

USO PREVISTO

El kit Prolex™ de identificación de grupos estreptocócicos en látex supone 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 microbiológica⁽⁴⁾. 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 antisueros homólogos. Actualmente se utilizan diferentes procedimientos para la extracción de los antígenos estreptocócicos (1,2,6,7,10,11). El Kit Prolex™ de identificación de grupos estreptocócicos en látex se basa en la liberación de antígenos específicos de las paredes celulares de las bacterias mediante extracción por ácido nítrico 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 nítrico 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 kit es suficiente para 60 tests. Los materiales se suministran listos para usar.

- **Reactivos de látex:** 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:** Un frasco gotero con 2 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.
- **Reactivo de extracción 1:** Un frasco gotero con 3,2 ml del reactivo con azida sódica al 0,098% como conservante.
- **Reactivo de extracción 2:** Un frasco gotero con 3,2 ml de reactivo de extracción 2.
- **Reactivo de extracción 3:** Dos frascos goteros con 8 ml cada uno del reactivo con azida sódica al 0,098% como conservante.
- Tarjetas de test
- Palillos de mezcla
- Instrucciones de uso

Todos los componentes de este kit están disponibles para su compra por separado:

Reactivo o componente	Número de catálogo.
Reactivo de látex de grupo A	PL.031
Reactivo de látex de grupo B	PL.032
Reactivo de látex de grupo C	PL.033
Reactivo de látex de grupo D	PL.034
Reactivo de látex de grupo F	PL.035
Reactivo de látex de grupo G	PL.036
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.091P
Tarjetas de test	PL.092-48

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- 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.

PRECAUCIONES

1. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta del producto.
2. 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.
3. Los reactivos de extracción contienen un agente levemente cáustico. En caso de contacto con la piel, lave inmediatamente el área con jabón y una cantidad abundante de agua. Si el reactivo entra en contacto con un ojo, irrigue con agua durante al menos 15 minutos.
4. Deben adoptarse precauciones universales al manipular, procesar y desechar todas las muestras clínicas. Todos los materiales del test deben considerarse potencialmente infecciosos durante y después del uso y deben manipularse y eliminarse adecuadamente.
5. Este kit está destinado para un uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*.
6. Para obtener resultados válidos deben seguirse los procedimientos, condiciones de conservación, precauciones y limitaciones especificadas en estas instrucciones de uso.
7. Estos reactivos contienen materiales de origen animal y deben manejarse como potenciales portadores y transmisores de enfermedades.

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. Resuspender las partículas de látex del test invirtiendo varias veces con suavidad los frascos goteros. Examinar los frascos goteros para comprobar que las partículas de látex estén bien 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 1 a cada tubo.
6. Mezclar la reacción golpeando suavemente el tubo con un dedo durante 5-10 segundos.
7. Añadir 5 gotas 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 lentamente 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 (filamentosos) 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.

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.

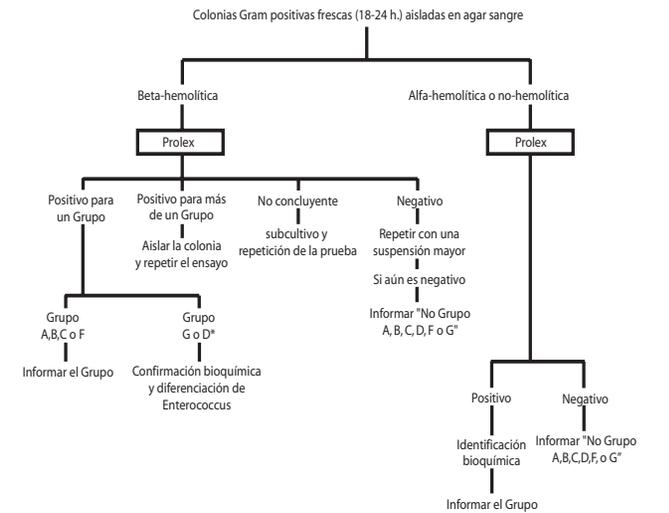
2. Se realizó un segundo estudio de rendimiento en un Centro de Salud en Ontario, Canadá. En este estudio, se incluyeron 111 cultivos primarios (110 estudiados, 1 inadecuado). Todas las cepas fueron agrupadas originalmente mediante reacciones de precipitación de Lancefield. Todos los estreptococos de grupo D fueron confirmados aún más bioquímicamente usando un protocolo de ensayo de BE (bilis-esculina) y PY (Pirrolidoniol 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.

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-Haemolytic 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 Streptomycin albus filtrate in the Preparation of Extracts of Lancefield Grouping. J. Clin. Microbiol., 1, 274.

	= Fabricante
	= Representante Autorizado en la Comunidad Europea
	= Contiene suficiente para (n) test
	= Dispositivo para diagnóstico médico In vitro
	= Limite de temperatura
	= Consultar las instrucciones de uso

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].

PL.037		Advertencia Ingresante peligroso: nitrato de sodio Nocivo en caso de ingestión. Muy tóxico para los organismos acuáticos.
Evitar su liberación al medio ambiente. No comer, beber ni fumar durante su utilización. Lavarse las manos concienzudamente tras la manipulación. Recoger el vertido. EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico en caso de malestar. Eliminar el contenido/el recipiente conforme a las normativas locales, regionales, nacionales e internacionales.		
PL.038		Peligro Ingresante peligroso: Ácido acético Puede ser corrosivo para los metales. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
Llevar guantes de protección. Llevar gafas y máscara de protección: Recomendación: Gafas de seguridad con protectores laterales. Llevar prendas de protección: Recomendación: Bata de laboratorio. Conservar únicamente en el recipiente original. EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. NO provocar el vómito. EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. Eliminar el contenido/el recipiente conforme a las normativas locales, regionales, nacionales e internacionales.		
PL.039		Advertencia Provoca irritación ocular grave. Provoca irritación cutánea grave.
Llevar guantes de protección. Llevar gafas y máscara de protección: Recomendación: Gafas de seguridad con protectores laterales. Lavarse las manos concienzudamente tras la manipulación. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.		

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