



DIESSE Diagnostica Senese SpA

Via delle Rose 10, 53035 Monteriggioni SI

Tel. ++39/0577/ 587111 - Fax ++39/0577/318690

ISTRUZIONI PER L'USO**STREPTOSLIDE****REF** 0210

50 tests

(Italiano)**1. UTILIZZAZIONE****SLIDE TEST PER L'IDENTIFICAZIONE DEI GRUPPI A, B, C, D, F, G DELLO STREPTOCOCCO.****2. INTRODUZIONE**

Lancefield ha dimostrato che gli streptococchi possiedono antigeni polisaccaridici gruppo specifici situati nella parete cellulare. Tali antigeni venivano estratti e riconosciuti mediante antisieri omologhi specifici. La maggior parte degli streptococchi patogeni per l'uomo appartengono ai gruppi A,B,C,D,F e G (1). Gli streptococchi del gruppo E vengono isolati molto raramente. Le tecniche di estrazione hanno subito molte modifiche ed oggi sono disponibili diversi reattivi basati sia su reazioni chimiche che enzimatiche (1,2,3,4).

Nel kit STREPTOSLIDE viene impiegata una semplice estrazione chimica senza alcuna incubazione (micro metodo con acido nitroso) che consente l'identificazione dei gruppi A,B,C,F e G usando come reagente una sospensione di particelle di lattice di polistirolo sensibilizzate con anticorpi specifici per i rispettivi antigeni di gruppo. Il gruppo D viene normalmente identificato con il lattice specifico per il gruppo D per reazione diretta senza estrazione. Gli isolati che risultano negativi verso tutti i gruppi e sono sospetti appartenere al gruppo D, vengono sottoposti all'azione litica di una soluzione enzimatica ed esaminati di nuovo con il lattice specifico per il gruppo D.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Alcune colonie di streptococchi vengono stemperate nella miscela reattiva adatta ad estrarre l'antigene di gruppo. Una aliquota della sospensione viene fatta reagire con lattice sensibilizzato con immunoglobuline specifiche per un determinato antigene di gruppo. Un agglutinato evidente identifica il gruppo di appartenenza.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT**LATEX** GRUPPO LATTICI A,B,C,D,F,G 6 flaconi contagocce x 2.5 mL

Contenuto: Sospensioni di particelle di lattice di polistirolo sensibilizzate con immunoglobuline (da coniglio) specifiche per l'antigene di gruppo A,B,C,D,F, o G, rispettivamente. Pronte per l'uso.

REAGENT 1 REATTIVO 1 1 x 3 mL

Contenuto: Soluzione di sodio nitrito.

REAGENT 2 REATTIVO 2 1 x 3 mL

Contenuto: Acido acetico diluito in una soluzione di metilarancio.

REAGENT 3 REATTIVO 3 2 x 4 mL

Contenuto: Soluzione di ammonio carbonato. Contiene sodio azide allo 0,09%.

LYTIC ENZYME ENZIMA LITICO liofilo 2 x 2 mL

Contenuto: Estrattore enzimatico.

Preparazione: Liofilo, da ricostituire con 2.0 mL di acqua distillata.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1 x 0.5 mL

Contenuto: Estratto cellulare polivalente contenente sodio azide 0,09% come conservante.

	Capitolo
Modifiche introdotte nella revisione corrente	4, 6, Legenda

AVVERTENZA E PRECAUZIONI

Reattivo 1, Reattivo 2, Reattivo 3 ed Enzima litico sono classificati ed etichettati come pericolosi ai sensi delle direttive europee vigenti. Tutte le informazioni in materia di sicurezza sono contenute nella Scheda di Sicurezza.

ALTRI MATERIALI

- Slides con fondo nero, a 8 divisioni.
- 200 bastoncini per la miscelazione

ALTRI MATERIALI NON FORNITI

- Normale vetreria di laboratorio
- Pipetta da 25 µl
- Soluzione Fisiologica

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

I reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

REAGENTE	CONDIZIONI
LATTICE	3 mesi
REATTIVO 1	3 mesi
REATTIVO 2	3 mesi
REATTIVO 3	3 mesi
ENZIMA LITICO	5 settimane
CONTROLLO POSITIVO	3 mesi

6. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO. CONSERVARE A 2-8°C.

Qualunque materiale di origine biologica deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

Smaltimento dei residui: i campioni e i reagenti usati devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di legge vigenti.

Avvertenze per la sicurezza personale

- ATTENZIONE: Alcuni reattivi richiedono attenzioni particolari come evidenziato dall'etichetta.**

Reattivo 1:

Avvertenza: Pericolo

Contiene: Sodium Nitrate

INDEX No. 007-010-00-4

Indicazioni di pericolo: H272 – Può aggravare un incendio: comburente; H301 – Tossico se ingerito; H400 – Altamente tossico per gli organismi acquatici

Consigli di prudenza: P210 – Tenere lontano da fonti di calore/scintille/fiamme libere/superfici riscaldate — Non fumare; P220 – Tenere/conservare lontano da indumenti/materiali combustibili; P221 – Prendere ogni precauzione per evitare di miscelare con sostanze combustibili/...; P264 – Lavare accuratamente con acqua dopo l'uso; P270 – Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso; P273 – Non disperdere nell'ambiente; P280 – Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso; P301+P310 – IN CASO DI INGESTIONE:contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico; P330 – Sciacquare la bocca; P370+P378 – In caso di incendio, estinguere con acqua, schiuma, anidride carbonica; P391 – Raccogliere la fuoriuscita; P405 – Conservare sotto chiave; P501 – Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative vigenti.

	Capitolo
Modifiche introdotte nella revisione corrente	4, 6, Legenda

Reattivo 2:Avvertenza: AttenzioneContiene: Acetic Acid

INDEX No. 607-002-00-6

Indicazioni di pericolo: H315 – Provoca irritazione cutanea; H319 – Provoca grave irritazione oculareConsigli di prudenza: P264 – Lavare accuratamente con acqua dopo l'uso; P280 – Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso; P302+P352 – IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone; P305+P351+P338 – 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.Reattivo 3:Avvertenza: AttenzioneIndicazioni di pericolo: H315 – Provoca irritazione cutanea; H319 – Provoca grave irritazione oculareConsigli di prudenza: P264 – Lavare accuratamente con acqua dopo l'uso; P280 – Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso; P302+P352 – IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone; P305+P351+P338 – 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.Enzima litico:Avvertenza: PericoloIndicazioni di pericolo: H300 – Letale se ingerito; H315 – Provoca irritazione cutanea; H319 – Provoca grave irritazione oculare; H335 – Può irritare le vie respiratorie; H411 – Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durataConsigli di prudenza: P273 – Non disperdere nell'ambiente; P280 – Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso; P301+P310 – IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico; P302+P352 – IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone; P304+P340 – IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione; P305+P351+P338 – 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.

EUH032 – A contatto con acidi libera gas molto tossici

- Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
- I reagenti contengono Sodio Azide (0.09%) che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi.
- Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
- Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere pulita, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.
- Il Reagent 3 è alcalino (pH >9) e può sviluppare vapori di ammoniaca. **Evitare contatto con le mucose.**

Avvertenze analitiche

- Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C).** Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso.
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
- Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti.
- La reazione può essere eseguita su un agitatore ruotante. Regolare la velocità a 100 ± 10 rpm.
- La reazione di agglutinazione viene meglio interpretata osservando lo slide sotto una lampada.
- Effettuare una colorazione di Gram per confermare la presenza di streptococchi.

	Capitolo
Modifiche introdotte nella revisione corrente	4, 6, Legenda

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Streptococchi da colture primarie miste su terreni solidi possono essere usati, se presenti in numero sufficiente ed in colonie ben isolate. Il terreno di elezione è l'Agar Sangue che consente l'osservazione della reazione di emolisi prima di effettuare la reazione di identificazione del gruppo. Brodocolture di almeno 4 ore possono ugualmente essere impiegate.

8. PROCEDIMENTO

- REAZIONE PER I GRUPPI A,B,C,F e G:

Distribuire una goccia di Reattivo 1 e una di Reattivo 2 in una provetta piccola. Prelevare con l'ansa (o con un bastoncino) 1-5 colonie ben isolate e stemperarle nella provetta fino a sospensione omogenea. Aggiungere 2 gocce del Reattivo 3 e mescolare. Da brodocoltura prelevare 25 µL e procedere come sopra. Agitare accuratamente i Grouping latex A, B, C, F e G. Distribuire una goccia del primo lattice sul primo cerchio di reazione ed una goccia di ciascuno degli altri nei successivi. Depositare su ciascun cerchio 25 µL di estratto prelevandolo dalla provetta. Mescolare accuratamente con un bastoncino e ruotare lo slide per un minuto. Osservare ciascun cerchio per evidente agglutinazione (reazione di identificazione positiva.) Qualora si sospetti fino dall'inizio la presenza di streptococchi di gruppo D si può effettuare subito il test diretto per le colonie sospette con il Grouping latex D. Se il risultato è negativo, si può procedere all'estrazione enzimatica.

- REAZIONE DIRETTA PER IL GRUPPO D:

4-5 colonie isolate vengono stemperate su un cerchio di reazione dello slide insieme ad una goccia di Soluzione Fisiologica. Aggiungere una goccia di Grouping latex D, mescolare con un bastoncino, ruotare ed osservare l'eventuale agglutinato che si forma entro un minuto. Un agglutinato evidente indica che le colonie sono costituite da streptococchi di gruppo D. Con questa procedura vengono identificati la maggioranza dei ceppi di gruppo D.

- ESTRAZIONE ENZIMATICA PER IL GRUPPO D:

Utilizzando l'Enzima litico, la percentuale di ceppi correttamente identificati come appartenenti al gruppo D raggiunge il massimo valore. Ricostituire il liofilo con acqua distillata e distribuire 100 µL (2 gocce) in una piccola provetta. Stemperare 1-5 colonie prelevate con l'ansa (o con un bastoncino) nell'estraente enzimatico e incubare per 10 minuti a 37° C. In un cerchio di reazione dello slide depositare una goccia di Grouping latex D e 25 µL di estratto, miscelare con un bastoncino, ruotare ed osservare. Un agglutinato evidente entro un minuto indica reazione positiva per l'identificazione di streptococchi del gruppo D.

9. VALIDAZIONE DEL TEST

Porre 25 µL del controllo positivo polivalente in ciascun cerchio del test card ed aggiungere 1 goccia di ciascun lattice, si dovranno avere con i singoli Grouping latex reazioni positive (agglutinazione evidente) entro un minuto.

10. LIMITAZIONI

Se si è sicuri dell'identificazione della famiglia, l'assenza di agglutinazione in tutte le condizioni descritte nel procedimento può essere dovuta ad un prelievo insufficiente. L'agglutinazione aspecifica di tutti i lattici può essere dovuta alla presenza di recettori Fc sulla parete batterica.

11. PERFORMANCES

Utilizzando ceppi ottenuti sia da isolati clinici che da collezioni si è verificato che la specificità e la sensibilità del test sono del 100%.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Topley and Wilson's VII Ed. Vol. 2 pag. 173-217 (1983)
2. Slifkin M., Gil G.M. J. Clin. Microbiol. 15, 187-189 (1982)
3. Calandra G.B., Henson C.L, J. Clin. Microbiol. 15, 184-189 (1982)
4. Slifkin M., Cumbie R.J. Clin. Microbiol. 25, 1555-1556 (1987).

	Capitolo
Modifiche introdotte nella revisione corrente	4, 6, Legenda



DIESSE Diagnostica Senese SpA

Via delle Rose 10, 53035 Monteriggioni SI

Tel. ++39/0577/ 587111 - Fax ++39/0577/318690

INSTRUCTIONS FOR USE**STREPTOSLIDE****REF 0210****(English)****1. INTENDED USE****SLIDE TEST FOR THE IDENTIFICATION OF STREPTOCOCCAL GROUPS A, B, C, D, F AND G.****2. INTRODUCTION**

Lancefield demonstrated that streptococci have group specific antigens on their cellular wall. These antigens (polysaccharides) have been extracted and recognised by specific homologous antisera. Most of the human pathogenic streptococci belong to the groups A,B,C,D,F and G (1). Group E streptococci are rarely isolated. The extraction procedures have been improved and several reagents based on chemical as well as enzymatic reactions are now available (1,2,3,4).

In the STREPTOSLIDE kit, the identification of Streptococci group A, B, C, F and G is performed without incubation by a simple chemical extraction (micromethod with nitrous acid) using latex with group specific antibodies. Group D is usually identified by direct reaction with the specific latex reagent for Group D. The isolated colonies negative to all group specific reagents and suspected to belong to the Group D, are tested again with the specific Group D latex reagent after enzymatic digestion.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

A few isolated colonies of streptococci are suspended in the reaction mixture for extraction of the group antigen. An aliquot of the suspension is mixed with latex reagent coated with immunoglobulins specific for the group antigens. Agglutination allows identification of the group.

4. KIT CONTENTS**Bring to room temperature before use.****LATEX** GROUPING LATEX A, B, C, D, F, G 6 dropper dispensers x 2.5 mL

Contents: Suspensions of polystyrene latex particles coated with specific immunoglobulins (rabbit) for group antigens. Ready for use.

REAGENT 1 REAGENT 1 1 x 3 mL

Contents: Sodium nitrite solution.

REAGENT 2 REAGENT 2 1 x 3 mL

Contents: Acetic acid diluted in a solution of methyloange.

REAGENT 3 REAGENT 3 2 x 4 mL

Contents: Ammonium carbonate solution, contains sodium azide 0,09%.

LYTIC ENZYME LYTIC ENZYME freeze-dried 2 x 2 mL

Contents: Enzymatic extracting reagent.

Preparation: Freeze-dried, to be reconstituted with 2.0 mL of distilled water.

WARNING AND PRECAUTIONS

Reagents 1, Reagent 2, Reagent 3 and Lytic Enzyme are classified and labelled as dangerous in accordance with European legislation. All safety data are reported in the Material Safety Data Sheet.

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1 x 0,5 mL

Contents: Polyvalent cell extract containing sodium azide 0,09% as preservative.

	Section
Changes introduced in the current revision	4, 6, Glossary

OTHER MATERIALS

- Slides with 8 reaction divisions, black background.
- 200 mixing sticks.

OTHER MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Normal laboratory glassware
- 25 µl Pipette
- Physiological Solution

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

REAGENT	CONDITIONS
LATEX	3 months
REAGENT 1	3 months
REAGENT 2	3 months
REAGENT 3	3 months
LYTIC ENZYME	5 weeks
POSITIVE CONTROL	3 months

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY. STORE AT 2-8°C

All reagents must be handled in accordance with the safety precautions adopted in the laboratory. All samples must be considered potentially infectious.

Waste disposal: samples and reagents once used must be treated as infectious residuals and eliminated according to law.

Health and Safety Information**1. ATTENTION: Some of the reagents necessitate particular attention, as reported on the relative labels.****Reagent 1:**

Signal Word: Danger

Contains: Sodium Nitrate

INDEX No. 007-010-00-4

Hazard Statements: H272 – May intensify fire; oxidiser; H301 – Toxic if swallowed; H400 – Very toxic to aquatic life

Precaution statements: P210 – Keep away from heat/sparks/open flames/hot surfaces. — No smoking; P220 – Keep/Store away from clothing/.../combustible materials; P221 – Take any precaution to avoid mixing with combustibles...; P264 – Wash ... thoroughly after handling; P270 – Do not eat, drink or smoke when using this product; P273 – Avoid release to the environment; P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection; P301+P310 – IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician; P330 – Rinse mouth; P370+P378 – In case of fire: Use water, foam, CO₂ for extinction; P391 Collect spillage; P405 Store locked up; P501 Dispose of contents/container according to law

Reagent 2:

Signal Word: Caution

Contains: Acetic Acid

INDEX No. 607-002-00-6

Hazard Statements: H315 – Causes skin irritation; H319 – Causes serious eye irritation

Precaution statements: P264 – Wash ... thoroughly after handling; P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection; P302+P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water; P305+P351+P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

	Section
Changes introduced in the current revision	4, 6, Glossary

Reagent 3:Signal Word: CautionHazard Statements: H315 – Causes skin irritation; H319 – Causes serious eye irritationPrecaution statements: P264 – Wash ... thoroughly after handling; P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection; P302+P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water; P305+P351+P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.Lytic Enzyme:Signal Word: DangerHazard Statements: H300 – Fatal if swallowed; H315 – Causes skin irritation; H319 – Causes serious eye irritation; H335 – May cause respiratory irritation; H411 – Toxic to aquatic life with long lasting effects.Precaution statements: P273 – Avoid release to the environment; P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection; P301+P310 – IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician; P302+P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water; P304+P340 IF INHALED: Remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing; P305+P351+P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

EUH032 – Contact with acids liberates very toxic gas.

2. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
3. The reagents contain 0.9% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides.
4. If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
5. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.
6. Reagent 3 is alkaline (pH>9) and can develop ammoniac fumes. **Avoid contact with the mucosa.**

Analytical precautions

1. **Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use.** Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature.
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable.
4. The reaction can be performed on a rotating mixer. Regulate the speed at 100 ± 10 rpm.
5. The agglutination reaction is best interpreted by examining the slide under a lamp.
6. Make a Gram coloration to confirm the presence of Streptococci.

7. SAMPLES

Streptococci from primary cultures on solid media can be used, if present in well isolated colonies. Blood agar is the best medium, allowing the haemolytic reaction to be observed before performing the group identification procedure. Streptococci from broth culture may also be used.

8. PROCEDURE**- REACTION FOR IDENTIFICATION OF GROUPS A, B, C, F and G:**

Dispense one drop of Reagent 1 and one drop of Reagent 2 in a small pipette, add 1-5 well isolated colonies (or 25 µL of broth culture) and mix until a homogeneous suspension is obtained. Add 2 drops of Reagent 3 and mix. Shake the Grouping latexes A, B, C, F and G carefully. Dispense one drop of the first latex on the first reaction circle and subsequently one drop of all the others on the next circles. Place 25 µL extract from the tube on each circle, mix carefully with a mixing stick and rotate the slide for 1 minute. Watch each circle for agglutination (reaction showing positive identification). If the presence of Group D Streptococci is suspected, perform the direct test for suspected colonies with the Grouping latex D. If the result is negative, perform the enzymatic extraction.

	Section
Changes introduced in the current revision	4, 6, Glossary

- DIRECT REACTION FOR GROUP D:

Dilute 4-5 isolated colonies together with one drop of Physiological Solution on a reaction circle. Add one drop of Grouping latex D, mix with a stick, rotate and watch for the possible agglutination within one minute. A clear agglutinate indicates colonies of Group D Streptococci. This procedure identifies most of the Group D strains.

- ENZYMATIC EXTRACTION FOR GROUP D:

Using the Lytic Enzyme, the highest percentage of correct identification of strains belonging to Group D is attained. Reconstitute the freeze-dried reagent with 2 mL of distilled water and dispense 100 µL (2 drops) in a small tube. Dilute 1-5 colonies (collected with the ansa or a stick) in the enzymatic solution and incubate at 37° C for 10 minutes. Dispense one drop of Grouping latex D and 25 µL of extract on a reaction circle, mix and rotate the slide. A clear agglutinate obtained within one minute indicates a positive reaction for the identification of the Group D Streptococci.

9. TEST VALIDATION

Distribute 25 µL of Polyvalent Positive Control on each test card circle and add one drop of each latex; positive reactions should result with each Grouping latex (evident agglutination) within one minute.

10. LIMITATIONS OF THE TEST

If the operator is certain of the identification of the family, the absence of agglutination in the conditions described in the procedure could be due to an insufficient sample. Non specific agglutination of all the latexes may be due to the presence of Fc receptors on the bacterial wall.

11. PERFORMANCE

Using strains obtained both from clinical isolates and from strain collections, it has been shown that the specificity and sensitivity of the test is 100%.

12. REFERENCES

1. Topley and Wilson's VII Ed. Vol. 2 pag. 173-217 (1983)
2. Slifkin M., Gil G.M. J. Clin. Microbiol. 15, 187-189 (1982)
3. Calandra G.B., Henson C.L, J. Clin. Microbiol. 15, 184-189 (1982)
- 4 Slifkin M., Cumbie R.J. Clin. Microbiol. 25, 1555-1556 (1987).

	Section
Changes introduced in the current revision	4, 6, Glossary



DIESSE Diagnostica Senese SpA

Via delle Rose 10, 53035 Monteriggioni SI

Tel. ++39/0577/ 587111 - Fax ++39/0577/318690

INSTRUCCIONES DE USO**STREPTOSLIDE****REF** 0210

50 tests

(Español)

1. INDICACIONES**TEST EN PORTA PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS A, B, C, D, F, G DEL ESTREPTOCOCCO.****2. RESUMEN**

Lancefield demostró que los estreptococos poseen antígenos polisacáridos específicos ubicados en la pared celular. Estos antígenos fueron extraídos y reconocidos por medio de antiseros homólogos específicos. La mayoría de los estreptococos patógenos para el hombre pertenecen a los grupos A,B,C,D,F e G (1). Los estreptococos del grupo E son aislados muy raramente. Los métodos de extracción han sido modificados y hoy están disponibles reactivos diferentes basados en reacciones químicas y enzimáticas (1,2,3,4).

En el kit STREPTOSLIDE se usa una simple extracción química sin incubación alguna (micro método con ácido saltral) que permite la identificación de los grupos A,B,C,F y G usando como reactivos una suspensión de partículas de látex de poliestireno sensibilizadas con anticuerpos específicos para los respectivos antígenos de grupo. El grupo D normalmente se identifica con el látex específico para el grupo D para reacción directa sin extracción. Los aislados que resultan negativos hacia todos los grupos y se sospecha pertenecer al grupo D, son probados con acción lítica de solución enzimática y examinados nuevamente con el látex específico para el grupo D.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Algunas colonias de estreptococos son diluidas en la mezcla reactiva adecuada para la extracción del antígeno de grupo. Se hace reaccionar una alícuota de la suspensión con látex sensibilizado con inmunoglobulinas específicas para un determinado antígeno de grupo. Un aglutinado evidente identifica el grupo de pertenencia.

4. COMPONENTES DEL KIT**LATEX** GRUPOS LÁTEX A,B,C,D,F,G 6 frascos cuentagotas x 2,5 mL

Contenido: Suspensiones de partículas de látex de poliestireno sensibilizadas con inmunoglobulinas (de conejo) específicas para el antígeno de grupo A,B,C,D,F, o G, respectivamente. Listas para su uso.

REAGENT 1 REACTIVO 1 1 x 3 mL

Contenido: Solución de nitrito sódico.

REAGENT 2 REACTIVO 2 1 x 3 mL

Contenido: Ácido acético diluido en una solución de metilnaranja.

REAGENT 3 REACTIVO 3 2 x 4 mL

Contenido: Solución de carbonato de amonio. Contiene ázida sódica al 0,09%.

LYTIC ENZYME ENZIMA LÍTICO liófilo 2 x 2 mL

Contenido: Extraente enzimático.

Preparación: Liofilizado, reconstituir con 2.0 mL de agua destilada.

	Capítulo
Cambio introducido en la revisión actual	4, 6, Leyenda

INFORMACIONES Y PRECAUCIONES

Reactivo 1, Reactivo 2, Reactivo 3 y Enzima Lítico son clasificados y etiquetados como peligrosos según las directivas europeas vigentes. Todas las informaciones de seguridad son contenidas en la Ficha de Datos de Seguridad.

CONTROL + CONTROL POSITIVO 1 x 0,5 mL

Contenido: Extracto celular polivalente que contiene 0,09% azida sódica como conservante.

OTROS MATERIALES

- portaobjetos con fondo negro, con 8 círculos.
- 200 palitos para mezclar
- Solución Fisiológica

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

- Pipetas de 25 µl
- Material de laboratorio

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C. La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja.

Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de la abertura y/o de la preparación

REACTIVO	CONDICIONES
LÁTEX	3 meses
REACTIVO 1	3 meses
REACTIVO 2	3 meses
REACTIVO 3	3 meses
ENZIMA LÍTICO	5 semanas
CONTROL POSITIVO	3 meses

6. PRECAUCIONES DE USO

SOLAMENTE PARA USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO. CONSERVAR A 2-8°C

Todos los materiales de origen humano deben manipularse según las prácticas de seguridad comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio. Cualquier muestra debe ser considerada potencialmente infecciosa.

Desecho de los residuos: las muestras y los reactivos se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos, según disposiciones normativas vigentes.

Informaciones de Salud y Seguridad**1. CUIDADO: Algunos reactivos requieren particular cuidado como evidenciado en la etiqueta.**

Reactivo 1:

Advertencia: Peligro

Contenido: Sodium Nitrate

INDEX No. 007-010-00-4

Indicaciones de peligro: H272 – Puede agravar un incendio; comburente; H301 – Tóxico en caso de ingestión; H400 – Muy tóxico para los organismos acuáticos

Consejos de prudencia: P210 – Mantener alejado de fuentes de calor, chispas, llama abierta o superficies calientes. — No fumar; P220 – Mantener o almacenar alejado de la ropa/.../materiales combustibles; P221 – Tomar todas las precauciones necesarias para no mezclar con materias combustibles...; P264 – Lavarse ... concienzudamente tras la manipulación; P270 – No comer, beber ni fumar durante su utilización; P273 – Evitar su liberación al medio ambiente; P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección; P301+P310 – EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico; P330 – Enjuagarse la boca; P370+P378 – En caso de incendio: Utilizar agua, espuma, CO₂ para apagarlo; P391 – Recoger el vertido; P405 – Guardar bajo llave; P501 – Eliminar el contenido/el recipiente conforme a la reglamentación.

	Capítulo
Cambios introducidos en la revisión actual	4, 6, Leyenda

Reactivo 2:Advertencia: AtenciónContenido: Acetic Acid

INDEX No. 607-002-00-6

Indicaciones de peligro: H315 – Provoca irritación cutánea; H319 – Provoca irritación ocular graveConsejos de prudencia: P264 – Lavarse ... concienzudamente tras la manipulación; P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección; P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes; P305+P351+P338 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 aclarandoReactivo 3:Advertencia: AtenciónIndicaciones de peligro: H315 – Provoca irritación cutánea; H319 – Provoca irritación ocular graveConsejos de prudencia: P264 – Lavarse ... concienzudamente tras la manipulación; P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección; P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes; P305+P351+P338 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 aclarandoEnzima Lítico:Advertencia: PeligroIndicaciones de peligro: H300 – Mortal en caso de ingestión; H315 – Provoca irritación cutánea; H319 – Provoca irritación ocular grave; H335 – Puede irritar las vías respiratorias; H411 – Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderosConsejos de prudencia: P273 – Evitar su liberación al medio ambiente; P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección; P301+P310 – EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico; P330 – Enjuagarse la boca; P304+P340 – EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar; P305+P351+P338 – 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.

EUH032 – En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos

- No pipetear por vía oral. Usar los guantes de un solo uso y la protección para los ojos al manejar las muestras y durante la prueba. Lavar las manos a fondo después de terminar el test.
- Los reactivos contienen Ázida Sódica (0.09%) que puede reaccionar con cobre y plomo y formar ázidas metálicas potencialmente explosivas.
- Si cualquier reactivo entra en contacto con la piel u ojos, lavar con mucha agua.
- El derramamiento de los materiales potencialmente infecciosos se debe retirar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada tendrá que ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1%, antes de que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar para derramamientos que contengan ácido antes de que la zona sea enjuagada. Todos los materiales utilizados para limpiar derramamientos incluido los guantes, se deben tratar como residuo potencialmente infeccioso. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.
- El Reagent 3 es alcalino (pH >9) y puede desarrollar vapores de amoníaco. **Evitar el contacto con las mucosas.**

Precauciones analíticas**1.Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso.** Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada.

2.No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que ésta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos

3.No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable entre lotes.

4.La reacción se puede ejecutar sobre un agitador rotatorio. Regular la velocidad a 100 ± 10 rpm.

5.La reacción de aglutinación se interpreta mejor observando el portaobjetos bajo una lámpara.

	Capítulo
Cambios introducidos en la revisión actual	4, 6, Leyenda

6.Efectuar una coloración de Gram para confirmar la presencia de estreptococos

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

Se pueden utilizar estreptococos de cultivos primarios mixtos sobre medios sólidos, si están presentes en cantidad suficiente y en colonias bien aisladas. El medio elegido es Agar Sangre, que permite la observación de la reacción de hemólisis antes de efectuar la reacción de identificación del grupo. Caldocultivos de por lo menos 4 horas pueden ser igualmente utilizados.

8. PROCEDIMIENTO

- REACCIÓN PARA LOS GRUPOS A,B,C,F y G:

Dispensar una gota de Reactivo 1 y una de Reactivo 2 en una cubeta pequeña. Recoger con la ansa (o con un palito) 1-5 colonias bien aisladas y diluirlas en la cubeta hasta una suspensión homogénea. Añadir 2 gotas del Reactivo 3 y mezclar. Desde el caldocultivo recoger 25 µL y proceder como se ha descrito anteriormente. Agitar con cuidado los Grouping latex A, B, C, F e G. Dispensar una gota del primer látex sobre el primer círculo de reacción y una gota de cada uno de los otros en los sucesivos. Depositar sobre cada círculo 25 µL de extracto recogiendo desde la cubeta. Mezclar con cuidado con un palito y girar el portaobjetos durante 1 minuto. Observar cada círculo para ver una aglutinación evidente (reacción de identificación positiva.) Cuando haya, desde el principio, una sospechosa presencia de estreptococos del grupo D se puede efectuar enseguida la prueba directa para las colonias sospechas con el Grouping latex D. Si el resultado es negativo, se puede proceder con la extracción enzimática.

- REACCIÓN DIRECTA PARA EL GRUPO D:

4-5 colonias aisladas se diluyen sobre un círculo de reacción del portaobjetos junto a una gota de Solución Fisiológica. Añadir una gota de Grouping latex D, mezclar con un palito, girar y observar el eventual aglutinado que se forma dentro de un minuto. Un aglutinado evidente indica que las colonias son constituidas por estreptococos de grupo D. Con este método se identifican la mayoría de las cepas del grupo D.

- EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA PARA EL GRUPO D:

Utilizando el Enzima lítico, el porcentaje de las cepas correctamente identificadas como pertenecientes al grupo D alcanza el valor máximo. Reconstituir el liofilizado con agua destilada y dispensar 100 µL (2 gotas) en una cubeta pequeña. Diluir 1-5 colonias recogidas con el ansa (o con un palito) en el extracto enzimático e incubar durante 10 minutos a 37° C. En un círculo de reacción del portaobjetos depositar una gota de Grouping latex D y 25 µL de extracto, mezclar con un palito, girar y observar. Un aglutinado evidente dentro de un minuto indica reacción positiva para la identificación de estreptococos del grupo D.

9. VALIDACIÓN DEL TEST

Poner 25 µL de control positivo polivalente en cada círculo del portaobjetos y añadir 1 gota de cada látex, se tendrán que obtener con cada Grouping latex reacciones positivas (aglutinación evidente) dentro de un minuto.

10. LIMITACIONES

Si existe certeza de la identificación de la familia, la ausencia de aglutinación en todas las condiciones descritas en el método puede depender de una recogida insuficiente. La aglutinación específica de todos los latex puede ser debida a la presencia de receptores Fc en la pared bacterial.

11. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Utilizando cepas obtenidas desde aislados clínicos y colecciones se verificó que la especificidad y la sensibilidad de la prueba son del 100%.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Topley and Wilson's VII Ed. Vol. 2 pag. 173-217 (1983)
2. Slifkin M., Gil G.M. J. Clin. Microbiol. 15, 187-189 (1982)
3. Calandra G.B., Henson C.L. J. Clin. Microbiol. 15, 184-189 (1982)
4. Slifkin M., Cumbie R.J. Clin. Microbiol. 25, 1555-1556 (1987).

	Capítulo
Cambios introducidos en la revisión actual	4, 6, Leyenda

	EN	Date of manufacture
	ES	Fecha de fabricación
	IT	Data di fabbricazione
	EN	Use By
	ES	Fecha de caducidad
	IT	Utilizzare entro
	EN	Caution, consult accompanying documents
	ES	Atención, ver instrucciones de uso
	IT	Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso
	EN	Manufacturer
	ES	Fabricante
	IT	Fabbricante
	EN	Contains sufficient for <n> tests
	ES	Contenido suficiente para <n> ensayos
	IT	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	EN	Temperature limitation
	ES	Límite de temperatura
	IT	Limiti di temperatura
	EN	Consult Instructions for Use
	ES	Consulte las instrucciones de uso
	IT	Consultare le istruzioni per l'uso
	EN	Biological risks
	ES	Riesgo biológico
	IT	Rischio biologico
	EN	Catalogue number
	ES	Número de catálogo
	IT	Numero di catalogo
	EN	In Vitro Diagnostic Medical Device
	ES	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	IT	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	EN	Batch code
	ES	Código de lote
	IT	Codice del lotto



Diesse Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) – Italy
Tel. 0577-587111