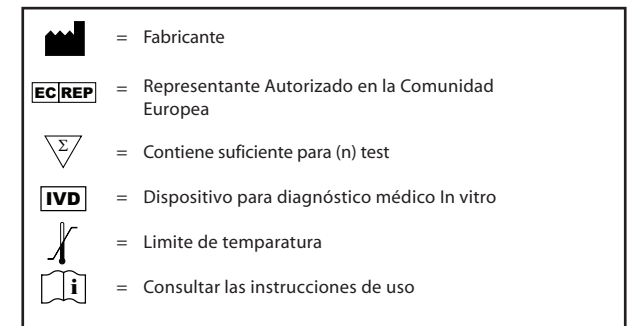
1. **Ederer, G.M., Herrmann, M.M., Bruce, R. Matsen, J.M. and Chapman, S.S.** (1972). Rapid Extraction Method with Pronase B for Grouping Beta-Haemolytic Streptococci. *Appl. Microbiol.*, 23, 285.
2. **EL Kholi, A., Wannamaker, L.W. and Krause, R.M.** (1974). Simplified Extraction Procedure for Serological 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 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].



Las instrucciones de uso se tradujeron de manera profesional del inglés. En caso de ambigüedad o discrepancia evidente, por favor, diríjase al servicio de atención al cliente de Pro-Lab.