

## VERWENDUNGSZWECK

Der DIAMONDIAL Strep Kit ist ein schneller Nachweistest zur serologischen Identifizierung der Lancefield-Streptokokken Gruppe A, B, C, D, F und G aus der Kultur.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Klinische, epidemiologische und mikrobiologische Studien haben eindeutig gezeigt, dass die auf klinischen Symptomen beruhende Diagnostik von Streptokokken-Infektionen immer eine mikrobiologische Überprüfung erfordert (4). Beta-hämolytische Streptokokken sind innerhalb der Gattung Streptococcus die am häufigsten aus menschlichem Probenmaterial isolierten Krankheitserreger. Fast alle beta-hämolytischen Streptokokken besitzen spezifische Kohlenhydrat -Antigene (Streptokokken-Gruppen-Antigene). Lancefield zeigte, dass diese Antigene in flüssiger Form extrahiert und durch Präzipitations-Reaktionen mit homologen Antiseren identifiziert werden können. Gegenwärtig existieren verschiedene Methoden zur Extraktion von Streptokokken-Antigenen (1,2,6,7,10,11). Der DIAMONDIAL Strep Kit beruht auf der Freisetzung von spezifischen Antigenen aus der Bakterienzellwand durch eine modifizierte Extraktion mit salpetriger Säure. Das extrahierte Antigen stellt in Verbindung mit der Latex-Agglutination eine schnelle, sensitive und spezifische Methode zur Identifizierung von Streptokokken der Gruppen A, B, C, D, F und G aus der Primärkultur dar.

## TESTPRINZIP

Die Streptokokken Grouping-Methode umfasst die chemische Extraktion der gruppenspezifischen Kohlenhydrat-Antigene unter Verwendung einer speziell entwickelten Extraktion mit salpetriger Säure. Die im Kit vorhandenen Extraktionsreagenzien 1 und 2 enthalten eine chemische Substanz, die die Extraktion des gruppenspezifischen Antigens bei Raumtemperatur ermöglicht. Extraktionsreagenz 3 enthält eine Neutralisierungslösung. Die neutralisierten Extrakte können ganz einfach durch den Einsatz von blauen Latexpartikeln, die mit gereinigten, gruppenspezifischen Immunglobulinen aus Kaninchen sensibilisiert wurden, identifiziert werden. Diese blauen Latexpartikel agglutinieren stark in Gegenwart von homologem Antigen; bei dessen Abwesenheit findet keine Agglutination statt.

## MITGELIEFERTER MATERIALIEN

Jeder Kit ist ausreichend für 60 Streptokokken-Gruppierungs-Tests.

Die Materialien sind gebrauchsfertig.

**Latex-Suspensionen:** Jedes Fläschchen enthält 3,0 ml blaue Latexpartikel, beschriftet mit gereinigten Kaninchenantikörpern gegen Streptokokken der Gruppe A, B, C, D, F oder G. Die blauen Latexpartikel sind in Puffer, pH 7,4, suspendiert, der 0,098% Natriumazid als Konservierungsmittel enthält.

**Strep Control:** Eine (1) Flasche mit 2 ml gebrauchsfertigen polyvalenten Antigenen aus inaktivierten Streptokokken der Lancefield-Gruppen A, B, C, D, F und G, der 0,098% Natriumazid als Konservierungsmittel enthält. Bei den zur Antigenherstellung verwendeten Stämmen handelt es sich um die ATCC-Stämme, die im Abschnitt „ERFORDERLICHE, NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN“ aufgeführt sind.

**Strep Extraction 1:** Ein Tropfenspender mit 3,2 ml Extraktionsreagenz 1, enthält 0,098 % Natriumazid als Konservierungsmittel.

**Strep Extraction 2:** Ein Tropfenspender mit 3,2 ml Extraktionsreagenz 2.

**Strep Extraction 3:** Zwei Tropfenspender mit jeweils 8 ml Extraktionsreagenz 3, enthält 0,098 % Natriumazid als Konservierungsmittel.

## Alle Kit Bestandteile sind separat erhältlich:

Strep Latex Gruppe A	DML1002
Strep Latex Gruppe B	DML1003
Strep Latex Gruppe C	DML1004
Strep Latex Gruppe D	DML1005
Strep Latex Gruppe F	DML1006
Strep Latex Gruppe G	DML1007
Strep Extraktion 1	DML1008
Strep Extraktion 2	DML1009
Strep Extraktion 3	DML1010
Strep Kontrolle	DML1011
Einweg Misch-Stäbchen	DML1012
Agglutinationskarten	DML1018

## ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTER MATERIALIEN

Impfösen, Pasteur-Pipetten, Borosilikat-Reaktionsröhrchen 12 mm x 75 mm, Stoppuhr

## STABILITÄT UND LAGERUNG

Alle Bestandteile des Kits müssen bei 2-8°C gelagert werden. **Nicht einfrieren.** Unter diesen Bedingungen gelagerte Reagenzien sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum einsetzbar.

## VORSICHTSHINWEISE

- Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr einsetzen.
- Einige Reagenzien enthalten Natriumazid. Natriumazid kann in Kontakt mit Kupfer oder Blei explosiv reagieren. Obwohl die Natriumazid-Konzentration im Reagenz minimal ist, sollte beim Entsorgen gebrauchter Reagenzienreste immer mit ausreichend Wasser nachgespült werden. Während des Umganges mit dem Test und der Entsorgung der klinischen Proben sollten alle geltenden Sicherheitsvorschriften eingehalten werden, da es sich um infektiöses Material handeln könnte.
- Das Extraktionsreagenz enthält eine leicht ätzende Substanz. Im Falle eines Hautkontakts die betroffene Stelle unverzüglich mit Seife und reichlich Wasser waschen. Bei Kontakt mit den Augen, mindestens 15 Minuten lang spülen.
- Im Umgang sowie bei Verarbeitung und Entsorgung aller klinischen Proben sind allgemein geltende Sicherheitsmaßnahmen einzuhalten. Sämtliche Testmaterialien sind während und nach der Bearbeitung als potenziell infektiös zu betrachten und daher entsprechend zu behandeln und zu entsorgen.
- Der Kit ist ausschließlich für den Einsatz in der in-vitro-Diagnostik konzipiert.
- Alle in dieser Testanleitung enthaltenen Hinweise zur Testdurchführung und -aufbewahrung sowie zu Vorsichtsmaßnahmen und Verfahrenseinschränkungen müssen genau befolgt werden, um gültige Ergebnisse zu erzielen.
- Diese Reagenzien enthalten Materialien tierischen Ursprungs und sind daher als potenzielle Träger und Überträger von Krankheiten zu behandeln.

## PROBEGEWINNUNG UND KULTURVORBEREITUNG

Zur genauen Anleitung der Probengewinnung und Herstellung einer Primärkultur sollte mikrobiologisches Standardliteratur herangezogen werden. Generell sollte ein frisches (18-24 Std.), grampositives, beta-hämolytisches (5% Schafblut-Agar) Isolat aus Streptokokken-Kolonien eingesetzt werden.

Eine bis vier große Kolonien reichen für den Test aus. Im Falle sehr kleiner Kolonien sollte eine größere Anzahl Kolonien (ca. eine Impföse voll) eingesetzt werden.

## TESTDURCHFÜHRUNG

Vor Gebrauch alle Bestandteile auf Raumtemperatur bringen (22°C-28°C).

- Die Latex-Reagenzien durch mehrmaliges leichtes Schwenken der Tropfflasche resuspendieren. Die Tropfflasche inspizieren, um sicherzustellen, dass die Latex-Partikel vor der Verwendung ordnungsgemäß suspendiert wurden. Nicht verwenden, wenn die Latex-Partikel nicht resuspendiert wurden.
- Für jede Probe ein Röhrchen beschriften.
- Einen (1) Tropfen Extraktionsreagenz 1 in jedes Röhrchen geben.
- Mit einer Einweg-Impföse 1-4 beta-hämolytische Kolonien auswählen und im Extraktionsreagenz 1 suspendieren. Falls die Kolonien sehr klein sind, mehrere gut isolierte Kolonien auswählen, bis das Extraktionsreagenz 1 eine Trübung aufweist. Die Streptokokken-Kolonien sollten immer aus Plattenbereichen ausgewählt werden, die die geringste Kontamination aufweisen.
- Einen 1 Tropfen Extraktionsreagenz 2 in jedes Röhrchen geben.
- Reaktionsansatz durch leichtes Antippen des Röhrchens mit dem Finger 5-10 Sekunden mischen.
- Fünf (5) Tropfen Extraktionsreagenz 3 in jedes Röhrchen geben.
- Wie in Schritt 5 beschrieben mischen.
- Je einen Tropfen von jedem blauen Latexreagenz auf die einzelnen Felder der Agglutinations-Testkarte geben.
- Mit Hilfe einer Pasteur-Pipette je einen Tropfen des Probenextraktes neben jeden Latexreagenz-Tropfen auf die Testkarte geben.
- Blauen Latex- und Probenextrakt mit den Mischstäbchen mischen, so dass das gesamte Testfeld ausgefüllt wird. Für jedes Reagenz ein neues Mischstäbchen benutzen.
- Agglutinationskarte vorsichtig schwenken, so dass sich die Mischung über das gesamte Testfeld verteilt.
- Nach einer Minute unter normalen Lichtverhältnissen Agglutination ablesen.

## QUALITÄTSKONTROLLE

Zu den routinemäßigen Verfahren der Qualitätskontrolle für jede Charge zählen Tests der Latex- und Extraktionsreagenzien mit jeder Streptokokken-Gruppe A, B, C, D, F und G unter Verwendung von ATCC- oder gleichwertigen in diesem Abschnitt aufgelisteten Stämmen. Der Extrakt dieser Stämme agglutiniert mit dem homologen Latex-Reagenz. Die polyvalente Positivkontrolle wird zur Untersuchung der einzelnen Latex-Reagenzien verwendet.

Organismus	Lancefield Gruppe	Referenz
Streptococcus pyogenes	Gruppe A	ATCC 19615
Streptococcus agalactiae	Gruppe B	ATCC 12386
Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis	Gruppe C	ATCC 12388
Enterococcus faecalis	Gruppe D	ATCC 19433
Streptococcus sp. Type 2	Gruppe F	ATCC 2392
Streptococcus dysgalactiae subsp. Equisimilis	Gruppe G	ATCC 12394

## AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

**Positive Ergebnisse:** eine rasche und starke Agglutination der blauen Latex-Partikel innerhalb einer Minute mit einem der Latex-Reagenzien zeigt die spezifische Identifizierung des Streptokokken-Isolats an. Eine schwache Reaktion mit einem einzelnen Latex-Reagenz sollte unter Verwendung eines höheren Inokulums wiederholt werden. Die Testwiederholung wird als positiv gewertet, wenn die Agglutination mit nur einem der Latex-Reagenzien auftritt. Abbildung 1 zeigt ein mögliches Schema zur Gruppierung von Streptokokken.

**Negative Ergebnisse:** Keine Agglutination der Latex-Partikel. Sind Spuren von Granulation im Testkreis zu erkennen, ist der Test als negativ zu betrachten.

**Nicht eindeutige Ergebnisse:** Ist im Testkreis nach einer Minute eine schwache Verklumpung (Fäden) zu erkennen, den Test unter Verwendung einer frischen Subkultur wiederholen. Erhält man nach einem neuerlichen Test das gleiche Ergebnis, ist ein biochemischer Test zur Identifizierung des Isolats durchzuführen.

**Unspezifisches Ergebnis:** in seltenen Fällen ist eine Agglutination mit mehr als einer Gruppe zu erkennen. In diesem Fall die Reinheit der für den Test verwendeten Kultur überprüfen. Erscheint diese rein, den Test wiederholen und die Identifizierung des Isolats mit einem biochemischen Test bestätigen.

## VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

- Falsch negative oder falsch positive Ergebnisse können auftreten, wenn nicht-adäquate Mengen des Kulturextraktes oder der Extraktionsreagenzien eingesetzt werden.
- Der Kit dient der Identifizierung von beta-hämolyisierenden Streptokokken. Wenn alpha- oder nicht-hämolytische Streptokokken identifiziert werden, muss das Ergebnis mit biochemischen Methoden abgesichert werden (5,9). (Abb. 1 hinzuziehen).
- Es ist bekannt, dass es mit Organismen nicht verwandter Gattungen, z. B. Escherichia coli, Klebsiella oder Pseudomonas, zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann (3, 8). Diese Organismen reagieren in der Regel mit allen Latexreagenzien unspezifisch.
- Einige Stämme der Gruppe D Streptokokken kreuzreagieren mit Gruppe G Antiseren. Diese Stämme können mit Hilfe des Bile-Esculin Tests als Gruppe D bestätigt werden.
- Listeria monocytogenes kann mit Gruppe B und/oder Gruppe G Streptokokken-Latexreagenz kreuzreagieren, da L. monocytogenes die gleiche Antigenität wie Gruppe B- und G-Streptokokken zeigt. Zur Unterscheidung von Listeria (Katalase-positiv) und Katalase-negativen Streptokokken eignet sich der Katalase-Test. Als weitere Differenzierungskriterien können Gramfärbung und Beweglichkeitstest herangezogen werden.
- Manche Stämme von Streptococcus Milleri (Streptococcus anginosus), typischerweise nicht-hämolyisierend, besitzen A-, C-, F- oder G-Antigene und reagieren positiv mit Strep A-, C-, F-, oder G-Latex-Reagenzien. Um diese Organismen zu identifizieren sind morphologische Bestimmungen auf Blutagar und biochemische Tests durchzuführen.

**LEISTUNGSMERKMALE**

**A. Kreuzreaktivitätsstudien:**

Der Streptokokken Grouping Latex Kit wurde mittels der Testung von 33 ATCC-Referenzstämmen auf Kreuzreaktivität überprüft. Der Kit identifizierte alle Streptokokken der Lancefield Gruppen A, B, C, D, F und G (n=16) erfolgreich. Während der Testung wurde weder eine Kreuzreaktivität mit anderen Streptokokken Stämmen (n=7) noch mit Organismen anderer Gattungen (n=10) festgestellt.

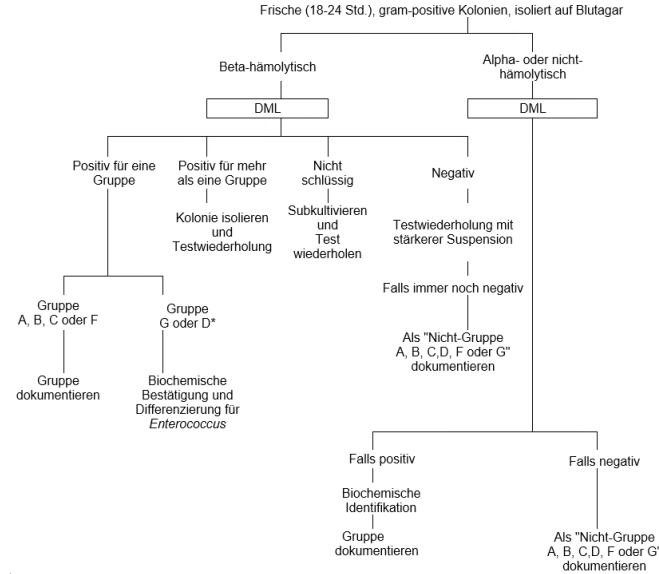
**B. Klinische Studien:**

- Das Streptococcal Grouping Latex Kit wurde als Teil eines Vergleichs von fünf im Handel erhältlichen Tests zur Gruppierung von Streptokokken evaluiert. Die Studie wurde von S. Davies et Al. am Northern General Hospital in Sheffield durchgeführt. Sämtliche Kits wurden auf Grundlage eines Panels von 302 beta-hämolisierenden Streptokokken bestehend aus 64, 67, 44, 55, 56 und 4 der nach Lancefield klassifizierten Gruppen A, B, C, D, G und F getestet. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass 12 Stämme bei keinem der untersuchten Kits eine Gruppierung aufwiesen. Von den übrigen 290 Stämmen wurden mit dem DML Streptococcal Grouping Latex Kit 286 (98,6 %) korrekt identifiziert. Die Autoren zogen den Schluss, dass der DML Streptococcal Grouping Latex Kit sowohl präzise als auch rasche Ergebnisse liefert, wobei die Sensitivität bei 99 % und die Spezifität bei 100 % lag. Darüber hinaus lag die durchschnittliche Agglutinationszeit erheblich unter jenen Werten, die von drei der vier anderen evaluierten Tests erreicht wurden. Daten sind auf Anfrage erhältlich.
- Eine zweite Studie der Leistung des Tests wurde in einem Health Center in Ontario, Kanada durchgeführt. In diese Studie wurden 111 Primärkulturen eingeschlossen (110 getestet, 1 ungeeignet). Alle Stämme waren ursprünglich mittels der Lancefield Präzipitationsreaktion gruppiert worden. Alle Gruppe D Streptokokken wurden biochemisch mittels des BE- (Bile Esculin) und PYR- (Pyrolydonyl-Aminopeptidase) Tests bestätigt. Die Primärkultur wurde parallel mit dem Streptokokken Grouping Kit und einem alter-nativen Produkt getestet. In dieser Studie betrug die Gesamtübereinstimmung zwischen dem des Kits – und den Lancefield Ergebnissen 99% (109 von 110 getesteten Isolaten), während die Gesamtübereinstimmung des Alternativproduktes mit den Lancefield-Ergebnissen bei 96,3% lag (106 von 110 getesteten Isolaten). Die 110 in dieser Studie eingesetzten Primärisolate umfassten 15 Gruppe A-, 40 Gruppe B-, 13 Gruppe C-, 4 Gruppe D-, 11 Gruppe F-, 12 Gruppe G-Streptokokken und 15 nicht identifizierbare Streptokokken-Stämme.

**QUELLEN**

- 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.
- 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.
- Elliot, S.D. and Tai, J.Y. (1978). The Type-Specific Polysaccharides of Streptococcus suis. J. Exp.Med., 148, 1699.
- Facklam, R.R. (1980). Streptococci and Aerococci, Ch. 8 in Manual of Clinical Microbiology, 3rd Ed., Edited by Lennette, E.H. Balows, A., Hausler, W.J., and Truant, J.P. American Society for Microbiology, Washington, D.C. page 88-110.
- Facklam R.R. (1977). Physiological Differentiation of Viridans Streptococci. J. Clin. Microbiol., 5, 184.
- Fuller, A.T. (1938). The Formamide Method for the Extraction of Polysaccharides from Haemolytic Streptococci. Brit. J. Exp. Path., 19, 130.
- Maxted, W.R. (1948). Preparation of Streptococcal Extracts for Lancefield Grouping. Lancet, ii, 255.
- Nowlan, S.S. and Deibel, R.H. (1967). Group Q Streptococci. I. Ecology, Serology, Physiology and Relationships to Established Enterococci. J. Bact., 94, 291.
- Petts, D.N. (1984). Early Detection of Streptococci in Swabs by Latex Agglutination Before Culture. J. Clin. Microbiol., 19, 432.
- Rantz, L.A. and Randall, E. (1955). Use of Autoclaved Extracts of Haemolytic Streptococci for Serological Grouping. Stanford Med. Bull., 13, 290.
- Watson, B.K., Moellering, R.C. and Kunz, L.J. (1975). Identification of Streptococci. Use of Lysozyme and Streptomyces albus filtrate in the Preparation of Extracts of Lancefield Grouping. J. Clin. Microbiol., 1, 274.

**Abbildung 1: EMPFOHLENE VORGEHENSWEISE ZUR GRUPPIERUNG VON STREPTOKOKKEN**



\*Einige Stämme der Gruppe D kreuzreagieren mit Gruppe G Antiseren. [Harvey, C. L. And McIlmurray, M.B. (1984), Eur. J. Clinical Microbiol, 10,641]

	= Verwendbar bis
	= Chargennummer
	= Bestellnummer
	= Hersteller
	= Autorisierter Hersteller in der Europäischen Union
	= Inhalt ausreichend für <n> Tests
	= nur für In vitro Diagnostik
	= Temperaturbeschränkung
	= Gebrauchsanweisung beachten

<b>DML 1008</b>	<p><b>Warnung</b> Warnung Gefahrstoff: Natriumnitrit Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Sehr giftig für Wasserorganismen. Nicht in die Umwelt gelangen lassen. Während der Handhabung nicht essen, trinken oder rauchen. Nach Verwendung Hände gründlich waschen. Verschüttetes Material aufsaugen. BEI VERSCHLUCKEN: Im Falle von Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. Inhalt und Behälter gemäß lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Bestimmungen entsorgen.</p>
<b>DML 1009</b>	<p><b>Gefahr</b> Gefahrstoff: Essigsäure Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. Verursacht schwere Hautverätzungen und Augenschäden. Schutzhandschuhe tragen. Augen- oder Gesichtsschutz tragen: Empfohlen: Schutzbrillen mit Seitenschutz. Schutzkleidung tragen. Empfohlen: Labormantel. Nur im Originalbehälter aufbewahren. BEI EINATMEN: Betroffene Person an die frische Luft bringen und in eine Position bringen, die ruhiges Atmen ermöglicht. Unverzüglich GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. BEI VERSCHLUCKEN: Unverzüglich GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. BEI KONTAKT MIT HAUT (oder Haaren): Kontaminierte Kleidung unverzüglich entfernen. Haut mit Wasser spülen oder duschen. Unverzüglich GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. BEI KONTAKT MIT AUGEN: Unverzüglich GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. Inhalt und Behälter gemäß lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Bestimmungen entsorgen.</p>
<b>DML 1010</b>	<p><b>Warnung</b> Verursacht schwere Augenreizung. Gefahrstoff: Natriumnitrit Schutzhandschuhe tragen. Augen- oder Gesichtsschutz tragen: Empfohlen: Schutzbrillen mit Seitenschutz. Nach Verwendung Hände gründlich waschen. BEI KONTAKT MIT AUGEN: Mehrere Minuten gründlich spülen. Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Fortgesetzt spülen.</p>

Revision 03-2016