

PROLEX™ EXTRACTION REAGENT SET
pro použití s
PROLEX™ STREPTOCOCCAL GROUPING LATEX REAGENTS
(pro *in vitro* diagnostické použití)

KATALOGOVÉ ČÍSLO: PL.046 (150 testů)

ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Sada Prolex™ Extraction Reagent Set, používaná v kombinaci s činidly Streptococcal Grouping Latex Reagents poskytuje rychlou metodu pro serologickou identifikaci Lancefieldových skupin A, B, C, D, F a G streptokoků rostoucích na agarových plotnách.

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Klinické, epidemiologické a mikrobiologické studie přesvědčivě ukázaly, že diagnóza streptokokových infekcí založená na klinických symptomech vždycky vyžaduje mikrobiologické ověření (4). Beta-hemolytické streptokoky jsou nejčastěji izolované humánní patogeny mezi zástupci z rodu *Streptococcus*. Téměř všechny beta-hemolytické streptokoky mají specifické sacharidové antigeny (streptokokové skupinové antigeny). Lancefield ukázal, že tyto antigeny mohou být extrahovány v rozpustné formě a identifikovány precipitační reakcí s homologním antisérem. Nyní se používají různé postupy extrakcí streptokokových antigenů (1,2,6,7,10,11,12). Souprava Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit je založena na uvolňování specifických antigenů z buněčné stěny bakterií pomocí extrakce modifikovanou kyselinou dusitou. Extrahovaný antigen ve spojení s latexovou aglutinací poskytuje rychlou, citlivou a specifickou metodu pro identifikaci streptokoků skupiny A, B, C, D, F a G z ploten obsahujících primární kulturu.

PRINCIP TESTU

Souprava zahrnuje chemickou extrakci skupiny specifických sacharidových antigenů pomocí speciálně vyvinutých extrakčních činidel na bázi kyseliny dusité. Extrakční činidla 1 a 2, které jsou součástí soupravy, obsahují chemickou látku schopnou extrahovat streptokokovou skupinu specifických antigenů při pokojové teplotě. Extrakční činidlo 3 obsahuje neutralizační roztok. Neutralizovaný extrakt může být snadno identifikovatelný pomocí modrých latexových částic senzibilizovaných purifikovanou skupinou specifických králičích imunoglobulinů. Tyto modré latexové částice silně aglutinují v přítomnosti homologního antigenu a nebudou aglutinovat, pokud homologní antigen není přítomen.

REAGENCIE

Každá sada postačuje pro 150 extrakcí vhodných pro typizaci pomocí reagensů Prolex™ Streptococcal Latex reagents PL.031, PL.032, PL.033, PL.034, PL.035 nebo PL.036. Dodávaný materiál je hotový k použití.

Extrakční činidlo 1 (PL.047): Jedna lahvička opatřená kapátkem obsahující 8,0 ml modifikovaného extrakčního činidla 1 s 0,098% azidem sodným jako konzervační látkou.

Extrakční činidlo 2 (PL.048): Jedna lahvička opatřená kapátkem obsahující 8,0 ml modifikovaného extrakčního činidla 2.

Extrakční činidlo 3 (PL.049): Jedna lahvička opatřená kapátkem obsahující 8,0 ml modifikovaného extrakčního činidla 1 s 0,098% azidem sodným jako konzervační látkou.

Reagencie jsou prodávány jako sada tří lahviček.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Nepoužívejte činidla po datu expirace uvedeného na štítku produktu.

Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice
Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: info@biovendor.cz, www.biovendor.cz

Některé reagencie obsahují azid sodný. Pokud se nahromadí, může s mědí nebo olovem reagovat explozivně. Ačkoliv je množství azidu sodného v reagenciích minimální, při splachování použitých reagencií do umyvadla je třeba použít velkého množství vody.

Extrakční činidla obsahují žíraviny! V případě potřísnění pokožky ji ihned umyjte mýdlem a velkým množstvím vody. V případě zasažení očí proplachujte hojně vodou, nejméně 15 minut.

Při manipulaci, zpracovávání a likvidaci všech klinických vzorků je třeba užívat univerzálních bezpečnostních opatření, protože v nich může být přítomen patogen.

Reagencie jsou určeny pouze pro *in vitro* diagnostické použití.

Aby výsledky testu byly validní, je třeba dodržovat postup, podmínky skladování, bezpečnostní opatření a omezení specifikovaná v tomto návodu.

STABILITA A SKLADOVÁNÍ

Všechny komponenty sady musí být skladovány při 2-8°C. Nezamrazujte. Reagencie skladované za těchto podmínek jsou stabilní až do data expirace uvedeného na štítku.

ODBĚR VZORKU A PŘÍPRAVA KULTURY

Specifické postupy týkající se odběru vzorků a přípravě primárních kultivací naleznete ve standardní mikrobiologické příručce. Používá se čerstvá (18-24 hod.) kultura na krevním agaru. Je předpokládán gram-pozitivní beta-hemolytický izolát streptokokových kolonií (na 5% agaru s ovčí krví). Pro zařazení do skupiny je dostačující jedna až čtyři velké kolonie; nicméně pokud jsou kolonie maličké, je třeba použít větší počet kolonií (plná klička).

DODÁVANÝ MATERIÁL

Extrakční činidlo 1

Extrakční činidlo 2

Extrakční činidlo 3.

POŽADOVANÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY

Modrá latexová suspenze pro skupiny streptokoků A (PL.031), B (PL.032), C (PL.033), D (PL.034), F (PL.035) a / nebo G (PL.036).

Polyvalentní pozitivní kontrola (PL.040) obsahující polyvalentní extrakt představující antigeny ze skupin streptokoků A, B, C, D, F a G.

Jednorázové kartičky s testovacími kruhy (PL.092-48)

Jednorázové tyčinky na míchání.

Inokulační kličky, Pasteurovy pipety, borosilikátové skleněné testovací zkumavky 12mm x 75mm, stopky.

Pro kontrolu kvality jsou doporučeny následující ATCC kmeny;

Streptococcus pyogenes skupiny A (ATCC 19615), *Streptococcus* sp. skupiny B (ATCC 12386),

Streptococcus sp. skupiny C (ATCC 12388), *Enterococcus faecalis* skupiny D (ATCC 19433),

Streptococcus sp. Typ 2, skupiny F (ATCC 12392), *Streptococcus* sp. skupiny G (ATCC 12394)

PROTOKOL TESTU

Všechny složky musí být před použitím vytemperovány na pokojovou teplotu (22-28°C).

Pro každý vzorek označte jednu testovací zkumavku.

Přidejte 1 kapku modifikovaného extrakčního činidla 1 do každé zkumavky.

Vyberte 1-4 beta-hemolytické kolonie s použitím jednorázové kličky nebo jehly a suspendujte je v extrakčním činidle 1. Pokud jsou kolonie droboučké, seberte na testování několik dobře izolovaných kolonií, až se roztok Extrakční reagencie 1 zakalí. Ve všech případech by se streptokokové kolonie měly sebrat z oblasti s co nejmenší pravděpodobností kontaminace.

Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice

Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: info@biovendor.cz, www.biovendor.cz

Přidejte 1 kapku modifikovaného extrakčního činidla 2 do každé zkumavky. Zamíchejte reakci poklepáváním na zkumavku prstem po dobu 5-10 sekund. Přidejte 1 kapku modifikovaného extrakčního činidla 3 do každé zkumavky. Zamíchejte reakci stejně jako v bodě 5. Naneste jednu kapku z každé modré latexové suspenze na oddělené kruhy na testovací kartičce. S použitím Pasteurovy pipety naneste jednu kapku extraktu vedle každé kapky latexové suspenze. Promíchejte modrý latex a extrakt dodanou tyčinkou po celé oblasti testovacího kruhu. Pro každou reagensii použijte novou tyčinku. Jemně naklánejte kartičku tak, aby se směs pomalu přelévala přes celou testovací oblast. Do 1 minuty pozorujte aglutinaci.

POSTUP KONTROLY KVALITY

Rutinní testování kontroly kvality pro každou šarži ProlexTM zahrnuje testování složek soupravy (modrých latexových suspenzí, polyvalentních pozitivních kontrol a extrakčních činidel) s každou skupinou streptokoků A, B, C, D, F a G s použitím ATCC kmenů uvedených v kapitole "POŽADOVANÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY". Navíc je každá modrá latexová suspenze testována na absenci křížových reakcí proti extraktům následujících ATCC organismů: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) a *Haemophilus influenzae* typ b (ATCC 10211). Nicméně následující postup je doporučován pro kontrolu výkonnosti reagensií:

Pozitivní kontrola se používá ke kontrole výkonnosti individuálních modrých latexových reagensií. Modrá latexová reagensie by měla ukazovat zřejmou aglutinaci s pozitivní kontrolou. Pozitivní kontrola se nepoužívá k dokazování specifčnosti modrých latexových reagensií ani k ujištění, že extrakční krok byl proveden správně a je funkční.

Extrakt ze známého kmene by měl být aglutinován s homologními modrými latexovými reagensii. Viz doporučené ATCC referenční kmeny v kapitole "POŽADOVANÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY".

Test nepřítomnosti autoaglutinace modrých latexových reagensií by neměl prokazovat aglutinaci s běžným fyziologickým roztokem.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pozitivní výsledky: Významně rychlé silné shlukování modrých latexových částic, které formují aglutinační vzory v pouze jedné latexové reagensii, indikují specifickou identifikaci streptokokového izolátu. Slabá reakce s jednou modrou latexovou reagensii by se měla opakovat s hustším inokulem. Opakovaný test je shledán pozitivní, pokud se objeví viditelná aglutinace pouze s jednou modrou latexovou reagensii. Obrázek 1 dokumentuje navrhované schéma určení skupiny streptokoků.

Negativní výsledky: Žádná aglutinace modrých latexových částic.

LIMITACE PROCEDURY

V případě použití neadekvátního množství kultury nebo extrakčních reagensií se mohou objevit falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky.

Souprava je určena pro použití při identifikaci beta-hemolytických streptokoků. Pokud jsou identifikovány alfa nebo non-hemolytické streptokoky, identifikaci je třeba potvrdit biochemickými testy (5,9). (Viz navržené schéma pro třídění streptokoků).

Jsou známy falešně pozitivní reakce u organismů z nepříbuzných rodů, např. *Escherichia coli*, *Klebsiella* nebo *Pseudomonas* (3,8). Ty mohou nespecificky aglutinovat všechny latexové reagensie.

Některé kmeny streptokoků skupiny D mohou zkříženě reagovat s antisérem skupiny G; tyto kmeny mohou být potvrzeny jako skupina D pomocí žluč-eskulinového testu.

Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice
Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: info@biovendor.cz, www.biovendor.cz

Listeria monocytogenes může zkříženě reagovat s latexovou reagentií pro streptokoky skupiny B, jelikož *L. monocytogenes* projevuje stejnou antigenicitu jako streptokoky skupiny B. Pro rozlišení mezi *Listeria*, které jsou kataláza pozitivní a streptokoky, které jsou kataláza negativní, lze použít katalázový test. Gramovo barvení a test motility se provádí jako další pomůcka při diferenciaci.

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

A. Studie zkřížené reaktivity:

Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit byl testován na zkříženou reaktivitu s použitím 33 ATCC kontrolních kmenů. Souprava úspěšně zařadila do skupin všechny streptokoky skupin A, B, C, D, F a G dle Lancefielda (N=16). Během testování se neobjevila žádná zkřížená reakce s dalšími streptokokovými kmeny (n=7) ani s dalšími non-streptokokovými organismy (n=10).

B. Studie klinické funkčnosti:

1. Funkčnost Prolex™ Streptococcal Grouping Latex Kit byla hodnocena v Mikrobiologickém centru v Oxfordu, Anglie (údaje v záznamu firmy Pro-Lab Inc., Richmond Hill, Ontario, Canada). V této studii bylo soupravou Prolex™ a alternativní soupravou na určení skupin testováno 468 primárních kultur. Celková shoda mezi dvěma soupravami po prvním testování se objevila u 452 ze 468 testovaných izolátů (96.6%). Nezvyklé výsledky (n=16; droboučké kolonie) byly opakovány s použitím silnějšího inokula. Třináct z 16 nezvyklých výsledků po retestování souhlasilo a zahrnovalo 1 skupiny A, 2 skupiny B, 3 skupiny D, 1 skupiny F, 5 skupiny G a 1 kmen nezařaditelný do skupiny. Dva z 3 nesouhlasících izolátů byly dále identifikovány jako non-beta homolytické kmeny. Třetí nesouhlasící izolát byl zařazen do skupiny D pomocí soupravy Prolex™ a jako nezařaditelný do skupiny s alternativní soupravou. Tento kmen měl pozitivní výsledek pro skupinu D pomocí alternativní soupravy po subkultivaci. Celková shoda mezi Prolex™ a alternativní soupravou na určení skupin po retestování nezvyklých výsledků byla u 463 ze 468 testovaných izolátů (99.4%). 468 izolátů použitých pro studii zahrnovalo 127 kmenů skupiny A, 93 skupiny B, 30 skupiny C, 28 skupiny D, 8 skupiny F, 107 skupiny G a 75 nezařaditelných kmenů.
2. Druhá studie funkčnosti byla provedena v Health Centre, Ontario, Canada. V této studii bylo zahrnuto 111 primárních kultur (110 testovaných, 1 nevhodný). Všechny kmeny byly původně zařazeny do skupiny pomocí Lancefieldovy precipitační reakce. Všechny skupiny D byly dále biochemicky potvrzeny pomocí BE (žluč-eskulin) a PYR (pyrrolidonylaminopeptidáza) analyzačního protokolu. Primární kultivace byly testovány paralelně s použitím Prolex™ Streptococcal Grouping Kit a alternativní soupravou na určení skupin. V této studii byla celková shoda mezi Prolex™ a Lancefieldovými výsledky ukázána u 109 ze 110 testovaných izolátů (99%), zatímco celková shoda mezi alternativní soupravou a Lancefieldovými výsledky byla u 106 ze 110 testovaných izolátů (96.3%). 110 primárních izolátů použitých v této studii zahrnovalo 15 kmenů skupiny A, 40 kmenů skupiny B, 13 skupiny C, 4 skupiny D, 11 skupiny F, 12 skupiny G a 15 nezařaditelných kmenů.

LITERATURA

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 Kholý, 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.

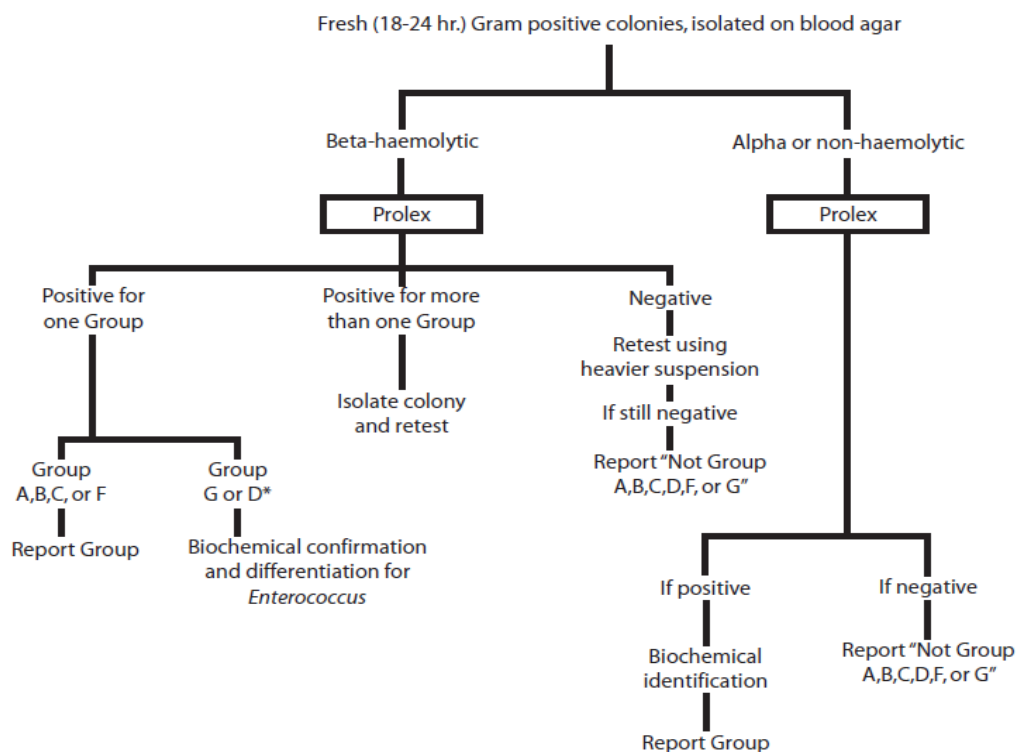
Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice
Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: info@biovendor.cz, www.biovendor.cz







- 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.

Obrázek 1 NAVRŽENÉ SCHÉMA PRO URČENÍ SKUPINY STREPTOKOKŮ



* Některé kmeny skupiny D zkříženě reagují s antisérem pro skupinu G.

[Harvey, C. L. and Mellmurray, M.B (1984) *Eur. J. Clinical Microbiol*,10,641].

	Použitelné do		Obsah dostačuje pro <n> testů
LOT	Číslo šarže	IVD	Pro použití in vitro
	Varování		Rozmezí teplot
REF	Katalogové číslo		Viz návod k použití
EC REP	Zplnomocněný zástupce		Výrobce

Poslední revize: červenec 2008

Autorizovaný zástupce výrobce v České republice:

BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Sídlo: Tůmova 2265/60, 616 00 Brno, Provozovna: Karásek 1767/1, 621 00 Brno-Řečkovice
 Tel.: 549 124 111, fax: 549 211 465, e-mail: info@biovendor.cz, www.biovendor.cz