

Streptex Kit

R30950501 – 50 testes

Streptex Kit é um kit para identificação rápida de estreptococos do grupo de Lancefield. São fornecidos reagentes para os grupos A, B, C, D, F e G, cobrindo a maioria dos grupos isolados.

No sistema Streptex, utiliza-se uma extração enzimática simples e está disponível um sistema rápido de extração ácida (Streptex Acid Extraction Kit). O uso principal do teste é na identificação do crescimento de estreptococos em placas de Agar, entretanto, foram relatados resultados satisfatórios com extração de uma hora a partir de culturas em caldo puro.

INSTRUÇÕES DE USO

STREPTEX KIT (CÓD. 30950501 – 50 testes)

Kit rápido de aglutinação de látex para a identificação de estreptococos grupos A, B, C, D, F e G.

INTRODUÇÃO

STREPTEX KIT é um sistema de teste látex rápido para uso na detecção qualitativa e identificação de estreptococos do grupo de Lancefield. São fornecidos reagentes para os grupos A, B, C, D, F e G cobrindo a maioria dos grupos isolados,⁶ o estreptococo do grupo E raramente é isolado. A maioria das espécies de estreptococos apresenta antígenos de grupos específicos, os quais são componentes estruturais de carboidratos da parede celular. Lancefield mostrou que esses antígenos podem ser extraídos na forma solúvel e identificados por reações de precipitação com anti soros homólogos.¹² Foram descritos diversos procedimentos para extração dos antígenos.^{3,4,10,13,17,18} No sistema Streptex, utiliza-se uma extração enzimática simples e está disponível um sistema rápido de extração ácida (Streptex Acid Extraction Kit). O uso principal do teste é na identificação do crescimento de estreptococos em placas de Agar, entretanto, foram relatados resultados satisfatórios com extração de uma hora a partir de culturas em caldo puro.⁸

PRINCÍPIO DO TESTE

Antígenos grupo-específicos são extraídos de estreptococos numa etapa simples de incubação. Os antígenos são depois identificados utilizando partículas de látex poliestireno com anticorpos grupo-específicos. Essas partículas de látex aglutinam-se fortemente na presença de antígeno homólogo, permanecendo em suspensão uniforme na ausência do antígeno homólogo.

REAGENTES QUE COMPÕE O KIT STREPTEX:

STREPTEX KIT		50 testes
Látex Teste Grupo A	Partículas de látex poliestireno, revestidas com anticorpo purificado de coelho para o antígeno do grupo A, em suspensão na concentração de 0,5% em tampão fosfato pH 7,4 contendo azida sódica a 0,1%.	1 frasco conta-gotas (tampa azul-clara)
Látex Teste Grupo B	Partículas de látex poliestireno, revestidas com anticorpo purificado de coelho para o antígeno do grupo B, em suspensão na concentração de 0,5% em tampão fosfato pH 7,4 contendo azida sódica a 0,1%.	1 frasco conta-gotas (tampa rosa)
Látex Teste Grupo C	Partículas de látex poliestireno, revestidas com anticorpo purificado de coelho para o antígeno do grupo C, em suspensão na concentração de 0,5% em tampão fosfato pH 7,4 contendo azida sódica a 0,1%.	1 frasco conta-gotas (tampa marrom)
Látex Teste Grupo D	Partículas de látex poliestireno, revestidas com anticorpo purificado de coelho para o antígeno do grupo A, em suspensão na concentração de 0,5% em tampão fosfato pH 7,4 contendo azida sódica a 0,1%.	1 frasco conta-gotas (tampa azul-escuro)
Látex Teste Grupo F	Partículas de látex poliestireno, revestidas com anticorpo purificado de coelho para o antígeno do grupo F, em suspensão na concentração de 0,5% em tampão fosfato pH 7,4 contendo azida sódica a 0,1%.	1 frasco conta-gotas (tampa cinza)
Látex Teste Grupo G	Partículas de látex poliestireno, revestidas com anticorpo purificado de coelho para o antígeno do grupo G, em suspensão na concentração de 0,5% em tampão fosfato pH 7,4 contendo azida sódica a 0,1%.	1 frasco conta-gotas (tampa amarela)
Controle Positivo Polivalente	Contém extrato polivalente de antígenos de uma cepa representativa de cada grupo estreptocócico A, B, C, D, F e G. A solução contém tampão fosfato pH 7,4 e azida sódica a 0,1% como conservante.	1 frasco conta-gotas (tampa vermelha)-2ml
Potencialmente Infeciente		
Enzima de Extração	Contém fração proteolítica liofilizada obtida de culturas de <i>Streptomyces griseus</i> . Após	2 frascos-11ml após reconstituição

reconstituição, a Solução de Trabalho contém Bromopol a 0,01% como conservante.	
Bastões de Mistura Descartável	Quantidade suficiente para 50 testes
Cartões de Reação Descartáveis	Quantidade suficiente para 50 testes
Folheto de Instruções de Uso	✓

Nota: Os frascos conta-gotas específicos para cada um dos grupos A,B,C,D,F e G contém 1 mL, volume suficiente para a realização de 50 determinações/frasco.

Materiais Necessários mas não-fornecidos

Pipeta para medir e dispensar volumes de 0,4 mL.
Alça bacteriológica.

Pipetas de Pasteur para dispensar gotas de 40 µL.

Banho-maria a 37°C.

Tubos de vidro ou plástico de 8 a 12 mm de diâmetro interno, um por microrganismo a ser identificado.

Armazenamento e Prazo de Validade

Uma estante de armazenamento removível contendo todos os reagentes que necessitam de refrigeração acompanha cada kit. Todos os reagentes devem ser armazenados a 2°C - 8°C, condição sob a qual mantém a atividade até a data de expiração do kit. A Enzima de Extração reconstituída deve ser armazenada a 2°C - 8°C, condição sob a qual manterá a atividade por, no mínimo, três meses após a reconstituição ou até a data indicada no rótulo do frasco, ou o que ocorrer primeiro. Alternativamente, a Enzima pode ser armazenada em alíquotas congeladas entre -15°C e -25°C, condição em que manterá a atividade por, no mínimo, seis meses ou até a data indicada no rótulo do frasco original, ou o que ocorrer primeiro. **NÃO CONGELAR E DESCONGELAR MAIS DE UMA VEZ.**

Cuidados e Precauções

Os reagentes são somente para uso diagnóstico *in vitro*.
Consultar o rótulo do produto para informações sobre componentes potencialmente infectantes.

Informações sobre Saúde e Segurança

- De acordo com os princípios das Boas Práticas de Laboratório, recomenda-se enfaticamente que extratos, em qualquer etapa de teste, devem ser tratados como potencialmente infectantes e manipulados com todas as precauções necessárias.
- Deve-se esterilizar os utensílios não-descartáveis após o uso por qualquer procedimento adequado, embora o método preferível seja autoclavá-los por 15 minutos a 121°C; os descartáveis devem ser autoclavados ou incinerados.

Derramamentos de materiais potencialmente infectantes devem ser imediatamente removidos com papel absorvente e a área contaminada limpa com material umedecido com um desinfetante bactericida padrão ou álcool a 70%. **NÃO** utilizar hipoclorito de sódio. Os materiais utilizados para limpar derramamentos, incluindo luvas, devem ser descartados como resíduo biohazard.

- Não pipetar com a boca. Utilizar luvas descartáveis e proteção visual ao manipular as amostras e realizar o ensaio. Lavar bem as mãos ao terminar.
- Os componentes desse kit contêm azida sódica a 0,1% como conservante. As azidas podem reagir com cobre e chumbo usados em alguns encanamentos, formando sais explosivos. As quantidades utilizadas neste kit são pequenas; apesar disso, ao descartar materiais contendo azida, utilizar bastante água.
- Os reagentes não são considerados prejudiciais à saúde quando utilizados de acordo com os princípios das Boas Práticas de Laboratório, bons procedimentos de higiene ocupacional e as Instruções de Uso.

Precauções Analíticas

- Não utilizar os reagentes depois da data de expiração do kit.
- Deve-se evitar contaminação microbiológica dos reagentes, pois isto pode reduzir a vida útil do produto e produzir resultados errôneos.
- Permitir que todos os reagentes e amostras atinjam a temperatura ambiente (18°C a 30°C) antes do uso. Retornar os reagentes para a temperatura recomendada de armazenamento imediatamente após o uso. Reagentes de Látex que apresentarem sinais de agregação quando dispensados pela primeira vez podem ter sido congelados e não devem ser utilizados.
- Armazenar Reagentes de Látex na posição vertical a 2°C - 8°C. Após armazenamento prolongado, Reagentes de Látex podem apresentar alguns sinais de agregação ou ressecamento ao redor da parte superior do frasco. Sob essas condições, os Reagentes de Látex devem ser agitados vigorosamente por alguns segundos até completa ressuspensão.

- Se houver contaminação da solução de Enzima de Extração, constatada pelo aumento da turbidez durante o armazenamento, deverá ser descartada.
- É importante segurar os frascos conta-gotas na vertical e que a gota se forme na ponta do conta-gotas. Se a ponta do conta-gotas ficar molhada, uma gota de volume incorreto irá se formar ao redor da extremidade e não na ponta, se isso ocorrer, secar a ponta do conta-gotas antes de continuar.
- Não tocar as áreas de reação nos cartões.

Reconstituição e Preparação de Reagentes para Uso

Enzima de Extração. Reconstituir um frasco de Enzima de Extração adicionando 11 ml de água destilada estéril. Para facilitar a dissolução, deixar descansar por alguns minutos com agitação circular e inversão ocasionais.

Coleta de Amostra e Preparação de Culturas

Deve-se consultar um livro-texto padrão para detalhes sobre coleta de amostra e preparação de culturas primárias.⁶ O meio utilizado normalmente inclui agar sangue e, nesse caso, a reação hemolítica de colônias com suspeita de estreptococos deve ser observada antes das tentativas de grupamento. O crescimento de estreptococos em cultura mista em meio de isolamento primário sólido pode ser seguramente feito diretamente se não houver supercrescimento de microrganismos como *Klebsiella*, *Escherichia* ou *Pseudomonas* que podem aglutinar de forma inespecífica todos os reagentes de látex. O grupamento Streptex não deve ser observado em culturas primárias ou subculturas impuras que parecem conter estreptococos (se não for obtido um resultado claro), recomenda-se que sejam preparadas subculturas puras das colônias suspeitas para identificação posterior por Streptex. Microrganismos dos grupos A, B, C, F ou G são normalmente beta-hemolíticos. Se um microrganismo alfa ou não-hemolítico parecer pertencer a um desses grupos, deve-se confirmar a identificação da espécie por testes bioquímicos.^{7,16} Como os enterococos são relativamente resistentes a penicilina, deve-se realizar a diferenciação de microrganismos do Grupo D em enterococos (*Enterococcus* spp.) e não-enterococos (estreptococos do Grupo D) por um teste de hidrólise com L-pirrolidoniil- β -nftilamida (PYR) ou por cultura em caldos de bile-esculina e NaCl a 6,5% (Figura 3). A produção de antígeno pelos estreptococos do Grupo D é altamente melhorada pela adição de glicose a 0,5% - 1,0% ao meio,¹⁴ porém, com Agar sangue a reação hemolítica será mascarada.

Procedimento do Teste

Cuidado: Deve-se tomar as precauções adequadas para manuseio de culturas vivas ao realizar os testes. A Figura 3 apresenta um esquema sugerido de grupamento de microrganismos de culturas primárias ou sub-culturas.

ETAPA 1	Dispensar 0,4 mL de Enzima de Extração em um tubo de ensaio adequadamente rotulado para cada cultura a ser agrupada.
ETAPA 2	Com uma alça bacteriológica, preparar uma suspensão leve da cultura num tubo de solução de enzima. Uma única área de crescimento deve ser suficiente; frequentemente é possível obter um resultado coletando apenas 5 colônias grandes para emulsificar na enzima, se aderirem adequadamente à alça. Se a colônia não for pura, recomenda-se que sejam coletadas colônias de estreptococos de uma área com menor número possível de contaminantes.
ETAPA 3	Inubar a suspensão a 37°C em banho-maria (ou em um bquer com água em temperatura estável de 37°C em um incubador) por, no mínimo, 10 minutos ou qualquer período de tempo até 1 hora. Agitar o tubo após 5 minutos de incubação.
ETAPA 4	Re suspender cada uma das suspensões de látex agitando vigorosamente por alguns segundos. Segurar o frasco conta-gotas na vertical e dispensar uma gota (20 μ l) de cada suspensão de látex em um círculo separado no Cartão de Reação. Nota: É importante segurar os frascos conta-gotas na vertical e que a gota se forme na ponta do conta-gotas. Se a ponta do conta-gotas ficar molhada, uma gota de volume incorreto irá se formar ao redor da extremidade e não na ponta; se isso ocorrer, secar a ponta do conta-gotas antes de continuar.
ETAPA 5	Com uma pipeta de Pasteur, colocar uma gota (40 μ l) de extrato em cada um dos seis círculos do cartão de reação.

ETAPA 6	Misturar os conteúdos em cada círculo com um bastão de mistura e espalhar para cobrir toda a área do círculo. Utilizar um bastão para cada círculo e descartá-lo em recipiente de segurança após o uso.
ETAPA 7	Agitar levemente o cartão por, no máximo, um minuto. O cartão deve ser mantido na distância normal de leitura (25 cm a 35 cm) dos olhos. Não utilizar lentes de aumento. Os padrões obtidos são evidentes e podem ser reconhecidos facilmente sob condições normais de iluminação.
ETAPA 8	Descartar o Cartão de Reação usado em recipientes de segurança.
ETAPA 9	Garantir que todos os reagentes voltem ao refrigerador; utilizar a estante de armazenamento fornecida.

Leitura dos Resultados

O resultado é positivo quando há desenvolvimento de um padrão de aglutinação, apresentando grumos nitidamente visíveis das partículas de látex. (Figura 1).

A velocidade de aparecimento e a qualidade da aglutinação dependem do teor do extrato de antígeno; com um extrato forte, aparecerão grandes grumos de partículas de látex em alguns segundos de mistura; mas com um extrato fraco, a reação demorará muito mais para aparecer e os grumos de partículas de látex serão pequenos.

Figura 1

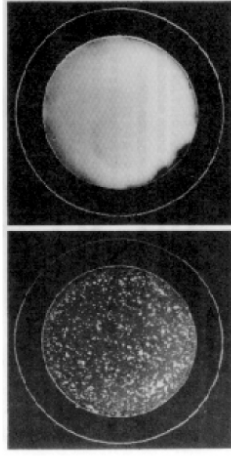


Figura 2

O resultado é negativo quando o látex não aglutina e a aparência leitosa permanece basicamente inalterada durante todo o um minuto de teste (Figura 2). Observar, no entanto, que traços fracos de granulação podem ser detectados em padrões negativos, dependendo da acuidade visual do técnico.

Interpretação dos Resultados

Como regra geral, somente os estreptococos beta-hemolíticos fornecem resultados confiáveis nos procedimentos de grupamento.^{6,8} Existem exceções a essa regra, uma vez que a maioria das cepas de estreptococos do Grupo D é alfa-hemolítica ou não-hemolítica e algumas cepas do Grupo B são não-hemolíticas. Microrganismos do Grupo D devem ser classificados ainda como enterococos ou estreptococos do Grupo D por cultura em caldos de bile-esculina e NaCl a 6,5% ou teste PYR⁶, os que reagem com os Grupos A, C, F ou G podem, se necessário, ser identificados por procedimentos bioquímicos adequados.¹⁶ Aglutinação rápida e forte em apenas uma das seis suspensões de látex indica a identidade da cepa testada e reações fracas e retardadas com o mesmo extrato devem ser ignoradas. Força de aglutinação semelhante em mais de uma suspensão de látex (mas não de todas) indica que o extrato pode conter uma mistura de grupos estreptocócico ou outras bactérias contendo antígenos que reagem de modo cruzado devendo ser realizados novos procedimentos de isolamento e/ou testes bioquímicos. Foram identificadas algumas cepas de estreptococos do Grupo D que, aparentemente também têm antígeno do Grupo G.^{1,11} Essas cepas reagem tanto com reagentes do Grupo D como do Grupo G e podem ser confirmadas como Grupo D pelo teste bile-esculina, se desejável.⁶ Por razões epidemiológicas e porque algumas dessas cepas apresentam um nível excepcionalmente alto de resistência a antibióticos,¹ é importante que sejam identificadas corretamente.

Uma reação fraca e demorada em uma única suspensão de látex normalmente indica a identidade da cepa testada e, se possível, o teste deve ser repetido utilizando uma suspensão de células mais concentrada. Quando a aglutinação for muito fraca, a ponto de colocar em dúvida a interpretação, o teste de especificidade descrito em Procedimentos de Controle de Qualidade (b) deve ser realizado: a comparação com os dois padrões indicará o resultado correto.

A aglutinação de todos os reagentes de látex, que caracteristicamente tem aparência filamentososa ou fibrosa, indica (a) superinoculação da Enzima de Extração;

nesse caso, a extração pode ser repetida utilizando uma suspensão menos concentrada ou (b) contaminação por microorganismo interferente (vide Limitações do Procedimento) que deve ser eliminada por subcultura posterior. Falsa aglutinação decorrente de uma dessas causas pode normalmente ser eliminada por

aquecimento do extrato em água sob ebulição por três minutos. Se nenhuma das suspensões de látex apresentar aglutinação, é provável que a cultura não pertença a nenhum dos grupos cobertos pelo teste. Resultados negativos também podem ser decorrentes do uso de muito poucos organismos para a extração, particularmente com cepas do Grupo D - algumas das quais produzem menos antígeno do que outros grupos - e cepas do Grupo F, cujas colônias são minúsculas - algumas das quais aderem fortemente à superfície do ágar. Se um estreptococo identificado em cultura não produzir aglutinação nitida com nenhuma das suspensões de látex, pode ser desejável repetir a extração com uma quantidade maior de cultura.

Procedimentos de Controle de Qualidade

Inicialmente, o laboratório deve checar cada lote antes do uso para verificar o desempenho do produto utilizando grupos estreptocócicos conhecidos.

Em uso normal, o desempenho do teste é garantido pela presença de aglutinação nitida em apenas uma suspensão de látex, com ausência de aglutinação nas outras cinco suspensões. Esse padrão de reação pode ser considerado, na maioria dos casos, como suficiente para demonstrar a especificidade dos reagentes e a eficiência do procedimento de extração enzimática. Quando houver um padrão diferente de reação, recomenda-se os seguintes procedimentos:

a) Teste da reatividade das suspensões de látex (Procedimento de Controle Positivo)

Dispensar uma gota (20 µl) de Controle Positivo Polivalente em vez da amostra em teste ou adicionalmente a ela após um minuto sem ter ocorrido reação. Misturar os componentes de cada círculo com um bastão de mistura novo cobrindo a área do círculo. Após agitar o cartão suavemente por um minuto, deve ocorrer aglutinação nitida com todos os látex em teste.

b) Teste para especificidade de aglutinação (Procedimento de Controle Negativo)

Para assegurar que a aglutinação de uma suspensão de látex é específica, particularmente em casos de aglutinação muito fraca ou quando mais de uma suspensão aglutinar com um único extrato, repetir o teste positivo (ou os testes) simultaneamente com teste(s) paralelo(s) utilizando uma gota de Enzima de Extração em vez de extrato bacteriano. A suspensão de látex não deve apresentar aglutinação significativa na presença da Enzima de Extração apenas, sendo que o resultado serve como controle para comparação direta com o padrão obtido na presença do extrato bacteriano.

c) Teste de procedimento da enzima de extração

Realizar o procedimento de teste completo numa cultura estoque de um grupo conhecido. Deve-se realizar testes ocasionais com uma variedade de grupos conhecidos para avaliar a exatidão e a eficácia do sistema completo de teste, incluindo o técnico.

Limitações do Procedimento

Podem ocorrer resultados falso-negativos se uma quantidade inadequada de cultura for utilizada para extração (vide Seção Interpretação de Resultados). Algumas cepas de *Streptococcus bovis* e *Enterococcus faecium* (Grupo D) podem não ser facilmente agrupadas. Resultados falso-positivos podem ocorrer ocasionalmente com microorganismos de gênero não-relacionado, por exemplo, *Klebsiella*, *Escherichia* ou *Pseudomonas* que podem aglutinar inespecificamente todos os reagentes látex. No entanto, por exame das características de cultura no meio de produto de crescimento, o técnico pode normalmente eliminar esses microorganismos do teste. Demonstrou-se em alguns estreptococos,^{2,5,15} a existência de antígenos comuns a microorganismos de espécies ou gêneros heterólogos e consequentemente não pode ser eliminada a possibilidade de reações cruzadas desse tipo em sistemas de agrupamento estreptocócico. O antígeno do Grupo D é comum a estreptococos dos grupos Q, R e S.^{5,15} Enterococos são relativamente resistentes à penicilina, mas procedimentos sorológicos não os diferenciam dos estreptococos do Grupo D. Testes bioquímicos podem ser utilizados para esse fim, como a hidrólise PYR ou crescimento em caldo contendo NaCl a 6,5%. Deve-se consultar um livro-texto padrão para detalhes sobre a diferenciação bioquímica de estreptococos.⁶

Características Específicas de Desempenho¹⁹

Realizaram-se estudos clínicos em quatro centros na Grã-Bretanha e dois no Canadá num total de 743 culturas de estreptococos (663 beta-hemolíticas e 80 alfa-hemolíticas ou não-hemolíticas). Testaram-se 290 culturas primárias, 451 subculturas e 2 caldos de cultura. Os resultados obtidos pelo Streptex após extrações de 10 e 60 minutos foram comparados com os encontrados utilizando um método de referência estabelecido.

As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados de 703 culturas de estreptococos dos Grupos A, B, C, D, F e G (638 beta e 65 alfa ou não-hemolíticas). Streptex identificou corretamente 698 culturas (99% de sensibilidade) após 10 minutos de extração e todas as 703 após 60 minutos. Streptex não identificou 4 culturas beta-hemolíticas (1 do Grupo B, 1 do Grupo D, 1 do Grupo F e 1 do Grupo G) após 10 minutos, porém as identificou corretamente após 60 minutos de extração.

Uma cultura beta-hemolítica foi identificada após 10 minutos como G, mas após 60 minutos de extração foi identificada como B. A cultura, fortemente contaminada com *Corynebacterium* sp., não estava disponível para estudo adicional. A *Corynebacterium* sp. dessa cultura não reagiu com Streptex. Outras 13 culturas beta e 3 alfa

ou não-hemolíticas apresentaram reações positivas com mais de um grupo estreptocócico quer pelo teste de referência, ou pelo Streptex ou ambos os métodos. Presumiu-se que essas culturas eram mistas, mas não estavam disponíveis para confirmação. Vinete e quatro culturas estreptocócico não identificadas como Grupo A, B, C, D, F ou G pelo método de referência não reagiram com Streptex.

Tabela 1

Reação	Resultado com STREPTEX KIT						
	A	B	C	D	F	G	N ^p
Método Estabelecido	A	149					
	B	214 ^a				1	1
	C		64				1
	D			120 ^b			1
	F				14		1
	G					137	1

^a = 197 estreptococos beta + 17 alfa ou não-hemolíticos

^b = 72 estreptococos beta + 48 alfa ou não-hemolíticos

Tabela 2

Reação	STREPTEX KIT						
	A	B	C	D	F	G	
Método Estabelecido	A	149					
	B	216 ^a					
	C		64				
	D			121 ^b			
	F				15		
	G					138	

^a = 199 estreptococos beta + 17 alfa ou não-hemolíticos

^b = 73 estreptococos beta + 48 alfa ou não-hemolíticos

Figura 3

Esquema Sugerido para Grupamento de Estreptococos^{2,9}

Verificar a cultura de estreptococos quanto ao tipo de hemólise e características de cultura. (Se alfa-hemolítica, excluir *Streptococcus pneumoniae*).

Preparar sub-cultura se organismo suspeito for escasso ou crescer exageradamente.

