



**GROUP B STREPTOCOCCUS  
CULTURE IDENTIFICATION TEST**  
(bioMérieux ref. 39206 / Gen-Probe Cat. No. 102820/2820)

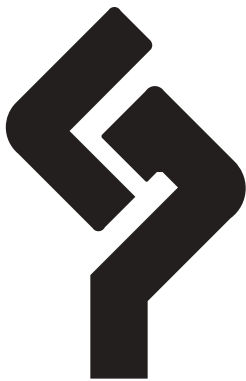
**STREPTOCOCCUS GRUPPE B  
KULTURBESTÄTIGUNGSTEST**  
(bioMérieux Best.Nr. 39206 / Gen-Probe Kat. Nr. 102820/2820)

**TEST D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE  
DU GROUPE B ISOLE D'UNE CULTURE**  
(bioMérieux réf. 39206 / Gen-Probe Cat. No. 102820/2820)

**TEST DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS  
DEL GRUPO B EN CULTIVO**  
(bioMérieux ref. 39206 / Gen-Probe Cat. No. 102820/2820)

**TEST DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCO  
DI GRUPPO B ISOLATO DA UNA CULTURA**  
(bioMérieux cod. 39206 / Gen-Probe Cat. N. 102820/2820)

**ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B  
TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA**  
(bioMérieux ref. 39206 / Gen-Probe Cat. No. 102820/2820)





**GROUP B STREPTOCOCCUS  
CULTURE IDENTIFICATION TEST  
FOR EXPORT USE ONLY**

(bioMérieux ref. 39206 / Gen-Probe Cat. No. 102820/2820)

**INTENDED USE**

The ACCU<sub>PROBE</sub> GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST is a rapid DNA probe test which utilizes the technique of nucleic acid hybridization for the identification of Group B Streptococcus isolated from culture.

**SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST**

Group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*) is one of the leading causes of septicemia and meningitis in newborns. The incidence of Group B disease is estimated to be 2 - 5 infants per 1000 live births (5). The early onset form of this disease occurs during the first week of life and has a mortality rate greater than 50%. When the onset occurs after day seven, the mortality rate drops to 14 - 23% (1,7). Group B Streptococcus can also cause serious illness in adults but it is far less common than in newborns (2).

Presumptive identification is made by traditional physiological and biochemical methods. These include gram stain, catalase reaction, hemolytic activity on sheep blood agar plates, hippurate or PYR hydrolysis, CAMP and bile esculin tests (4). There are some Group A Streptococcus that can give a positive CAMP test similar to Group B Streptococcus. Therefore, confirmative identification of Group B Streptococcus requires a combination of biochemical tests and/or serological tests. The ACCU<sub>PROBE</sub> GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST offers a rapid, non-subjective method for the definitive identification of Group B Streptococcus based on the detection of specific ribosomal RNA sequences that are unique to *Streptococcus agalactiae*.

**PRINCIPLES OF THE PROCEDURE**

Nucleic acid hybridization tests are based on the ability of complementary nucleic acid strands to specifically align and associate to form stable double-stranded complexes (6). The ACCU<sub>PROBE</sub> SYSTEM uses a single-stranded DNA probe with a chemiluminescent label that is complementary to the ribosomal RNA of the target organism. After the ribosomal RNA is released from the organism, the labeled DNA probe combines with the target organism's ribosomal RNA to form a stable DNA:RNA hybrid. The Selection Reagent allows for the differentiation of non-hybridized and hybridized probe. The labeled DNA:RNA hybrids are measured in a GEN-PROBE luminometer. A positive result is a luminometer reading equal to or greater than the cut-off. A value below this cut-off is a negative result.

**REAGENTS**

Reagents for the ACCU<sub>PROBE</sub> GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST are provided in three separate reagent kits:

**ACCU<sub>PROBE</sub> GROUP B STREPTOCOCCUS PROBE KIT**

<u>Probe Reagent (P)</u> Group B Streptococcus	(2 x 10 tubes)
<b>AccuPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT</b>	
<u>Reagent 1</u> (Lysis Reagent) (1) buffered solution containing 0.04% sodium azide	1 x 10 mL
<u>Reagent 2</u> (Hybridization Buffer) (2) buffered solution	1 x 10 mL
<u>Reagent 3</u> (Selection Reagent) (3) buffered solution	1 x 60 mL
<b>GEN-PROBE DETECTION REAGENT KIT</b>	
<u>Detection Reagent I</u> (RI) 0.1% hydrogen peroxide in 0.001 N nitric acid	1 x 240 mL
<u>Detection Reagent II</u> (RII) 1 N sodium hydroxide	1 x 240 mL

### **WARNINGS AND PRECAUTIONS**

- A. For *in vitro* diagnostic use.
- B. Use universal precautions when performing this assay (3).
- C. Use only for the identification of Group B Streptococcus isolated from culture.
- D. Use only supplied or specified disposable laboratory ware.
- E. Reagents in this kit contain sodium azide which may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides.  
Upon disposal of these reagents, always dilute the material with a large volume of water to prevent azide buildup in the plumbing.
- F. Avoid contact of Detection Reagents I and II with skin, eyes and mucous membranes. Wash with water if these reagents come into contact with skin. If spills of these reagents occur, dilute with water before wiping dry.
- G. To ensure optimal performance we recommend that prior to testing you inspect the tubes for dislodged material. If dislodged material is present, tap tube on the counter top in order to settle contents to the bottom of the tube.

### **STORAGE AND HANDLING REQUIREMENTS**

Probe Reagent Tubes must be stored in the foil pouches at 2° to 8°C. The Probe Reagent Tubes are stable in the unopened pouches until the expiration date indicated. Once opened, the pouch should be resealed and the tubes should be used within two months and prior to the expiration date.

Other reagents used in the AccuPROBE GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST may be stored between 2° to 25°C and are stable until the expiration date indicated.

**DO NOT FREEZE THE REAGENTS.**

**SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION**

The ACCU<sub>PROBE</sub> GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST is designed to determine the identity of Group B Streptococcus isolated from culture.

- A. Solid Media Method.** Growth from solid media suggestive of Group B Streptococcus may be tested. Samples may be tested as soon as growth is visible but should be less than 72 hours old.
1. Colonies can be removed with a 1 µL disposable plastic loop, a wire loop, a disposable plastic needle or an applicator stick. Swabs should not be used due to the small volume of liquid in which the cells are subsequently resuspended.
  2. If a single colony is to be tested, it should be at least 1 mm in diameter. A 1 µL loopful of cells or several (3 - 4) smaller colonies can be tested.
  3. Avoid taking any of the solid media with the cells.
  4. The operator may elect to inoculate another culture plate at this time to confirm the purity of the isolate.
- B. Broth Culture Method.** Growth in broths, such as Todd Hewitt, Lim Broth, Thioglycollate or Trypticase Soy Broth, with turbidity equivalent to or greater than a McFarland 1 Nephelometer standard may be tested with this probe. Vortex broth tube. Pipette a 50 µL sample from the well mixed broth suspension into the Probe Reagent Tubes as described below.
- C. Method for Vaginal and/or Anorectal Swab Specimens.**

Transport vaginal and/or anorectal swab specimens to the laboratory within 48 hours of collection at ambient temperature. Specimens may be stored in the laboratory an additional 24 hours at 2° to 8°C prior to testing. Immerse the swab into a tube of Lim broth (Todd Hewitt broth with nalidixic acid and colistin) for at least one minute and then express it against the side of the tube. Vortex the broth tube and incubate at 36° ± 1°C for 18 to 24 hours prior to performing the test procedure. After incubation, vortex broth tube and pipette a 50 µL sample from the well-mixed broth suspension into the Probe Reagent Tubes as described under Test Procedure, Broth Media Method.

**MATERIALS PROVIDED**

The ACCU<sub>PROBE</sub> GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST  
(bioMérieux ref. 39206 / Gen-Probe Cat. No. 102820/2820)

**20 Tests**

Probe Reagent (P)                      2 x 10 tubes

**MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

1 µL plastic sterile inoculating loops, wire loops, plastic needles, or applicator sticks for selecting colonies  
Control culture strains  
Incubator or water bath\* (35° to 37°C)  
Water bath or dry heat bath\* (60° ± 1 °C)  
Micropipettes (50 µL, 300 µL)  
Re-pipettor (50 µL, 300 µL)  
Vortex mixer  
Culture swabs with or without transport medium (such as Stuart's, modified Stuart's, or Amies)  
Broth media (such as Todd Hewitt, Lim Broth, Thioglycollate, or Trypticase Soy Broth)

\*Heating blocks in the dry heat bath should have wells that are correctly sized for 12 x 75 mm tubes. The use of GEN-PROBE dry heat baths is recommended.

AVAILABLE FROM YOUR GEN-PROBE DISTRIBUTOR:

GEN-PROBE LEADER 50i Luminometer  
(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)  
AccuPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT  
(bioMérieux ref. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 102800/2800)  
GEN-PROBE DETECTION REAGENT KIT  
(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791/1791)  
Dry Heat Bath (60° ± 1°C)  
(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)

## **TEST PROCEDURE**

### **A. EQUIPMENT PREPARATION**

1. Adjust the incubator or water bath to 35° to 37°C.
2. Adjust the water bath or heating block to 60° ± 1°C.
3. Prepare the GEN-PROBE luminometer for operation. Make sure there is sufficient volume of Detection Reagents I and II to complete the tests.

### **B. CONTROLS**

Positive and negative control strains should be tested routinely in each laboratory according to local regulations. A culture of Group B Streptococcus (e.g., American Type Culture Collection, ATCC #13813) may be used as the positive control while a culture of Streptococcus bovis (e.g., ATCC #33317) may be used as the negative control.

If testing samples from solid media, select a 1 mm sized colony of each control strain from growth on solid media. If testing samples from broth, inoculate one colony from each of the control strains into broth and incubate according to sample test method selected under SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION step.

### **C. SAMPLE PREPARATION**

1. Open the foil pouch by cutting evenly across the top of the pouch. Remove enough Probe Reagent Tubes to test the culture isolates and/or controls. Reseal the pouch by folding the opened edge over several times and securing with adhesive tape or a clip. **Leave the desiccant pillow in the pouch.**
2. Label a sufficient number of Probe Reagent Tubes to test the culture isolates and/or controls. Remove and retain the caps.
3. Pipette 50 µL of Reagent 1 (Lysis Reagent) into all Probe Reagent Tubes. If broth cultures are to be tested, do not add Reagent 1 to the Probe Reagent Tubes.
4. Transfer the samples from the solid media or 50 µL of a well mixed broth culture into the Probe Reagent Tubes as described in the SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION Section. Twirl the loop, needle or stick in Reagent 1 (Lysis Reagent) to remove the cells if testing growth from solid media and mix thoroughly.
5. Recap the Probe Reagent Tubes and incubate at 35° to 37°C for 5 minutes in a water bath or 10 minutes at 35° to 37°C in an incubator.

### **D. HYBRIDIZATION**

1. Remove the Probe Reagent Tubes from the water bath or incubator. Remove and retain the caps. Pipette 50 µL of Reagent 2 (Hybridization Buffer) into all Probe Reagent Tubes.

2. Recap the Probe Reagent Tubes and incubate for 15 minutes at  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in a water bath or heating block.

#### E. SELECTION

1. Remove the Probe Reagent Tubes from the water bath or heating block. Remove and retain the caps. Pipette 300  $\mu\text{L}$  of Reagent 3 (Selection Reagent) into each tube. Recap the tubes and VORTEX them to mix completely.
2. Incubate the Probe Reagent Tubes for 5 minutes at  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in a water bath or heating block.
3. Remove the Probe Reagent Tubes from the water bath or heating block and leave them at room temperature for at least 5 minutes. Remove and discard the caps. Read the results in the luminometer within 1 hour.

#### F. DETECTION

1. Select the appropriate protocol from the menu of the luminometer software.
2. Using a damp tissue or paper towel, wipe each tube to ensure that no residue is present on the outside of the tube and insert the tube into the luminometer according to the instrument directions.
3. When the analysis is complete, remove the tube(s) from the luminometer.

### PROCEDURAL NOTES

- A. REAGENT: Reagent 2 (Hybridization Buffer) may precipitate. Warming and mixing the solution at  $35^{\circ}$  to  $60^{\circ}\text{C}$  will dissolve the precipitate.
- B. TEMPERATURE: The Sample Preparation, Hybridization and Selection reactions are temperature dependent. Therefore, it is imperative that the incubator, water bath or heating block is maintained within the specified temperature range.
- C. TIME:
  1. The Hybridization Reaction should be started within 1 hour of adding the cells and Reagent 1 to the Probe Reagent Tubes.
  2. The Hybridization and Selection reactions are time dependent. Hybridize at least 15 minutes but no more than 20 minutes. Incubate the Probe Reagent Tubes during the SELECTION Step for at least 5 minutes but no more than 6 minutes.
- D. WATER BATH: The level of water in the water bath should be maintained to ensure that the entire liquid reaction volume in the Probe Reagent Tubes is submerged.
- E. VORTEXING: It is critical to have a homogeneous mixture during the SELECTION Step, specifically after the addition of Reagent 3.
- F. TROUBLESHOOTING:
  1. Elevated negative control values (*Streptococcus bovis*, ATCC #33317) greater than 20,000 RLU (Relative Light Units) in the LEADER or 600 PLU (Photometric Light Units) in the AccuLDR (formerly PAL) can be caused by insufficient mixing after adding Reagent 3 (Selection Reagent) or by testing mixed cultures. Because mixed cultures can occur, a portion of the growth may be streaked onto the appropriate agar medium and incubated to check for multiple colony types.
  2. Low positive control values (*Streptococcus agalactiae*, ATCC #13813) less than 50,000 RLU in the LEADER or 1,500 PLU in the AccuLDR (formerly PAL) can be caused by insufficient cell numbers or by testing mixed or aged cultures. Because mixed cultures can occur, a portion of the growth may be

streaked onto the appropriate agar medium and incubated to check for multiple colony types.

## **RESULTS**

### **A. INTERPRETATION OF RESULTS**

The results of the AccuPROBE GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST are based on the following cut-off values. Samples producing signals greater than or equal to these cut-off values are considered positive. Signals less than these cut-off values are considered negative. Results in repeat ranges should be repeated.

	<b>AccuLDR</b> (formerly PAL)	<b>LEADER</b>
Cut-off value	1,500 PLU	50,000 RLU
Repeat range	1,200 - 1,499 PLU	40,000 - 49,999 RLU

### **B. QUALITY CONTROL AND ACCEPTABILITY OF RESULTS**

Negative control (e.g., *S. bovis*, ATCC #33317) and positive control (e.g., *S. agalactiae*, ATCC # 13813) should satisfy the following values:

	<b>AccuLDR</b> (formerly PAL)	<b>LEADER</b>
Negative control	< 600 PLU	< 20,000 RLU
Positive control	> 1,500 PLU	> 50,000 RLU

## **LIMITATIONS**

This method has been tested using fresh growth from solid media and from broth cultures listed in the SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION Section. The efficacy of this test has not been demonstrated on direct clinical specimens.

Cultures from prenatal screening samples have only been tested for use in the ACCUPROBE GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST from Lim broth (Todd Hewitt broth with nalidixic acid and colistin); other selective broth media have not been tested.

The AccuPROBE GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST will react positively with isolates of *Streptococcus equi*.

Results from the AccuPROBE GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data available to the clinician.

## **EXPECTED VALUES**

The AccuPROBE GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST was compared to standard culture biochemical identification methods using 299 isolates of the Group B Streptococcus species and 419 other bacterial isolates from 16 genera. Standard identification methods include Gram stain, catalase reaction, PYR and CAMP tests. The isolates were categorized as either positive ( $\geq 50,000$  RLU) or negative ( $< 50,000$  RLU). The range of observations for negative cultures was 221 to 8,800 RLU and 56,300 to 1,360,000 RLU for positive cultures. A comparison of these results to standard culture identification methods is shown below.

**AccuPROBE/ CULTURE IDENTIFICATION**

<b>AccuPROBE Culture</b>	<b>Pos Pos</b>	<b>Pos Neg</b>	<b>Neg Pos</b>	<b>Neg Neg</b>	<b>Sensitivity/ Specificity</b>	<b>Percent Agreement</b>
Site 1	99	0	0	152	100%/100%	100%
Site 2	100	0	0	100	100%/100%	100%
Site 3	100	0	0	167	100%/100%	100%
<b>Total</b>	<b>299</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>419</b>	<b>100%/100%</b>	<b>100%</b>

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

**A. WITHIN-RUN PRECISION**

The within-run precision of the AccuPROBE GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST was calculated by assaying two concentrations of ribosomal RNA isolated from *Streptococcus agalactiae* using 10 replicates in a single assay.

<b>Sample</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Number of Replicates	10	10
Mean Response	70,552	150,691
Standard Deviation	5,472	11,428
Coefficient of Variation	7.8%	7.6%

**B. BETWEEN-RUN PRECISION**

The between-run precision was calculated by assaying the same two concentrations of *Streptococcus agalactiae* ribosomal RNA using single determinations in 12 consecutive runs.

<b>Sample</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Number of Replicates	12	12
Mean Response	74,825	147,682
Standard Deviation	5,125	8,248
Coefficient of Variation	6.9%	5.6%

**C. ANALYTICAL SENSITIVITY**

The analytical sensitivity (limits of detection) of the AccuPROBE GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST has shown to detect  $1.05 \times 10^5$  CFU of Group B Streptococcus per assay from solid or broth methods. Vaginal/anorectal swab samples tested with the Group B Streptococcus Culture Identification Test have shown to detect as few as 300 CFU of Group B Streptococcus when inoculated into Lim broth and incubated for 18 to 24 hours.

**D. SPECIFICITY**

A total of 93 culture isolates were evaluated using the AccuPROBE GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST. These isolates represented a total of 93 species from 47 genera. Twenty five isolates of

14 *Streptococcus* species including all 9 serotypes of Group B Streptococcus, 12 *Enterococcus* species and 54 other species from 45 genera representing a phylogenetic cross-section of organisms were evaluated using the ACCUProbe GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST. All 9 serotypes of Group B Streptococcus reacted positively with the probe. In addition, *Streptococcus equi* reacted positively with the probe. All other species tested were negative.

#### E. RECOVERY

*Streptococcus bovis* were added at a concentration of 21 million cells per test alone and to samples containing between 2 thousand and 21 million cells of *S. agalactiae* and did not interfere with the recovery of *S. agalactiae* using the ACCUProbe GROUP B STREPTOCOCCUS CULTURE IDENTIFICATION TEST.

**STREPTOCOCCUS GRUPPE B  
KULTURBESTÄTIGUNGSTEST**  
(bioMérieux Best.Nr. 39206 / Gen-Probe Kat. Nr. 102820/2820)

**VERWENDUNGSZWECK**

Der AccuPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTEST ist ein DNA-Sonden-Schnelltest, der nach dem Prinzip der Nukleinsäurehybridisierung arbeitet und die Identifizierung von Streptokokken der Gruppe B aus Kulturisolaten ermöglicht.

**ZUSAMMENFASSUNG UND TESTERKLÄRUNG**

Streptokokken der Gruppe B (*Streptococcus agalactiae*) sind eine der Hauptursachen für Septikämie und Meningitis bei Neugeborenen. Die Inzidenz von Infektionen mit B-Streptokokken bei Neugeborenen wird auf 2 - 5 auf 1000 Lebendgeborene geschätzt (5). Die früh, innerhalb der ersten Lebenswoche einsetzende Form dieser Infektion (early-onset-Typ) hat eine Letalität von über 50%. Bei der nach dem 7. Lebenstag ausbrechenden Form fällt die Sterblichkeitsrate auf 14 - 23% (1, 7). B-Streptokokken können auch - wenngleich viel seltener - zu schweren Erkrankungen bei Erwachsenen führen (2).

Die präsumptive Identifizierung erfolgt durch klassische physiologische und biochemische Methoden. Dazu gehören Gramfärbung, Katalasereaktion, Hämolyse auf Schafblutagar, Hippurat oder PYR Hydrolyse, CAMP und Galle-Äskulin-Tests (4). Einige Streptokokken der Gruppe A können im CAMP-Test ähnlich wie B-Streptokokken positiv reagieren. Zur Bestätigung einer Identifizierung von B-Streptokokken ist deshalb eine Kombination aus mehreren biochemischen und/oder serologischen Tests erforderlich. Der AccuPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTEST ist eine schnelle, objektive Methode zur sicheren Identifizierung von B-Streptokokken. Die Identifizierung beruht auf dem Nachweis von rRNA Sequenzen, die für *Streptococcus agalactiae* spezifisch sind.

**PRINZIP**

Nukleinsäure-Hybridisierungstests basieren auf der Fähigkeit komplementärer Nukleinsäuresequenzen spezifisch zu hybridisieren und stabile Doppelstrang-Komplexe zu bilden (6). Der AccuPROBE Test enthält eine einzelsträngige DNA-Sonde, an die ein Chemilumineszenzmarker gekoppelt ist. Diese Sonde ist der rRNA der Zielsequenz komplementär. Nachdem die rRNA des Zielorganismus freigesetzt ist, verbindet sich die Sonde mit dieser und bildet einen stabilen DNA-RNA Komplex. Ein Selektionsreagenz baut den Chemilumineszenzmarker der ungebundenen Sonde ab, während der Marker der gebundenen Sonde intakt bleibt. Das GEN-PROBE Luminometer mißt das von den DNA-RNA-Hybriden abgegebene Lichtsignal. Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn der vom Luminometer angezeigte Wert gleich oder größer ist als der Grenzwert (cut-off). Liegt der Wert unterhalb des Grenzwertes, ist das Ergebnis negativ.

## **REAGENZIEN**

Die Reagenzien des AccuPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS werden in drei separaten Kits geliefert:

### **AccuPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B SONDEN-TESTKIT**

Sondenreagenz (P) (2 x 10 Röhrchen)  
Streptokokken der Gruppe B

### **AccuPROBE KULTURBESTÄTIGUNGS-REAGENZIENTKIT**

Reagenz 1 (Lysereagenz) (1) 1 x 10 ml  
Pufferlösung mit 0,04% Natriumazid

Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) (2) 1 x 10 ml  
Pufferlösung

Reagenz 3 (Selektionsreagenz) (3) 1 x 60 ml  
Pufferlösung

### **GEN-PROBE DETEKTIONSREAGENZIENT-KIT**

Detektionsreagenz I (RI) 1 x 240 ml  
0,1% Wasserstoffperoxid in 0,001 N Salpetersäure

Detektionsreagenz II (RII) 1 x 240 ml  
1 N Natriumhydroxyd

## **VORSICHTSMASSNAHMEN**

- A. Nur für die *in vitro* Diagnostik verwenden.
- B. Beachten Sie bei der Testdurchführung die üblichen Vorsichtsmaßnahmen (3).
- C. Verwenden Sie diesen Test nur zur Identifizierung von Streptokokken der Gruppe B aus Kulturisolaten.
- D. Verwenden Sie nur die mitgelieferten oder empfohlenen Einweg-Labormaterialien.
- E. Die Reagenzien dieses Kits enthalten Natriumazid, das mit Blei- oder Kupferrohren zu explosiven Metallaziden reagieren kann. Beim Ableiten in die Kanalisation sollten die Reagenzien immer mit reichlich Wasser verdünnt werden.
- F. Vermeiden Sie jeden Kontakt der Detektionsreagenzien I und II mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten. Bei eventuellem Kontakt sofort mit Wasser spülen. Beim Verschütten einer dieser Reagenzien, die Flüssigkeit vor dem Aufwischen mit Wasser verdünnen.
- G. Um eine optimale Testperformance zu gewährleisten, ist es empfehlenswert, die Röhrchen vor der Testung auf eventuell losgelöstes Material zu überprüfen. Wenn dies der Fall sein sollte, klopfen Sie die Röhrchen auf den Labortisch, so daß sich der Röhrcheninhalt auf dem Boden absetzt.

## **LAGERUNG**

Die Sondenreagenzröhrchen bei 2° - 8°C in den Aluminiumbeuteln lagern. Die original verpackten Sondenröhrchen sind bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach dem Öffnen des Beutels sind die Röhrchen 2 Monate, längstens jedoch bis zum Verfallsdatum haltbar. Die Beutel müssen nach jedem Gebrauch wieder fest verschlossen werden.

Die übrigen Reagenzien des AccuPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS sind bei 2° - 25°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

#### **DIE REAGENZIEN NICHT EINFRIEREN.**

#### **PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG**

Der AccuPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTEST dient zur Identifizierung von Streptokokken der Gruppe B aus Kulturisolaten.

- A. Feste Kulturmedien.** Verwenden Sie Kulturen von festen Medien, bei denen der Verdacht besteht, daß es sich um B-Streptokokken handelt. Die Kulturen können getestet werden, sobald Wachstum sichtbar ist. Sie sollten nicht älter als 72 Stunden sein.
1. Teile des Zellrasens mit einer 1 µl Einweg-Plastiköse, einer Metallöse oder einer Einweg-Plastiknadel abnehmen. Verwenden Sie wegen des geringen Flüssigkeitsvolumens, in dem die Zellen anschließend gelöst werden, keinen Wattetupfer.
  2. Wird eine einzelne Kolonie getestet, sollte diese einen Durchmesser von mindestens 1 mm haben. 1 µl Zellen (Öse) oder mehrere (3 - 4) kleinere Kolonien können getestet werden.
  3. Achten Sie darauf, daß beim Abnehmen der Zellen kein Nährboden mit abgenommen wird.
  4. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Möglichkeit, eine weitere Platte zu beimpfen, um die Reinheit der entnommenen Probe zu überprüfen.
- B. Flüssige Kulturmedien.** Der Test kann mit Flüssigkulturen wie Todd Hewitt, Lim Bouillon, Thioglycolat- oder Trypcase Soja-Bouillon durchgeführt werden, deren Trübung größer oder gleich McFarland Standard 1 sein sollte. Vortexen Sie die Röhren mit der Flüssigkultur. Pipettieren Sie 50 µl Probe aus der gut gemischten Bouillon in die Sondenreagenzröhrchen, wie im Abschnitt Testdurchführung Punkt C PROBENVORBEREITUNG beschrieben.
- C. Verfahren für vaginale und/oder anorektale Abstriche.**
- Transportieren Sie die vaginalen und/oder anorektalen Abstriche innerhalb von 48 Stunden nach der Probenentnahme bei Raumtemperatur ins Labor. Im Labor können die Proben vor der Testung für weitere 24 Stunden bei 2° - 8°C gelagert werden. Tauchen Sie den Abstrichtupfer für mindestens 1 Minute in ein Röhren mit Lim Bouillon (Todd Hewitt Bouillon mit Nalidixinsäure und Colistin) und drücken Sie den Tupfer anschließend an der Röhrenwand aus. Vortexen Sie das Röhren mit der Bouillon und inkubieren Sie es bei 36° ± 1°C für 18 bis 24 Stunden, bevor Sie den Test durchführen. Vortexen Sie das Bouillonröhren nach der Inkubation erneut und pipettieren Sie anschließend 50 µl aus der gut gemischten Bouillon in die Sondenreagenzröhrchen pipettieren, wie im Abschnitt Testdurchführung, Verfahren mit flüssigen Kulturmedien, beschrieben.

#### **MITGELIEFERTE MATERIALIEN**

AccuPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTEST  
(bioMérieux Best.Nr. 39206 / Gen-Probe Kat. Nr. 102820/2820)

#### **20 Tests**

Sondenreagenz (P) 2 x 10 Röhren

#### **ERFORDERLICHE MATERIALIEN (NICHT IM KIT ENTHALTEN)**

Sterile 1 µl Plastikösen, Metallösen oder Plastiknadeln zum Abimpfen der Kolonien.

#### Kontroll-Kulturstämme

Brutschrank oder Wasserbad (35° bis 37°C)

Wasserbad oder Heizblock\* (60° ± 1°C)

Mikropipetten (50 µl, 300 µl)

Repetierpipette (50 µl, 300 µl)

Vortex

Abstrichtupfer mit oder ohne Transportmedium (z.B. Stuart-, modifiziertes Stuart- oder Amies-Medium)

Bouillonmedien (z.B. Todd Hewitt-, Lim-, Thioglycolat- oder Trypcase-Soja-Bouillon)

\* Die Heizblöcke müssen für 12 x 75 mm Röhrchen geeignet sein. Es wird daher empfohlen, die Heizblocksysteme von GEN-PROBE zu verwenden.

#### ZUSÄTZLICHE VERFÜGBARE MATERIALIEN

GEN-PROBE LEADER 50i Luminometer

(bioMérieux Best.Nr. 39400 / Gen-Probe Kat. Nr. 103100i/3100i)

ACCUPROBE REAGENZIENTKIT KULTURBESTÄTIGUNG

(bioMérieux Best.Nr. 39305 / Gen-Probe Kat. Nr. 102800/2800)

GEN-PROBE DETEKTIONSREAGENZIENT-KIT

(bioMérieux Best.Nr. 39300 / Gen-Probe Kat. Nr. 201791/1791)

Heizblock (60° ± 1°C)

(bioMérieux Best.Nr. 39406 / Gen-Probe Kat. Nr. 3397)

#### TESTDURCHFÜHRUNG

##### A. VORBEREITUNG DER GERÄTE UND MATERIALIEN

1. Den Brutschrank oder das Wasserbad auf 35° - 37°C einstellen.
2. Das Wasserbad oder den Heizblock auf 60° ± 1°C einstellen.
3. Bereiten Sie das GEN-PROBE Luminometer für die Messung vor. Vergewissern Sie sich, daß für die Durchführung der Tests ausreichend Detektionsreagenz I und II vorhanden ist.

##### B. KONTROLLEN

In jedem Labor sollten gemäß den örtlichen Bestimmungen routinemäßig positive und negative Kontrollstämme mitgeführt werden. Als Positivkontrolle kann eine Kultur aus B-Streptokokken (z.B. American Type Culture Collection, ATCC 13813 ) dienen, während eine *Streptococcus bovis* Kultur (z.B. ATCC 33317) als Negativkontrolle verwendet werden kann.

Zur Testung von Proben von festen Medien wählen Sie eine 1 mm große Kolonie des jeweiligen Kontrollstammes welcher auf festem Medium angezüchtet wurde. Für die Testung von Proben aus Bouillonkulturen überprüfen Sie eine Kolonie jedes Kontrollstammes in Bouillon und inkubieren Sie gemäß dem im Abschnitt PROBENGEWINNUNG- und VORBEREITUNG beschriebenen Verfahren.

##### C. PROBENVORBEREITUNG

1. Die Folienbeutel am oberen Ende aufschneiden. Entnehmen Sie die für die Kulturisolate und/oder Kontrollen erforderliche Anzahl an Sondenreagenzröhrchen. Den Beutel an der geöffneten Seite mehrfach umschlagen und mit Klebeband oder einer Klammer wieder dicht verschließen. **Den Trockenbeutel nicht herausnehmen.**
2. Beschriften Sie eine ausreichende Anzahl Sondenreagenzröhrchen für die Kulturisolate und/oder die Kontrollen. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf.

3. Pipettieren Sie 50 µl Reagenz 1 (Lysereagenz) in alle Sondenreagenzröhrchen. Geben Sie kein Reagenz 1 in die Sondenreagenzröhrchen, wenn Flüssigkulturen getestet werden.
4. Überführen Sie die Proben vom festen Medium oder 50 µl einer gut gemischten Flüssigkultur in die Sondenreagenzröhrchen, wie im Abschnitt PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG beschrieben. Bei Proben von festen Kulturmedien wirbeln Sie die Öse oder Nadel in Reagenz 1 (Lysereagenz), so daß möglichst viele Zellen in das Röhrchen übertragen werden und mischen Sie gründlich.
5. Verschließen Sie die Sondenreagenzröhrchen und inkubieren Sie sie für 5 min bei 35° bis 37°C in einem Wasserbad oder 10 min bei 35° bis 37°C in einem Brutschrank.

#### D. HYBRIDISIERUNG

1. Nehmen Sie die Sondenreagenzröhrchen aus dem Wasserbad oder Brutschrank. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf. Pipettieren Sie 50 µl Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) in jedes Sondenreagenzröhrchen.
2. Verschließen Sie die Sondenreagenzröhrchen und inkubieren Sie sie für 15 min bei 60° ± 1°C im Wasserbad oder Heizblock.

#### E. SELEKTION

1. Nehmen Sie die Sondenreagenzröhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf. Pipettieren Sie 300 µl Reagenz 3 (Selektionsreagenz) in jedes Röhrchen. Verschließen Sie die Röhrchen und vortexen Sie diese, um den Inhalt gleichmäßig zu durchzumischen.
2. Inkubieren Sie die Sondenreagenzröhrchen für 5 min bei 60° ± 1°C im Wasserbad oder Heizblock.
3. Nehmen Sie die Sondenreagenzröhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock und lassen Sie sie für mindestens 5 min bei Raumtemperatur stehen. Entfernen Sie die Stopfen und werfen Sie diese. Die Röhrchen sollten innerhalb 1 Stunde gemessen werden.

#### F. DETEKTION

1. Wählen Sie auf dem Luminometer das geeignete Programm.
2. Zur Säuberung der Röhrchenwand sowie zur Vermeidung von elektrostatischen Einflüssen während der Messung durch das Röhrchenmaterial selbst, sollte jedes Röhrchen vor der Messung mit einem feuchten Tuch bzw. Papier abgewischt werden. Stellen Sie die Röhrchen gemäß den Anweisungen im Handbuch in das Luminometer.
3. Nehmen Sie die Röhrchen nach der Messung aus dem Luminometer.

### HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

- A. REAGENZIEN: Das Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) kann präzipitieren. Zur Auflösung des Niederschlags das Reagenz auf 35° - 60°C erhitzen und mischen.
- B. TEMPERATUR: Die Probenvorbereitung, Hybridisierung und Selektion sind temperaturabhängig. Es muß deshalb unbedingt darauf geachtet werden, daß der Brutschrank, das Wasserbad oder der Heizblock im angegebenen Temperaturbereich gehalten werden.
- C. ZEIT:
  1. Die Hybridisierungsreaktion sollte innerhalb 1 h nach Zugabe der Zellen und Reagenz 1 in die Sondenreagenzröhrchen gestartet werden.
  2. Hybridisierung und Selektion sind zeitabhängige Reaktionen. Die Hybridisierungsdauer sollte nicht

unter 15 min liegen, jedoch 20 min nicht überschreiten. Die Sondenreagenzröhrchen während des Selektionsschrittes mindestens 5 min, jedoch nicht länger als 6 min inkubieren.

- D. WASSERBAD: Achten Sie darauf, daß der Wasserstand des Wasserbades ausreichend hoch bleibt, um zu gewährleisten, daß sich die gesamte Reaktionslösung der Sondenreagenzröhrchen im Wasser befindet.
- E. VORTEXEN: Während des Arbeitsschrittes SELEKTION muß besonders darauf geachtet werden, daß die Probenmischung absolut homogen ist, insbesondere nach Zugabe von Reagenz 3.
- F. FEHLERMÖGLICHKEITEN:
1. Bei Messungen mit dem LEADER können erhöhte negative Kontrollwerte (*Streptococcus bovis*, ATCC 33317) über 20.000 RLU (Relative Light Units) durch unzureichendes Mischen nach Zugabe von Reagenz 3 (Selektionsreagenz) entstehen. Entsprechendes gilt bei Messungen mit dem AccuLDR (vormals PAL), wenn dort erhöhte negative Kontrollwerte über 600 PLU (Photometric Light Units) gemessen werden. Ein ähnlicher Effekt kann beim Testen von Mischkulturen auftreten. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil der Kultur auf ein geeignetes Agarmedium überimpfen und inkubieren.
  2. Schwach positive Kontrollwerte (*Streptococcus agalactiae* ATCC 13813) unter 50.000 RLU auf dem LEADER oder 1500 PLU auf dem AccuLDR (vormals PAL) erhält man bei zu geringen Keimzahlen oder durch Testen von Mischkulturen bzw. zu alter Kulturen. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil der Kultur auf ein geeignetes Kulturmedium überimpfen und inkubieren.

## **ERGEBNISSE**

### **A. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE**

Die Ergebnisse des AccuPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS werden auf der Basis folgender Grenzwerte (cut-off) interpretiert. Proben, deren Lichtsignale diesen Grenzwerten entsprechen oder darüber liegen, werden als positiv bewertet. Signale unterhalb dieser Grenzwerte werden als negativ bewertet. Liegt das Ergebnis im Graubereich, sollte der Test wiederholt werden.

	<b>AccuLDR</b> (vormals PAL)	<b>LEADER</b>
Grenzwert	1.500 PLU	50.000 RLU
Graubereich	1.200 - 1.499 PLU	40.000 - 49.999 RLU

### **B. QUALITÄTSKONTROLLE UND VALIDIERUNG DER ERGEBNISSE**

Die Negativkontrolle (z.B. *S. bovis*, ATCC 33317) und die Positivkontrolle (z.B. *S. agalactiae*, ATCC 13813) sollten folgenden Sollwerten entsprechen.

	<b>AccuLDR</b> (vormals PAL)	<b>LEADER</b>
Negativkontrolle	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Positivkontrolle	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

**LIMITIERUNGEN**

Diese Methode wurde mit frischen Kulturen getestet, die auf den im Abschnitt PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG angegebenen Festmedien und Flüssigkulturen angezüchtet wurden. Die Performance dieses Tests bei direkter Testung von klinischen Proben wurde nicht evaluiert.

Bei pränatalen Screening Proben wurden nur Kulturen für den ACCUPROBE GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTEST getestet, die in LIM Bouillon (Todd Hewitt Bouillon mit Nalidixinsäure und Colistin) inokuliert wurden; andere selektive Bouillonmedien wurden nicht getestet.

Der ACCUPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTEST zeigt mit *Streptococcus equi* Isolaten eine positive Reaktion.

Die Ergebnisse des ACCUPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS müssen in Zusammenhang mit anderen Testergebnissen und klinischen Daten interpretiert werden.

**NORMALWERTE**

Der ACCUPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTEST wurde mit klassischen Kulturverfahren mit biochemischer Identifizierung verglichen. 299 Isolate von Streptokokken der Gruppe B und 419 andere mikrobiologische Spezies aus 16 Gattungen wurden getestet. Die klassischen Identifizierungsmethoden umfaßten die Gramfärbung, Katalasereaktion, sowie PYR und CAMP Tests. Die Stämme wurden entweder als positiv ( $\geq 50.000$  RLU) oder negativ ( $< 50.000$  RLU) bewertet. Für die negativen Kulturen wurde ein Bereich von 221 bis 8.800 RLU und für die positiven Kulturen ein Bereich von 56.300 bis 1.360.000 RLU ermittelt. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den klassischen Identifizierungsmethoden ist im folgenden angegeben.

**ACCUPROBE / KULTUR**

AccuPROBE Kultur	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensitivität/ Spezifität	Proz. Korrelation
Labor 1	99	0	0	152	100%/100%	100%
Labor 2	100	0	0	100	100%/100%	100%
Labor 3	100	0	0	167	100%/100%	100%
<b>Gesamt</b>	<b>299</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>419</b>	<b>100%/100%</b>	<b>100%</b>

**PERFORMANCE**

A. INTRA-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Intra-Assay Präzision des ACCUPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS wurden zwei Konzentrationen der rRNA von *Streptococcus agalactiae* 10 Mal in einer Testserie bestimmt.

Probe	A	B
Anzahl Tests	10	10
Mittelwert (RLU)	70.552	150.691
Standardabweichung	5.472	11.428
Variationskoeffizient	7,8%	7,6%

## B. INTER-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Inter-Assay Präzision wurden die beiden gleichen Konzentrationen der rRNA von *Streptococcus agalactiae* in Einzelbestimmungen in 12 aufeinanderfolgenden Testserien bestimmt.

Probe	A	B
Anzahl Tests	12	12
Mittelwert (RLU)	74.825	147.682
Standardabweichung	5.125	8.248
Variationskoeffizient	6,9%	5,6%

## C. ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Bei festen und flüssigen Kulturmedien liegt die analytische Sensitivität (Nachweisgrenze) des AccuPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS pro Test bei  $1.05 \times 10^5$  KBE Streptokokken der Gruppe B. Bei Testung vaginaler/anorektaler Abstriche mit dem STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTEST liegt die Nachweisgrenze bei nur 300 KBE Streptokokken der Gruppe B, wenn diese in Lim Bouillon inokuliert und für 18 bis 24 Stunden inkubiert wurden.

## D. SPEZIFITÄT

Insgesamt wurden 93 Kulturisolate mit dem AccuPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTEST evaluiert. Bei diesen Stämmen handelte es sich um insgesamt 93 Spezies aus 47 Gattungen. 25 Isolate von 14 *Streptococcus* Spezies, darunter alle 9 Serotypen von Streptokokken der Gruppe B, 12 *Enterococcus*-Spezies und 54 andere Spezies aus 45 Gattungen, die einen phylogenetischen Querschnitt von Organismen darstellten, wurden mit dem AccuPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTEST evaluiert. Alle 9 Serotypen der B-Streptokokken reagierten mit dem Sondentest positiv. Außerdem reagierte *Streptococcus equi* mit der Sonde positiv. Alle anderen getesteten Spezies reagierten negativ.

## E. WIEDERFINDUNG

*Streptococcus bovis* wurde in einer Konzentration von 21 Millionen Zellen pro Test allein getestet und Proben zugesetzt, die zwischen 2000 und 21 Millionen Zellen von *S. agalactiae* enthielten. Es wurden keine Interferenzen bei der Wiederfindung von *S. agalactiae* mit dem AccuPROBE STREPTOCOCCUS GRUPPE B KULTURBESTÄTIGUNGSTEST festgestellt.



## TEST D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE DU GROUPE B ISOLE D'UNE CULTURE

(bioMérieux réf. 39206 / Gen-Probe Cat. No. 102820/2820)

### **UTILISATION**

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE DU GROUPE B ISOLE D'UNE CULTURE est un test d'identification rapide par sonde ADN du streptocoque du groupe B isolé à partir d'une culture. Ce test utilise la technique d'hybridation des acides nucléiques.

### **INTRODUCTION**

Le streptocoque du groupe B (*Streptococcus agalactiae*) est l'une des principales causes de septicémie et de méningite chez le nouveau-né. La fréquence des pathologies liées au streptocoque du groupe B est estimée à 2 à 5 nouveau-nés pour 1.000 naissances (5). La contamination précoce, pendant la première semaine de vie, engendre un taux de mortalité supérieur à 50%. Quand la contamination survient après la première semaine, le taux de mortalité chute à 14 - 23% (1, 7). Le streptocoque du groupe B peut également, mais plus rarement, être responsable d'affections graves chez l'adulte (2).

Les méthodes physiologiques et biochimiques traditionnelles permettent de réaliser une identification par respiration. Ces méthodes comprennent l'examen après coloration de Gram, la recherche de catalase, l'étude de l'activité hémolytique sur gélose au sang de mouton et de l'hydrolyse de l'hippurate ou de la PYR (L-pyrrolidonyl- $\beta$ -naphthylamide), le CAMP-test et le test à la bile-esculine (4). Certains streptocoques du groupe A donnent, de la même façon que le streptocoque du groupe B, une réponse positive au CAMP-test. Par conséquent, la confirmation de l'identification du streptocoque du groupe B nécessite la combinaison de plusieurs tests biochimiques et/ou sérologiques. Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE GROUPE B ISOLE D'UNE CULTURE est une méthode rapide et objective permettant d'identifier de façon formelle le streptocoque du groupe B, grâce à la détection de séquences d'ARN ribosomal spécifiques de *Streptococcus agalactiae*.

### **PRINCIPE**

Les tests par hybridation d'acides nucléiques sont basés sur la capacité de brins complémentaires d'acides nucléiques à s'apparier de manière spécifique pour former des complexes bicaténaux stables (6). La méthode ACCUPROBE utilise une sonde ADN monocaténaire conjuguée à un marqueur chimiluminescent complémentaire de l'ARN ribosomal (ARNr) de l'organisme cible. Lorsque l'ARNr de l'organisme cible est libéré, la sonde s'hybride avec celui-ci pour former un complexe ADN-ARN stable. Le Réactif de Sélection permet de différencier les sondes hybridées des sondes non hybridées. Le luminomètre GEN-PROBE permet de mesurer le signal lumineux émis par les hybridés ADN-ARN. Le résultat est positif si le luminomètre indique une valeur supérieure ou égale à la valeur seuil; il est négatif s'il indique une valeur inférieure.

## **RÉACTIFS**

Les réactifs utilisés pour le TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE DU GROUPE B ISOLE D'UNE CULTURE sont fournis dans trois coffrets distincts:

### **COFFRET SONDE POUR LE STREPTOCOQUE DU GROUPE B AccuPROBE**

Réactif Sonde (P) (2 x 10 tubes)  
Streptococcus du groupe B

### **COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURE AccuPROBE**

Réactif 1 (Réactif de Lyse) (1) 1 x 10 ml  
Solution tamponnée contenant 0,04% d'azide de sodium

Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) (2) 1 x 10 ml  
Solution tamponnée

Réactif 3 (Réactif de Sélection) (3) 1 x 60 ml  
Solution tamponnée

### **COFFRET DE RÉACTIFS DE DÉTECTION GEN-PROBE**

Réactif de Détection I (RI) 1 x 240 ml  
0,1% d'eau oxygénée dans une solution d'acide nitrique 0,001 N

Réactif de Détection II (RII) 1 x 240 ml  
Hydroxyde de sodium 1 N

## **PRÉCAUTIONS D'UTILISATION**

- A. Pour diagnostic *in vitro* uniquement.
- B. Observer les précautions habituelles lors de la réalisation de ce test (3).
- C. A utiliser uniquement pour l'identification de *S. agalactiae* isolé à partir d'une culture.
- D. Utiliser uniquement le matériel fourni ou du matériel à usage unique.
- E. Les réactifs de ce coffret contiennent de l'azide de sodium susceptible de former, par réaction avec le plomb ou le cuivre des canalisations, des azides métalliques explosifs. Lors de l'évacuation de ces réactifs, prendre soin de toujours rincer abondamment à l'eau pour prévenir la formation d'azide dans la plomberie.
- F. Eviter le contact des Réactifs de Détection I et II avec la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer à l'eau. Si ces réactifs sont renversés, les diluer à l'eau avant d'essuyer.
- G. Il est recommandé pour obtenir des performances optimales de s'assurer que le produit est bien situé au fond du tube. S'il ne l'est pas, taper le tube pour rassembler le produit au fond.

## **CONSERVATION**

Les tubes de Réactif Sonde doivent être conservés dans leur sachet en aluminium entre 2° et 8°C. Ils sont stables avant ouverture jusqu'à la date de péremption. Après ouverture, le sachet doit être refermé hermétiquement et les tubes doivent être utilisés dans un délai de deux mois, dans la limite de la date de péremption.

Les autres réactifs contenus dans le TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE DU GROUPE

B peuvent être conservés entre 2° et 25°C, et restent stables jusqu'à la date de péremption.

### **NE PAS CONGELER LES RÉACTIFS.**

#### **PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON**

Le TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE DU GROUPE B ISOLE D'UNE CULTURE est conçu pour identifier le streptocoque du groupe B isolé à partir d'une culture.

- A. Identification à partir de culture sur milieu solide.** Le test peut être pratiqué sur des cultures réalisées sur un milieu solide approprié, lorsqu'on observe une morphologie suggestive du streptocoque du groupe B. L'échantillon peut être testé dès que les colonies sont visibles et dans les 72h suivantes.
1. L'échantillon de culture peut être prélevé à l'aide d'une ôse en plastique jetable de 1 µl, d'une ôse métallique, d'une aiguille en plastique jetable ou d'un bâtonnet applicateur. Ne pas utiliser d'écouvillon en raison de la faible quantité de liquide dans lequel les bactéries vont être remises en suspension.
  2. Il est possible de tester soit plusieurs petites colonies (3 ou 4), soit une seule colonie d'un diamètre d'au moins 1 mm.
  3. Eviter de prélever du milieu de culture avec les bactéries.
  4. Le manipulateur peut à ce stade décider d'ensemencer une autre boîte de Pétri pour confirmer la pureté de l'échantillon isolé.
- B. Identification sur bouillon de culture.** Le test peut être pratiqué à partir de bouillons de culture appropriés, comme le Todd-Hewitt, le thioglycollate ou le bouillon trypticase-soja, dont la turbidité doit être supérieure ou égale à 1 McFarland. Prélever à la pipette un échantillon de 50 µl de la suspension du bouillon parfaitement homogénéisé, et le verser dans le tube de Réactif Sonde en suivant les instructions du paragraphe PREPARATION DE L'ECHANTILLON.
- C. Identification pour écouvillons vaginaux ou anorectaux .**

Transporter les écouvillons vaginaux ou anorectaux au laboratoire à température ambiante dans un délai de 48 heures. Les échantillons doivent être stockés à 2° to 8°C et testés dans les 24 heures. Plonger l'écouvillon pendant une minute dans un bouillon de Lim (bouillon Todd Hewitt avec acide nalidixique et colistine ) et exprimer celui-ci contre la paroi du tube. Agiter sur vortex le tube contenant le bouillon et incubé à une température de 36° ± 1°C pendant 18 à 24 heures avant de passer à l'étape suivante. Après cette incubation, agiter sous vortex les tubes et transférer 50 µl d'échantillon de la suspension du bouillon bien mélangé dans les tubes réactifs "sondes" comme décrit dans le chapitre "Identification sur bouillon de culture"

#### **MATÉRIEL FOURNI**

TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE DU GROUPE B ISOLE D'UNE CULTURE  
bioMérieux réf. 39206 / Gen-Probe Cat. No. 102820/2820

	<b>20 Tests</b>
Réactif Sonde (P)	2 x 10 tubes

#### **MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI**

Ôses de 1 µl en plastique stérile, ôses métalliques, aiguilles en plastique ou bâtonnets applicateurs pour prélever les colonies

Souches de contrôle des cultures

Bain-marie ou bloc chauffant\* (60° ± 1°C)

Bain-marie ou bloc chauffant (36° ± 1°)

Micropipettes (50 µl, 300 µl)  
Pipettes répétitives (50 µl, 300 µl)  
Vortex  
Ecouillons avec ou sans milieu de transport (Milieux de Stuart, Stuart modifié ou Amies)  
Bouillons de culture (Todd-Hewitt, Lim, Thioglycollate ou Trypticase Soja)

\* Les emplacements à l'intérieur du bloc chauffant doivent être adaptés à des tubes de 12 x 75 mm. L'utilisation des blocs chauffants GEN-PROBE est recommandée.

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE DISPONIBLE CHEZ VOTRE  
DISTRIBUTEUR GEN-PROBE :

Luminomètre GEN-PROBE LEADER  
(bioMérieux réf. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)  
Bloc chauffant (60° ± 1°C)  
(bioMérieux réf. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)  
COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURES  
ACCUPROBE  
(bioMérieux réf. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 102800/2800)  
COFFRET DE REACTIFS DE DÉTECTION GEN-PROBE  
(bioMérieux réf. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791/1791)

## **MODE OPERATOIRE**

### **A. PRÉPARATION DU MATÉRIEL**

1. Régler le bain-marie ou le bloc chauffant à 36° ± 1°C.
2. Régler le bain-marie ou le bloc chauffant à 60° ± 1°C.
3. Préparer le luminomètre GEN-PROBE. S'assurer qu'il y ait suffisamment de Réactifs de Détection I et II pour pratiquer les tests.

### **B. CONTRÔLES**

Des souches de contrôle positif et négatif doivent être testées en routine dans chaque laboratoire selon la réglementation en vigueur. Une culture de streptocoque du groupe B (par ex. American Type Culture Collection, ATCC 13813) peut être utilisée comme contrôle positif et une culture de *Streptococcus bovis* (par ex. ATCC 33317) peut être utilisée comme contrôle négatif.

Si les échantillons à tester proviennent de milieux solides, prélever une colonie de 1 mm de chaque souche de contrôle à partir de la culture sur milieu solide. Si les échantillons à tester proviennent de bouillons de culture, ensemercer une colonie de chaque souche de contrôle dans le bouillon et incubé selon la méthode préconisée dans le paragraphe PRELEVEMENT ET PREPARATION DE L'ÉCHANTILLON.

### **C. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS**

1. Découper horizontalement la partie supérieure des sachets en aluminium. Retirer le nombre nécessaire de tubes de Réactif Sonde pour tester les échantillons et/ou les souches de contrôle. Refermer le sachet hermétiquement en rabattant plusieurs fois son extrémité et en la fixant à l'aide de ruban adhésif ou d'une pince. **Ne pas retirer le sachet dessicant.**
2. Identifier un nombre suffisant de tubes de Réactif Sonde pour tester les échantillons et/ou les souches de contrôle. Ôter et conserver les bouchons.
3. Distribuer 50 µl de Réactif 1 (Réactif de Lyse) dans tous les tubes de Réactif Sonde. **Si le test est effectué sur des souches isolées à partir de bouillons de culture, ne pas ajouter de Réactif 1**

**dans les tubes de Réactif Sonde.**

4. Transférer l'échantillon provenant du milieu solide ou 50 µl du bouillon de culture correctement homogénéisé dans les tubes de Réactif Sonde suivant les instructions du paragraphe PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON. Si le test est réalisé à partir d'une culture en milieu solide, agiter l'öse, l'aiguille ou le bâtonnet dans le Réactif 1 (Réactif de Lyse) et mélanger soigneusement pour remettre les microorganismes en suspension.
5. Refermer les tube de Réactif Sonde et les incuber à  $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 5 minutes dans le bain-marie ou 10 minutes dans l'incubateur.

**D. HYBRIDATION**

1. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou de l'incubateur. Ôter et conserver les bouchons. Distribuer 50 µl de réactif 2 (Tampon d'Hybridation) dans chaque tube de Réactif Sonde.
2. Refermer les tubes et les incuber pendant 15 minutes à  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  au bain-marie ou dans le bloc chauffant.

**E. SÉLECTION**

1. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou du bloc chauffant. Ôter et conserver les bouchons. Distribuer 300 µl de Réactif 3 (Réactif de Sélection) dans chaque tube. Reboucher les tubes et les agiter à l'aide d'un Vortex pour obtenir un mélange homogène.
2. Faire incuber les tubes de Réactif Sonde pendant 5 minutes à  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  au bain-marie ou dans le bloc chauffant.
3. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou du bloc chauffant et les laisser à température ambiante pendant au moins 5 minutes. Ôter et jeter les bouchons. **Lire les résultats à l'aide du luminomètre dans l'heure qui suit.**

**F. DÉTECTION**

1. Sélectionner le protocole approprié sur le luminomètre.
2. Afin de retirer tout résidu de la surface des tubes, les essuyer à l'aide de papier absorbant humide. Placer ensuite les tubes dans le luminomètre et suivre les instructions.
3. Lorsque l'analyse est terminée, retirer les tubes du luminomètre.

**REMARQUES**

- A. **RÉACTIFS:** Le Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) peut précipiter. Le chauffer à  $35^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$  et l'agiter pour dissoudre le précipité.
- B. **TEMPÉRATURE:** La préparation de l'échantillon, l'hybridation et la sélection sont thermo-dépendantes. Par conséquent il est impératif que l'incubateur, le bain-marie et le bloc chauffant soient maintenus à la température préconisée.
- C. **DURÉE DES OPÉRATIONS**
  1. La réaction d'hybridation doit être initiée dans l'heure qui suit l'introduction de l'échantillon et du Réactif 1 dans les tubes de Réactif Sonde.
  2. Les réactions d'hybridation et de sélection sont dépendantes du temps. L'hybridation doit durer au moins 15 minutes, mais pas plus de 20 minutes. Pendant l'étape de SELECTION, faire incuber les tubes de Réactif Sonde pendant au moins 5 minutes mais pas plus de 6 minutes.
- D. **BAIN-MARIE:** Le niveau d'eau dans le bain-marie doit être suffisamment élevé pour que la totalité du liquide

réactionnel des tubes de Réactif Sonde soit immergée, mais sans que l'eau ne puisse entrer dans les tubes.

- E. UTILISATION DU VORTEX: Il est essentiel de disposer d'un mélange homogène durant l'étape SÉLECTION, plus particulièrement après addition du Réactif 3.
- F. RESOLUTION D'INCIDENTS:
1. Des valeurs de contrôle négatif élevées (*Streptococcus bovis*, ATCC 33317), supérieures à 20.000 RLU (Relative Light Units) sur le LEADER ou à 600 PLU (Photometric Light Units) sur l'AccuLDR (anciennement PAL) peuvent être dues soit à une homogénéisation insuffisante après addition du Réactif 3 (Réactif de Sélection), soit à la présence simultanée de plusieurs types de colonies. Pour vérifier s'il s'agit d'une culture mixte, on peut en repiquer une partie sur un milieu gélosé approprié et la mettre à incuber.
  2. Des valeurs de contrôle positif faibles (*Streptococcus agalactiae*, ATCC 13813), inférieures à 50.000 RLU sur le LEADER ou à 1.500 PLU sur l'AccuLDR (anciennement PAL) peuvent être observées lorsque le nombre de germes est insuffisant, lorsque le test est effectué sur des cultures mixtes ou âgées. Pour vérifier s'il s'agit d'une culture mixte, on peut en repiquer une partie sur un milieu gélosé approprié et la mettre à incuber.

## RÉSULTATS

### A. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats du TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE DU GROUPE B ISOLE D'UNE CULTURE sont interprétés en fonction d'une valeur seuil. Les échantillons produisant un signal lumineux de valeur supérieure ou égale à ce seuil sont considérés comme positifs. Les signaux lumineux inférieurs à ce seuil sont considérés comme négatifs. Lorsque le résultat est situé dans la zone d'incertitude, le test doit être répété. Si la seconde analyse donne toujours des résultats équivoques, il faut repiquer la souche afin de vérifier sa pureté.

	<b>AccuLDR</b> (anciennement PAL)	<b>LEADER</b>
Valeur seuil	1.500 PLU	50.000 RLU
Zone d'incertitude	1.200 - 1.499 PLU	40.000 - 49.999 RLU

### B. CONTRÔLE DU QUALITÉ ET ACCEPTABILITÉ DES RESULTATS

Les contrôles négatifs (par ex. *S. bovis*, ATCC 33317) et positifs (par ex. *S. agalactiae*, ATCC 13813) doivent satisfaire aux valeurs suivantes:

	<b>AccuLDR</b> (anciennement PAL)	<b>LEADER</b>
Contrôle négatif	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Contrôle positif	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

### LIMITES DU TEST

Cette méthode a été testée sur des cultures fraîches réalisées sur milieux solides et sur les types de bouillons de culture cités dans le paragraphe PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON. Les performances de ce test pratiqué directement sur des échantillons cliniques n'ont pas été évaluées.

Les cultures provenant d'échantillons de dépistage prénatal ont seulement été validées avec le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE DU GROUPE B à partir de bouillon de Lim (bouillon Todd-Hewitt avec acide nalidixique et colistine). Les autres bouillons sélectifs liquides n'ont pas été testés.

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE DU GROUPE B donne des résultats positifs avec *Streptococcus equi*.

Les résultats du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE DU GROUPE B ISOLE D'UNE CULTURE doivent être interprétés en fonction des autres données du laboratoire et corrélés avec les données cliniques.

### VALEURS ATTENDUES

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE DU GROUPE B ISOLE D'UNE CULTURE a été comparé aux méthodes classiques de culture avec identification biochimique. Ces comparaisons ont été effectuées sur trois sites différents. Ont été testées: 299 souches du streptocoque du groupe B et 419 souches bactériennes issues de 16 genres différents. Une identification par les méthodes traditionnelles a été réalisée (coloration de ram, recherche de catalase, test d'hydrolyse de la PYR et CAMP-test).

Les souches ont été déterminées soit positives ( $\geq 50.0000$  RLU), soit négatives ( $< 50.0000$  RLU). Les observations ont montré que les cultures négatives avaient une valeur comprise entre 221 et 8.800 RLU et les cultures positives entre 56.300 et 1.360.000 RLU. La comparaison de ces résultats avec les méthodes classiques d'identification figure dans le tableau ci-dessous :

AccuPROBE / CULTURES						
AccuPROBE Culture	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilité/ Spécificité	Taux de Concordance
Site 1	99	0	0	152	100%/100%	100%
Site 2	100	0	0	100	100%/100%	100%
Site 3	100	0	0	167	100%/100%	100%
<b>Total</b>	<b>299</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>419</b>	<b>100%/100%</b>	<b>100%</b>

### PERFORMANCE DU TEST

#### A. PRÉCISION INTRA-ESSAI

La précision intra-essai du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE DU GROUPE B ISOLE D'UNE CULTURE a été calculée en analysant deux concentrations différentes d'ARN ribosomal de *S. agalactiae* 10 fois dans une même série.

Échantillon	A	B
Nombre de répliques	10	10
Réponse moyenne (RLU)	70.552	150.691
Ecart-type	5.472	11.428
Coefficient de variation	7,8%	7,6%

#### B. PRÉCISION INTER-ESSAI

La précision inter-essai a été calculée en analysant en simple deux concentrations différentes d'ARN ribosomal de *S. agalactiae*, au cours de 12 séries distinctes.

Échantillon	A	B
Nombre d'essais	12	12
Réponse moyenne (RLU)	74.825	147.682
Ecart-type	5.125	8.248
Coefficient de variation	6,9%	5,6%

#### C. SENSIBILITÉ ANALYTIQUE

La sensibilité analytique (limite de détection) du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE DU GROUPE B est de  $1.05 \times 10^5$  CFU de *Streptococcus* du groupe B avec des tests utilisant des méthodes solides ou liquides. Les écouvillons vaginaux ou anorectaux testés avec le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE DU GROUPE B ont montré une détection de 300 CFU de *Streptococcus* groupe B lorsqu'ils sont inoculés dans un bouillon de Lim et incubé pendant 18 à 24 heures.

#### D. SPECIFICITE

Un total de 93 souches de culture ATCC a été testé avec le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DU STREPTOCOQUE DU GROUPE B. Ces souches comprenaient 93 espèces de 47 genres différents. Un panel phylogénétique de 25 souches de 14 espèces de streptocoques dont 9 sérotypes du groupe B, 12 espèces d'entérocoques et 54 autres espèces de 45 autres genres a été testé.

Les 9 sérotypes du groupe B ont donné un résultat positif, ainsi que *Streptococcus equi*. Les autres microorganismes ont donné un résultat négatif.

#### E. TEST DE SURCHARGE

Des dilutions de *S. agalactiae* allant de 2.000 à 21 millions de bactéries par dilution, ont été testées en présence de *Streptococcus bovis* à une concentration de 21 millions de microorganismes par test. Aucune interférence ni réaction croisée n'a été observée.



## TEST DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B EN CULTIVO

(bioMérieux ref. 39206 / Gen-Probe Cat. No. 102820/2820)

### **UTILIZACION**

El TEST ACCU<sub>PROBE</sub> DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B APARTIR DE CULTIVO es un test rápido con sonda de ADN que utiliza la hibridación de ácido nucleico para la identificación de Streptococcus del Grupo B aislado en cultivo.

### **RESUMEN Y EXPLICACION DEL TEST**

El estreptococo del Grupo B (*Streptococcus agalactiae*) es una de las principales causas de septicemia y meningitis en el recién nacido. La incidencia de la enfermedad del Grupo B se estima en 2 - 5 lactantes por cada 1000 nacidos vivos (5). La aparición más precoz de esta enfermedad tiene lugar durante la primera semana de vida y presenta una tasa de mortalidad superior al 50%. Cuando la aparición se produce después del séptimo día, la tasa de mortalidad disminuye al 14 - 23% (1, 7). El estreptococo del Grupo B también causa enfermedades graves en el adulto, pero es mucho menos común que en el recién nacido (2).

La identificación presuntiva se realiza mediante métodos fisiológicos y bioquímicos tradicionales. Estos incluyen tinción Gram, reacción de catalasa, actividad hemolítica en placas de agar sangre de cordero, hidrólisis de hipurato o PYR y pruebas CAMP y de bilis-esculina (4). Existen algunos estreptococos del Grupo A que pueden dar resultados positivos en el test CAMP, similares a los del estreptococo del Grupo B. Por lo tanto, la identificación confirmada del estreptococo del Grupo B requiere la combinación de tests bioquímicos con tests serológicos. El TEST ACCU<sub>PROBE</sub> DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B EN CULTIVO ofrece un método rápido y no subjetivo para la identificación definitiva de estreptococos del Grupo B basada en la detección de las secuencias específicas del ARN ribosómico únicas de *Streptococcus agalactiae*.

### **PRINCIPIO DE LA TECNICA**

Los tests de hibridación de ácido nucleico se basan en la capacidad de cadenas complementarias de ácido nucleico para alinearse y asociarse de forma específica con el fin de formar complejos bicatenarios estables (6). El SISTEMA ACCU<sub>PROBE</sub> utiliza una sonda de ADN monocatenaria marcada con quimioluminiscencia, complementaria del ARN ribosómico del organismo diana. Después que el ARN ribosómico ha sido liberado del organismo, la sonda de ADN marcado se combina con el ARN ribosómico del organismo diana para formar un híbrido estable ADN:ARN. El Reactivo de Selección permite diferenciar las sondas hibridadas de las no hibridadas. Los híbridos ADN:ARN marcados son medidos en un luminómetro GEN-PROBE. Un resultado positivo es una lectura en el luminómetro igual o superior al valor umbral. Un valor por debajo de este umbral es un resultado negativo.

## **REACTIVOS**

Los reactivos del TEST AccuPROBE PARA LA IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B AISLADO EN CULTIVO son suministrados en tres kits de reactivos diferentes:

### **KIT SONDA AccuPROBE DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B**

Reactivo Sonda (P) (2 x 10 tubos)  
Estreptococos del Grupo B

### **KIT DE REACTIVO AccuPROBE PARA LA IDENTIFICACION EN CULTIVO**

Reactivo 1 Reactivo de Lisis (1) 1 x 10 ml  
solución tamponada que contiene 0,04% de azida sódica

Reactivo 2 Tampón de Hibridación (2) 1 x 10 ml  
solución tamponada

Reactivo 3 Reactivo de Selección (3) 1 x 60 ml  
solución tamponada

### **KIT DE REACTIVOS DE DETECCION GEN-PROBE**

Reactivo de Detección I (RI) 1 x 240 ml  
0,1% de peróxido de hidrógeno en ácido nítrico 0,001 N

Reactivo de Detección II (RII) 1 x 240 ml  
hidróxido de sodio 1 N

## **CUIDADOS DE UTILIZACION**

- A. Sólo para diagnóstico *in vitro*.
- B. Utilizar las precauciones habituales cuando se realice este ensayo (3).
- C. Utilizar sólo para estreptococos del Grupo B aislados en cultivo.
- D. Utilizar exclusivamente material de laboratorio suministrado o el material desechable especificado.
- E. Los reactivos de este kit contienen azida sódica que puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas, potencialmente explosivas.  
  
Al desechar estos reactivos, diluir el material en un volumen importante de agua para prevenir la acumulación de azidas en las tuberías.
- F. Evitar el contacto de los Reactivos de Detección I y II con la piel, los ojos y mucosas. Lavar con agua si estos reactivos entran en contacto con la piel. Si se producen derrames de estos reactivos, diluir con agua antes de secar.
- G. Para garantizar resultados óptimos, recomendamos que antes de utilizarlos se inspeccionen los tubos para observar si hay material retenido. Si se observa material retenido, golpear el tubo sobre la mesada con el fin de que todo el contenido quede al fondo del tubo.

## **CONSERVACION Y MANEJO**

Los tubos de Reactivo Sonda deben ser conservados en las bolsas de aluminio entre 2° y 8°C. Los tubos de Reactivo Sonda son estables en las bolsas sin abrir hasta la fecha de caducidad. Una vez abiertas, las bolsas deben ser cerradas nuevamente y los tubos deben utilizarse en los dos meses siguientes y antes de la fecha de

caducidad.

Otros reactivos utilizados en el TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B AISLADO EN CULTIVO pueden ser conservados entre 2° y 25°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada.

#### **NO CONGELAR LOS REACTIVOS.**

#### **TOMA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS**

El TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B AISLADO EN CULTIVO está diseñado para determinar la identidad de los estreptococos del Grupo B aislados en cultivo.

**A. Método en medio sólido.** Puede ser analizado un crecimiento en medio sólido que sugiera la presencia de estreptococos del Grupo B. Las muestras pueden ser analizadas apenas el crecimiento sea visible y antes de las 72 horas.

1. Las colonias pueden ser tomadas con un asa de plástico desechable de 1 µl, un asa metálica, una aguja de plástico desechable o un bastoncillo. No deben usarse torundas dada la pequeña cantidad de líquido en la cual serán resuspendidas nuevamente las células.
2. Si se analiza una sola colonia, debe tener como mínimo 1 mm de diámetro. Puede analizarse un asa de 1 µl llena de células o varias colonias más pequeñas (3 - 4).
3. Evitar tomar medio sólido junto con las células.
4. El usuario puede decidir inocular otra placa de cultivo en este momento, con el fin de confirmar la pureza de la muestra.

**B. Método en caldo de cultivo.** Con esta sonda pueden analizarse crecimientos en caldos de cultivo tales como Todd Hewitt, caldo de Lim, tioglicolato o caldo de soja tripticasa, con una turbidez equivalente o superior a 1 McFarland. Mezclar con Vortex el caldo del tubo. Pipetear una muestra de 50 µl de una suspensión bien homogeneizada dentro de los tubos de Reactivo Sonda, como se describe a continuación.

**C. Método para muestras vaginales y/o ano-rectales tomadas con escobillón.**

El transporte al laboratorio de las muestras vaginales y/o ano-rectales debe hacerse en las 48 horas siguientes a la toma de muestra a temperatura ambiente. Las muestras pueden ser conservadas 24 horas adicionales a 2° to 8°C antes de analizarse. Introducir el escobillón en un tubo con caldo Lim (caldo Todd Hewitt con ácido nalidixico y colistina) al menos 1 minuto y después exprimir contra la pared del tubo. Mezclar bien el caldo e incubar a 36° ± 1°C durante 18 - 24 horas antes de realizar el ensayo. Después de incubar, mezclar y pipetear 50 µl de muestra del caldo bien mezclado en los Tubos de Reacción como se indica en el párrafo Procedimiento del Test, Método Medios en Caldo.

#### **MATERIALES SUMINISTRADOS**

TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B AISLADO EN CULTIVO (bioMérieux ref. 39206 / Gen-Probe Cat. No. 102820/2820)

##### **20 Tests**

Reactivo Sonda (P)

2 x 10 tubos

#### **MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS**

Asas de siembra estériles de plástico de 1 µl, asas metálicas, agujas de plástico o bastoncillos para seleccionar

colonias

Cepas de cultivo de control

Incubador o baño maría \* (35° a 37°C)

Baño maría o bloque calefactor \* (60° ± 1°C)

Micropipetas (50 µl, 300 µl)

Pipetas de repetición (50 µl, 300 µl)

Agitador Vortex

Torundas con o sin medio de transporte (como Stuart, Stuart modificado o Amies)

Caldo de cultivo (como Todd-Hewitt, Lim, Tioglicolato o Tripcasa-Soja)

\*Los bloques térmicos en el bloque calefactor deben contar con pocillos de tamaño adecuado para tubos de 12 x 75 mm. Se recomienda utilizar bloques calefactores GEN-PROBE.

DISPONIBLE EN SU DISTRIBUIDOR GEN-PROBE:

Luminómetro LEADER 50i de GEN-PROBE

(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)

KIT DE REACTIVOS DE IDENTIFICACION AccuPROBE

(bioMérieux ref. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 102800/2800)

KIT DE REACTIVOS DE DETECCION GEN-PROBE

(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791/1791)

Bloque calefactor (60° ± 1°C)

(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)

## **TECNICA**

### **A. PREPARACION DEL EQUIPO**

1. Ajustar el incubador o el baño maría entre 35° y 37°C.
2. Ajustar el baño maría o el bloque calefactor a 60° ± 1°C.
3. Preparar el luminómetro GEN-PROBE para su funcionamiento. Verificar que se cuenta con un volumen suficiente de Reactivos de Detección I y II para completar los tests.

### **B. CONTROLES**

En cada laboratorio deberían analizarse rutinariamente cepas de control positivo y negativo, conforme a la reglamentación locales. Un cultivo de estreptococos del Grupo B (p. ej., American Type Culture Collection, ATCC #13813) puede ser utilizado como control positivo mientras que un cultivo de *Streptococcus bovis* (p. ej., ATCC #33317) puede ser utilizado como control negativo.

Si las muestras a analizar, provienen de medios sólidos, seleccionar una colonia de 1 mm de cada cepa control a partir del cultivo en medio sólido. Si las muestras a analizar provienen de caldos de cultivo, sembrar una colonia de cada cepa control en el caldo e incubar según el método indicado en el párrafo AISLAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

### **C. PREPARACION DE LAS MUESTRAS**

1. Abrir la bolsa de aluminio cortando su parte superior. Retirar suficientes tubos de Reactivo Sonda para analizar las muestras y/o los controles. Volver a sellar la bolsa doblando varias veces su extremo abierto y asegurándolo con una cinta adhesiva o una pinza. **Dejar la bolsita con el desecante dentro de la bolsa.**
2. Colocar etiquetas en un número suficiente de tubos de Reactivo Sonda como para analizar las muestras aisladas y/o los controles. Retirar y conservar los tapones.

3. Pipetear 50 µl de Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) en todos los tubos de Reactivo Sonda. Si se analizan cultivos en caldo, no añadir Reactivo 1 a los tubos de Reactivo Sonda.
4. Transferir las muestras desde el medio sólido o 50 µl de un cultivo en caldo bien homogeneizado a los tubos de Reactivo Sonda, tal como se describe en la sección TOMA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS. Agitar el asa, aguja o bastoncillo en el Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) para resuspender las células, si se analiza una muestra de medio sólido, y mezclar bien.
5. Volver a tapar los tubos de Reactivo Sonda e incubarlos entre 35° y 37°C durante 5 minutos en un baño maría, o bien 10 minutos entre 35° y 37°C en una incubadora.

#### D. HIBRIDACION

1. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o del incubador. Quitar y conservar los tapones. Pipetear 50 µl de Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) en todos los tubos de Reactivo Sonda.
2. Volver a tapar los tubos de Reactivo Sonda e incubar durante 15 minutos a 60° ± 1°C en un baño maría o bloque calefactor.

#### E. SELECCION

1. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o bloque calefactor. Retirar y conservar los tapones. Pipetear 300 µl de Reactivo 3 (Reactivo de Selección) en cada tubo. Volver a tapar los tubos y mezclarlos en el Vortex hasta que estén bien homogeneizados.
2. Incubar los tubos de Reactivo Sonda durante 5 minutos a 60° ± 1°C en un baño maría o bloque calefactor.
3. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o bloque calefactor y dejarlos a temperatura ambiente durante por lo menos 5 minutos. Quitar y eliminar los tapones. Leer los resultados en el luminómetro en la hora siguiente.

#### F. DETECCION

1. Seleccionar el protocolo apropiado en el menú del software del luminómetro.
2. Utilizando un paño húmedo o una toalla de papel, limpiar cada tubo para verificar que no quedan residuos en la parte exterior del tubo e insertarlo en el luminómetro, siguiendo las instrucciones del instrumento.
3. Una vez completado el análisis, retirar el o los tubos del luminómetro.

#### **OBSERVACIONES**

- A. **REACTIVO:** El Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) puede precipitar. Calentar y mezclar la solución entre 35° y 60°C para disolver el precipitado.
- B. **TEMPERATURA:** Las reacciones de preparación de la muestra, hibridación y selección son termodependientes. Por lo tanto, es indispensable que el incubador, baño maría o bloque calefactor se mantenga dentro del rango de temperatura especificado.
- C. **TIEMPO:**
  1. La reacción de hibridación debe iniciarse dentro de la hora que sigue a la incorporación de las células y el Reactivo 1 a los tubos de Reactivo Sonda.
  2. Las reacciones de hibridación y selección son cronodependientes. Hibridar durante por lo menos 15 minutos, pero no más de 20 minutos. Incubar los tubos de Reactivo Sonda en la etapa de SELECCIÓN durante por lo menos 5 minutos, pero no más de 6 minutos.

- D. BAÑO MARIA: El nivel de agua en el baño maría debe ser suficiente para permitir que todo el líquido de reacción de los tubos de Reactivo Sonda se encuentre sumergido.
- E. VORTEX: Es crítico contar con una mezcla homogénea durante la etapa de SELECCIÓN y específicamente después de incorporar el Reactivo 3.
- F. DETECCION DE FALLOS:
1. Valores altos de control negativo (*Streptococcus bovis*, ATCC #33317), superiores a 20.000 RLU (Relative Light Units - Unidades Relativas de Luz) en el LEADER, o a 600 PLU (Photometric Light Units - Unidades Fotométricas de Luz) en el AccuLDR (antes PAL) pueden ser provocadas por una homogeneización insuficiente después de añadir el Reactivo 3 (Reactivo de Selección) o por analizar cultivos mixtos. Dado que pueden aparecer cultivos mixtos, una parte de las colonias puede ser sembrada en un medio de agar adecuado e incubarla para verificar la presencia de varios tipos de colonia.
  2. Valores bajos de control positivo (*Streptococcus agalactiae*, ATCC #13813), inferiores a 50.000 RLU en el LEADER, o a 1.500 PLU en el AccuLDR (antes PAL) pueden ser provocados por una cantidad insuficiente de células o por analizar cultivos mixtos o viejos. Dado que pueden aparecer cultivos mixtos, una parte de las colonias puede ser sembrada en un medio de agar apropiado e incubarse para verificar la presencia de varios tipos de colonias.

## RESULTADOS

### A. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Los resultados del TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B AISLADO EN CULTIVO se basan en los valores umbrales que siguen. Las muestras que producen señales superiores o iguales a esos valores umbral son consideradas positivas. Las señales inferiores a los valores umbral son consideradas negativas. Los valores en rangos de repetición deben repetirse.

	AccuLDR (antes PAL)	LEADER
Valor umbral	1.500 PLU	50.000 RLU
Rango de repetición	1.200 - 1.499 PLU	40.000 - 4 9.999 RLU

### B. CONTROL DE CALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS

El control negativo (p. ej., *S. bovis*, ATCC #33317) y el control positivo (p. ej., *S. agalactiae*, ATCC # 13813) deben satisfacer los siguientes valores:

	AccuLDR (antes PAL)	LEADER
Control negativo	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Control positivo	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

## LIMITES DEL METODO

Este método ha sido probado para utilizar muestras frescas de un medio sólido o de los caldos de cultivo enumerados en la sección TOMA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS. La eficacia de este test no ha sido demostrada en muestras clínicas directas.

Los cultivos procedentes de muestras de screening prenatal, han sido validados únicamente con el TEST IDENTIFICACIÓN DE STREPTOCOCCUS GRUPO B DE ACCUPROBE a partir de caldo de cultivo LIM (caldo Todd-Hewitt con ácido nalidíxico y colistina). No se han testado otros tipos de caldos selectivos.

El TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B AISLADO EN CULTIVO reaccionará positivamente con muestras de *Streptococcus equi*.

Los resultados del TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B AISLADO EN CULTIVO deben ser interpretados conjuntamente con otros datos clínicos y de laboratorio disponibles para el médico clínico.

### **VALORES ESPERADOS**

El TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B AISLADO EN CULTIVO fue comparado con métodos de identificación de cultivos bioquímicos standard utilizando 299 muestras de especies de estreptococos del Grupo B y 419 muestras de otras bacterias procedentes de 16 géneros. Los métodos de identificación standard incluyeron tinción Gram, reacción de la catalasa y tests PYR y CAMP. Las muestras fueron clasificadas como positivas ( $\geq 50.000$  RLU) o negativas ( $< 50.000$  RLU). El rango de observaciones para los cultivos negativos fue de 221 a 8.800 RLU y de 56.300 a 1.360.000 RLU para los cultivos positivos. Una comparación de estos resultados con métodos standard de identificación de cultivos se presenta más adelante.

#### **AccuPROBE/ IDENTIFICACION DE CULTIVOS**

<b>AccuPROBE Cultivo</b>	<b>Pos Pos</b>	<b>Pos Neg</b>	<b>Neg Pos</b>	<b>Neg Neg</b>	<b>Sensibilidad/ Especificidad</b>	<b>Porcent. Concordancia</b>
Sitio 1	99	0	0	152	100%/100%	100%
Sitio 2	100	0	0	100	100%/100%	100%
Sitio 3	100	0	0	167	100%/100%	100%
<b>Total</b>	<b>299</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>419</b>	<b>100%/100%</b>	<b>100%</b>

### **VALORES ESPERADOS**

#### **A. PRECISION DENTRO DEL ENSAYO**

La precisión dentro del ensayo del TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B AISLADO EN CULTIVO fue calculada analizando dos concentraciones de ARN ribosómico aislados de *Streptococcus agalactiae* utilizando 10 replicaciones en un solo ensayo.

<b>Muestra</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Número de replicaciones	10	10
Respuesta media	70.552	150.691
Desviación standard	5.472	11.428
Coficiente de variación	7,8%	7,6%

#### **B. PRECISION ENTRE ENSAYOS**

La precisión entre ensayos fue calculada analizando las mismas dos concentraciones de ARN ribosómico de *Streptococcus agalactiae*, utilizando determinaciones únicas en 12 ensayos consecutivos.

<b>Muestra</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Número de replicaciones	12	12
Respuesta media	74.825	147.682
Desviación standard	5.125	8.248
Coefficiente de variación	6,9%	5,6%

#### C. SENSIBILIDAD ANALITICA

La sensibilidad analítica (límites de detección) del Test AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B AISLADO EN CULTIVO obtenida fue de  $1.05 \times 10^5$  UFC de Streptococcus del Grupo B a partir de medios sólidos o caldos. Las muestras vaginal /ano-rectal obtenidas con torunda mostraron una sensibilidad de 300 UFC de Streptococcus Grupo B cuando se inocularon en caldo Lim y fueron incubadas durante 18 a 24 horas.

#### D. ESPECIFICIDAD

Fueron evaluadas un total de 93 muestras de cultivos utilizando el TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B AISLADO EN CULTIVO. Estas muestras representaban un total de 93 especies de 47 géneros. Veintidós muestras de 14 especies de *Streptococcus*, incluyendo los 9 serotipos de estreptococo del Grupo B, 12 especies de *Enterococcus* y 54 otras especies de 45 géneros, que representaban un corte filogenético de organismos, fueron evaluadas utilizando el TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B AISLADO EN CULTIVO. Los 9 serotipos de estreptococo del Grupo B reaccionaron positivamente con la sonda. Adicionalmente, *Streptococcus equi* también reaccionó positivamente con la sonda. Todas las otras especies analizadas dieron resultados negativos.

#### E. TEST DE SOBRECARGA

*Streptococcus bovis* fue añadido a una concentración de 21 millones de células por test, el test de sobrecarga no interfirió solo en muestras que contenían entre 2 mil y 21 millones de células de *S. agalactiae* cuando se utilizó el TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE STREPTOCOCCUS DEL GRUPO B AISLADO EN CULTIVO.



**TEST DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCO  
DI GRUPPO B  
ISOLATO DA UNA CULTURA**

(bioMérieux cod. 39206 / Gen-Probe Cat. N. 102820/2820)

**IMPIEGO**

Il TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCO DI GRUPPO B ISOLATO DA UNA CULTURA è un test per l'identificazione rapida, mediante sonda a DNA, dello streptococco di gruppo B isolato da una coltura. Questo test impiega la tecnica di ibridazione degli acidi nucleici.

**INTRODUZIONE**

Lo streptococco di gruppo B (*Streptococcus agalactiae*) è uno dei maggiori responsabili di setticemie e meningiti nei neonati. Si stima che le patologie correlate allo streptococco di gruppo B colpiscano da 2 a 5 neonati ogni 1.000 (5). La contaminazione precoce durante la prima settimana di vita comporta un tasso di mortalità che supera il 50%. Quando la contaminazione insorge dopo la prima settimana, il tasso di mortalità scende al 14 - 23% (1, 7). Lo streptococco di gruppo B può essere anche all'origine, benché il fenomeno sia più raro, di gravi affezioni nell'adulto (2).

Le metodiche fisiologiche e biochimiche tradizionali permettono di realizzare un'identificazione presuntiva. Fra queste metodiche annoveriamo l'esame dopo colorazione di Gram, la ricerca della catalasi, lo studio dell'attività emolitica su agar-sangue di montone e dell'idrolisi dell'ippurato o della PYR (L-pirrolidonil-β-naftilammide), il CAMP-test ed il test alla bile ed esculina (4). Taluni streptococchi di gruppo A mostrano, così come lo streptococco di gruppo B, una risposta positiva al CAMP-test. Di conseguenza, la conferma dell'identificazione dello streptococco di gruppo B richiede la combinazione di più test biochimici e/o sierologici. Il TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCO DI GRUPPO B ISOLATO DA UNA CULTURA è un metodo rapido ed obiettivo che permette l'identificazione definitiva dello streptococco di gruppo B grazie alla rilevazione di specifiche sequenze di RNA ribosomiale dello *Streptococcus agalactiae*.

**PRINCIPIO OPERATIVO**

I test di ibridazione degli acidi nucleici sfruttano la capacità dei filamenti complementari di acidi nucleici di accoppiarsi in maniera specifica e formare composti stabili a doppia catena (6). Il test AccuPROBE impiega una sonda a DNA a catena singola - associata ad un marker chemiluminescente - complementare all'RNA ribosomiale (rRNA) dell'organismo bersaglio. Una volta liberato l'rRNA dell'organismo bersaglio, la sonda si combina con le sue sequenze omologhe formando un complesso DNA-RNA stabile. Il Reagente di Selezione permette di differenziare le sonde ibridate da quelle non ibridate. Il luminometro GEN-PROBE permette di misurare il segnale luminoso emesso dagli ibridi DNA-RNA. Il risultato sarà positivo se il luminometro indicherà un valore superiore o uguale al valore soglia; negativo se mostrerà un valore inferiore.

## **REAGENTI**

I Reagenti impiegati nel TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCO DI GRUPPO B ISOLATO DA UNA COLTURA sono forniti in tre diversi kit:

### **KIT SONDA PER LO STREPTOCOCCO DI GRUPPO B AccuPROBE**

Reagente Sonda (P) (2 x 10 provette)

Streptococcus del gruppo B

### **KIT DI REAGENTI PER IDENTIFICAZIONE DI COLTURA AccuPROBE**

Reagente 1 (Reagente di Lisi) (1) 1 x 10 ml

Soluzione tamponata contenente 0,04% di sodio azide

Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) (2) 1 x 10 ml

Soluzione tamponata

Reagente 3 (Reagente di Selezione) (3) 1 x 60 ml

Soluzione tamponata

### **KIT DI REAGENTI DI RIVELAZIONE GEN-PROBE**

Reagente di Rivelazione I (RI) 1 x 240 ml

0,1% di acqua ossigenata in acido nitrico 0,001 N

Reagente di Rivelazione II (RII) 1 x 240 ml

Iodossido di sodio 1 N

## **PRECAUZIONI D'USO**

- A. Il test è riservato esclusivamente ad un uso diagnostico *in vitro*.
- B. Durante la realizzazione di questo test adottare le normali precauzioni (3).
- C. Da usarsi esclusivamente per l'identificazione dello *S. agalactiae* isolato a partire da una coltura.
- D. Impiegare unicamente il materiale compreso nel kit o materiale monouso.
- E. I reagenti di questo kit contengono sodio azide, una sostanza che può reagire con il piombo o il rame delle condutture e formare composti metallici esplosivi. Durante l'eliminazione di questi reagenti ricordarsi di utilizzare sempre acqua in abbondanza per evitare la formazione di tali composti nelle tubature.
- F. Evitare qualsiasi contatto della cute, degli occhi e delle mucose con i Reagenti di Rivelazione I e II. In caso di contatto, sciacquare accuratamente con acqua le parti interessate. Se si verificassero versamenti di reagenti diluirli con acqua prima di asciugare la superficie.
- G. Al fine di ottenere prestazioni ottimali è necessario che il prodotto si raccolga sul fondo della provetta. Se non fosse così, richiudere la provetta per far sì che il prodotto si depositi sul fondo.

## **CONSERVAZIONE**

Le provette di Reagente Sonda devono essere conservate nelle confezioni di alluminio a temperature comprese fra 2° e 8°C. Prima dell'apertura rimangono stabili fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura, la confezione deve essere richiusa e le provette devono essere usate nell'arco di due mesi, entro e non oltre la data di scadenza.

Gli altri reagenti del TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCO DEL GRUPPO B possono essere conservati ad una temperatura compresa tra 2° e 25°C e rimangono stabili fino alla data di scadenza.

## NON CONGELARE I REAGENTI.

### **PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**

Il TEST ACCU<sub>PROBE</sub> DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCO DI GRUPPO B ISOLATO DA UNA CULTURA é stato sviluppato e progettato per identificare lo streptococco del gruppo B isolato a partire da una coltura.

**A. Identificazione a partire da coltura solida.** Il test può essere condotto su terreni solidi adeguati quando si osserva una morfologia che può far pensare allo streptococco del gruppo B. Il campione può essere testato non appena risulti visibile la proliferazione e nelle 72 ore successive.

1. Il campione di coltura può essere prelevato mediante un'ansa di plastica monouso da 1 µl, un'ansa metallica ovvero un ago in plastica monouso o una bacchetta per applicazione. Data la bassa quantità di liquido in cui i batteri verranno rimessi in sospensione si consiglia di non usare tamponi.
2. Esiste la possibilità di testare numerose piccole colonie (3 o 4) oppure un'unica colonia il cui diametro sia almeno di 1 mm.
3. Evitare di prelevare il mezzo di coltura insieme ai batteri.
4. A questo punto la persona addetta può decidere di inoculare un'altra piastra di Petri per confermare la purezza del campione isolato.

**B. Identificazione su brodo di coltura.** Il test può essere condotto su brodi di coltura adeguati, come il brodo Todd-Hewitt, il tioglicolato o il brodo tripticase-soia la cui torbidità deve essere superiore o uguale a 1 McFarland. Prelevare con la pipetta un campione da 50 µl della sospensione del brodo perfettamente omogeneizzato e dispensarlo nella provetta di Reagente Sonda attenendosi alle istruzioni del paragrafo PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.

**C. Metodo per campioni prelevati con tampone vaginale e/o rettale**

Trasportare in laboratorio a temperatura ambiente, entro 48 ore dal prelievo, i tamponi vaginali e/o rettali. Prima di essere testati i campioni possono essere conservati in laboratorio per altre 24 ore a 2° - 8°C. Immergere il tampone nella provetta del brodo Lim (brodo Todd Hewitt con acido nalidixico e colistina) per almeno un minuto, quindi spremerlo contro la parete della provetta. Vortexare la provetta del brodo ed incubare a 36° ±1°C per 18 - 24 ore prima di eseguire il test. Dopo l'incubazione, vortexare la provetta del brodo e pipettare 50 µL di campione prelevato dalla sospensione in brodo ben miscelata nel Probe Reagent Tubes come descritto nel Procedimento, Broth Media Method.

### **MATERIALE COMPRESO NEL KIT**

TEST ACCU<sub>PROBE</sub> DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCO DEL GRUPPO B ISOLATO DA UNA CULTURA (bioMérieux cod. 39206 / Gen-Probe Cat. N. 102820/2820)

#### **20 Test**

Reagente Sonda (P)

2 x 10 provette

### **MATERIALE RICHiesto NON FORNITO NEL KIT**

Anse da 1 µl in plastica sterile, anse metalliche, aghi in plastica o bacchette per applicazione per il prelievo delle colonie.

Ceppi di controllo delle colture

Bagnomaria o incubatore\* (36° ± 1°C)

Bagnomaria o incubatore\* (60° ± 1°C)

Micropipette (50 µl, 300 µl)

Micropipette a volume fisso (50 µl, 300 µl)

Vortex

Tamponi con o senza terreno di trasporto (ad esempio Stuart, Stuart modificato o Amies)

Brodo (ad esempio Todd Hewitt, Brodo Lim, Tioglicolato, o Brodo Tripticasi Soia)

\*Gli alloggiamenti all'interno dell'incubatore devono essere perfettamente dimensionati per provette da 12 x 75 mm. Si raccomanda l'impiego di incubatori GEN-PROBE.

ULTERIORE MATERIALE DISPONIBILE PRESSO IL VOSTRO DISTRIBUTORE GEN-PROBE:

Luminometro GEN-PROBE LEADER 50i

(bioMérieux cod. 39400 / Gen-Probe Cat. N. 103100i/3100i)

KIT DI REAGENTI PER IDENTIFICAZIONE DI COLTURE AccuPROBE

(bioMérieux cod. 39305 / Gen-Probe Cat. N. 102800/2800)

KIT DI REAGENTI DI RIVELAZIONE GEN-PROBE

(bioMérieux cod. 39300 / Gen-Probe Cat. N. 201791/1791)

Incubatore (60° ± 1°C)

(bioMérieux cod. 39406 / Gen-Probe Cat. N. 3397)

## **PROCEDIMENTO**

### **A. PREPARAZIONE DEL MATERIALE**

1. Impostare un incubatore o un bagnomaria a 36° ± 1°C.
2. Impostare un incubatore o un bagnomaria a 60° ± 1°C.
3. Preparare il luminometro GEN-PROBE. Assicurarsi che la quantità di Reagenti di Rivelazione I e II sia sufficiente per eseguire i test.

### **B. CONTROLLI**

In ogni laboratorio occorre testare sistematicamente ceppi come controllo positivo e negativo, secondo le normative in vigore. È possibile usare una coltura di streptococco del gruppo B (ad es. American Type Culture Collection, ATCC 13813) come controllo positivo e una coltura di *Streptococcus bovis* (ad es. ATCC 33317) come controllo negativo.

Se vengono testati campioni colturali su terreni solidi, selezionare una colonia del diametro di 1 mm per ogni ceppo di controllo sviluppato su terreno solido. Se si utilizza una coltura in brodo, inoculare nel brodo una colonia di ogni ceppo di controllo ed incubare secondo il procedimento indicato nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAPIONE.

### **C. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**

1. Tagliare orizzontalmente la parte superiore delle confezioni di alluminio. Prelevare il numero necessario di provette del Reagente Sonda per testare i campioni e/o le colture di controllo. Richiudere ermeticamente la confezione ripiegando più volte l'estremità e fermandola con nastro adesivo o con una clip. **Non asportare il sacchetto del disidratante.**
2. Predisporre un numero sufficiente di provette del Reagente Sonda per testare i campioni e/o le colture di controllo. Rimuovere e conservare i tappi.
3. Dispensare 50 µl di Reagente 1 (Reagente di Lisi) in tutte le provette del Reagente Sonda. **Qualora il test venga condotto su ceppi isolati a partire da brodi di coltura non aggiungere Reagente 1 nelle provette del Reagente Sonda.**

4. Trasferire il campione proveniente dal terreno di coltura solido o 50 µl del brodo di coltura correttamente omogeneizzato nelle provette del Reagente Sonda, attenendosi alle istruzioni fornite nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. Se il test viene eseguito su un terreno solido, agitare l'ansa, l'ago o la bacchetta nel Reagente 1 (Reagente di Lisi) e mescolare con cura per rimettere i microrganismi in sospensione.
5. Richiudere le provette di Reagente Sonda e mettere in incubazione a  $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , per 5 minuti nel bagnomaria o per 10 minuti nell'incubatore.

#### D. IBRIDAZIONE

1. Togliere le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore. Rimuovere e conservare i tappi. Dispensare 50 µl di reagente 2 (Tampone di Ibridazione) in ogni provetta del Reagente Sonda.
2. Richiudere le provette e metterle in incubazione a  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , per 15 minuti, nel bagnomaria o nell'incubatore.

#### E. SELEZIONE

1. Prelevare le provette del Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore. Rimuovere e conservare i tappi. Dispensare 300 µl di Reagente 3 (Reagente di Selezione) in ogni provetta. Richiudere le provette e vortexarle per rendere omogenea la miscela.
2. Mettere le provette del Reagente Sonda in incubazione per 5 minuti a  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  nel bagnomaria o nell'incubatore.
3. Togliere le provette del Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore e lasciarle a temperatura ambiente almeno per 5 minuti. Rimuovere ed eliminare i tappi. **Avvalendosi di un luminometro leggere i risultati del test nell'ora successiva.**

#### F. LETTURA

1. Selezionare il protocollo giusto sul luminometro.
2. Per eliminare completamente i residui dalla superficie delle provette, asciugarle utilizzando un foglio assorbente inumidito. Inserire successivamente le provette nel luminometro e seguire attentamente le istruzioni.
3. Una volta conclusa l'analisi, estrarre le provette dal luminometro.

#### **OSSERVAZIONI**

- A. REAGENTI: il Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) può precipitare. Per sciogliere il precipitato riscaldarlo a  $35^{\circ}$ -  $60^{\circ}\text{C}$  e agitarlo.
- B. TEMPERATURA: La preparazione del campione, l'ibridazione e la selezione sono reazioni temperatura-dipendenti. Di conseguenza, è indispensabile mantenere il bagnomaria o l'incubatore alla temperatura raccomandata.
- C. DURATA DELLE OPERAZIONI:
  1. La reazione di ibridazione deve essere avviata nell'ora successiva all'introduzione del campione e del Reagente 1 nelle provette del Reagente Sonda.
  2. Le reazioni di ibridazione e di selezione dipendono dal tempo. L'ibridazione deve durare come minimo 15 minuti e come massimo 20 minuti. Durante la SELEZIONE mettere le provette del Reagente Sonda in incubazione almeno per 5 minuti senza superare però il limite dei 6 minuti.
- D. BAGNOMARIA: Il livello dell'acqua deve essere sufficientemente alto per far sì che la totalità del liquido di reazione delle provette di Reagente Sonda sia completamente sommersa, evitando comunque che l'acqua

penetri nelle provette.

- E. USO DEL VORTEX: È fondamentale disporre di una miscela omogenea durante la SELEZIONE, in modo particolare dopo l'aggiunta del Reagente 3.
- F. SOLUZIONE DI EVENTUALI PROBLEMI
1. Alti valori del controllo negativo (*Streptococcus bovis*, ATCC 33317) superiori a 20.000 RLU (Relative Light Units) sul LEADER o a 600 PLU (Photometric Light Units) sull' AccuLDR (precedentemente PAL) possono essere riscontrati quando l'omogeneizzazione è stata insufficiente dopo l'aggiunta del Reagente 3 (Reagente di Selezione) o quando siano presenti contemporaneamente più tipi di colonie. Per verificare che si tratta di una colonia mista è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura e metterla ad incubare.
  2. Bassi valori di controllo positivo (*Streptococcus Agalactiae*, ATCC 13813) inferiori a 50.000 RLU sul LEADER o a 1.500 PLU sull'AccuLDR (precedentemente PAL) possono essere rilevati quando il numero di germi è insufficiente o quando il test viene effettuato su colture miste o invecchiate. Per verificare che si tratti di una coltura mista è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura e metterla ad incubare.

## **RISULTATI DEL TEST**

### **A. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

I risultati del test AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCO DI GRUPPO B ISOLATO DA UNA COLTURA vengono interpretati in base ad un valore soglia. I campioni che producono un segnale luminoso di valore superiore o uguale a questa soglia vengono considerati positivi. I segnali luminosi inferiori a questa soglia sono considerati negativi. Quando il risultato si posiziona nell'area di incertezza, il test deve essere ripetuto.

	<b>AccuLDR</b> (precedentemente PAL)	<b>LEADER</b>
Valore limite	1.500 PLU	50.000 RLU
Area di incertezza	1.200 - 1.499 PLU	40.000 - 49.999 RLU

### **B. CONTROLLO DI QUALITÀ ED ACCETTABILITÀ DEI RISULTATI**

I controlli negativi (ad es. *S. Bovis*, ATCC 33317) e positivi (ad es. *S. agalactiae*, ATCC 13813) devono fornire i seguenti valori:

	<b>AccuLDR</b> (precedentemente PAL)	<b>LEADER</b>
Controllo negativo	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Controllo positivo	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

## **LIMITI DEL TEST**

Questo metodo è stato testato su colture fresche realizzate su terreni di coltura solidi e sui brodi di coltura menzionati nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. Le performance di questo test eseguito direttamente sui campioni clinici non sono state valutate.

Le colture di campioni per lo screening prenatale sono stati analizzate con il TEST DI IDENTIFICAZIONE DELLO

STREPTOCOCCO DI GRUPPO B ISOLATO DA UNA COLTURA unicamente a partire dal brodo Lim (Todd Hewitt con acidi nalidixico e colistina); non sono stati testati altri brodi selettivi.

Il TEST ACCUProbe DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCO DI GRUPPO B evidenzia risultati positivi con lo *Streptococcus equi*.

I risultati del TEST ACCUProbe DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCO DI GRUPPO B ISOLATO DA UNA COLTURA devono essere interpretati in funzione degli altri dati di laboratorio e correlati ai dati clinici.

### **VALORI ATTESI**

Il TEST ACCUProbe DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCO DI GRUPPO B ISOLATO DA UNA COLTURA è stato confrontato con le metodiche tradizionali di coltura con identificazione biochimica. Questo studio è stato condotto su tre centri diversi testando 299 ceppi di streptococco del gruppo B e 419 ceppi batterici provenienti da 16 generi diversi. Le metodiche tradizionali di identificazione comprendevano la colorazione di Gram, la ricerca della catalasi, il test dell'idrolisi della PYR ed il CAMP-test. In base ai risultati, i ceppi sono stati classificati in due categorie: positivi ( $\geq 50.000$  RLU) o negativi ( $< 50.000$  RLU). Le colture negative hanno evidenziato risultati compresi fra 221 e 8.800 RLU mentre le colture positive hanno mostrato risultati compresi fra 56.300 e 1.360.000 RLU. Il raffronto di questi risultati con le metodiche tradizionali di identificazione è indicato di seguito:

#### **ACCUProbe / COLTURE**

ACCUProbe Coltura	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilità/ Specificità‡	Tasso di Concordanza
Centro 1	99	0	0	152	100%/100%	100%
Centro 2	100	0	0	100	100%/100%	100%
Centro 3	100	0	0	167	100%/100%	100%
<b>Totale</b>	<b>299</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>419</b>	<b>100%/100%</b>	<b>100%</b>

### **PERFORMANCE DEL TEST**

#### **A. PRECISIONE INTRA-TEST**

La precisione intra-test del TEST ACCUProbe DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCO DI GRUPPO B ISOLATO DA UNA COLTURA è stata calcolata analizzando 10 volte in una medesima serie 2 diverse concentrazioni di RNA ribosomiale di *S. agalactiae*.

Campione	A	B
Numero di test	10	10
Risposta media (RLU)	70.552	150.691
Deviazione standard	5.472	11.428
Coefficiente di variazione	7,8%	7,6%

#### **B. PRECISIONE INTER-TEST**

La precisione inter-test è stata calcolata analizzando con la modalità della determinazione unica le due stesse concentrazioni di RNA ribosomiale di *S. agalactiae*, in 12 serie diverse.

<b>Campione</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Numero di test	12	12
Risposta media (RLU)	74.825	147.682
Deviazione standard	5.125	8.248
Coefficiente di variazione	6,9%	5,6%

#### C. SENSIBILITA' ANALITICA

La sensibilità analitica (limite di rilevazione) del TEST AccuProbe DI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCO DI GRUPPO B ISOLATO DA UNA COLTURA è risultata pari a  $1.05 \times 10^5$  CFU di Streptococchi di Gruppo B per test partendo da colture solide o in brodo. I campioni prelevati con tamponi vaginali o rettali, testati con il Test di Identificazione dello Streptococco di Gruppo B isolato da una coltura, hanno mostrato di rilevare meno di 300 CFU di Streptococchi di Gruppo B quando vengono inoculati nel brodo di Lim ed incubati per 18-24 ore.

#### D. SPECIFICITA'

È stato studiato con il TEST ACCUPROBEDI IDENTIFICAZIONE DELLO STREPTOCOCCO DI GRUPPO B un totale di 93 ceppi ATCC. Questi ceppi comprendevano 93 specie di 47 generi diversi. È stato testato un pannello filogenetico di 25 colture di 14 specie di streptococchi di cui 9 sierotipi di gruppo B, 12 specie di enterococchi e altre 54 specie di ulteriori 45 generi.

I 9 sierotipi di gruppo B hanno mostrato un risultato positivo come d'altronde lo *Streptococcus equi*. Gli altri microrganismi hanno fornito un risultato negativo.

#### E. TEST DI SOVRACCARICO

Diluizioni di *S. agalactiae* che comprendevano da 2.000 a 21 milioni di batteri per diluizione sono state analizzate in presenza di *Streptococcus bovis* con concentrazioni di 21 milioni di microrganismi per test. Non è stata rilevata alcuna interferenza o reazione crociata.



**ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B**  
**TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA**  
(bioMérieux ref. 39206 / Gen-Probe Cat. No. 102820/2820)

**UTILIZAÇÃO**

O ACCUPROBE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA é um teste de identificação rápida por sonda ADN dos Estreptococos do grupo B isolados de uma cultura. Este teste utiliza a técnica de hibridização dos ácidos nucleicos.

**INTRODUÇÃO**

Os Estreptococos do grupo B (*Streptococcus agalactiae*) são uns dos principais responsáveis pela septicémia e meningite no recém-nascido. A incidência das patologias relacionadas com os Estreptococos do grupo B é estimada em 2 a 5 recém-nascidos por 1000 nascimentos (5). A contaminação precoce, durante a primeira semana de vida, tem uma taxa de mortalidade superior a 50%. Quando a contaminação se realiza após a primeira semana de vida, a taxa de mortalidade desce para 14% a 23% (1, 7). Os Estreptococos do grupo B podem também, mas mais raramente, ser responsáveis por afecções graves no adulto (2).

Os métodos fisiológicos e bioquímicos tradicionais permitem fazer uma identificação presuntiva. Estes métodos compreendem o exame após coloração de Gram, a pesquisa da catalase, o estudo da actividade hemolítica em gelose de sangue de carneiro e a hidrólise do hipurato ou da PYR (L-pirrolidoniol- $\beta$ -naftilamida), o CAMP-teste e o teste com bilis esculina (4). Com alguns Estreptococos do grupo A obtém-se uma resposta positiva, com o CAMP-teste, semelhante à dos Estreptococos do grupo B. Em consequência, a confirmação da identificação dos Estreptococos do grupo B necessita da combinação de vários testes bioquímicos e/ou serológicos. O ACCUPROBE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA é um método rápido e objectivo permitindo a identificação definitiva de Estreptococos do grupo B, pela detecção de sequências de ARN ribossómico específicas de *Streptococcus agalactiae*.

**PRINCÍPIO**

Os testes por hibridização de ácidos nucleicos baseiam-se na capacidade de cadeias complementares de ácidos nucleicos emparelharem de forma específica para formar complexos bicatenários estáveis (6). O método ACCUPROBE utiliza uma sonda ADN monocatenária conjugada com um marcador quimioluminescente complementar de ARN ribossómico (ARNr) do organismo alvo. Quando o ARNr do organismo alvo é libertado, a sonda hibridiza com este para formar um complexo ADN-ARN estável. O Reagente de Selecção permite diferenciar as sondas hibridizadas das não hibridizadas. O luminómetro GEN-PROBE mede o sinal luminoso emitido pelos híbridos ADN-ARN. O resultado é positivo se o luminómetro indicar um valor superior ou igual ao valor limiar; é negativo se indicar um valor inferior.

**REAGENTES**

Os reagentes utilizados para o ACCUPROBE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE

CULTURA são fornecidos em três embalagens distintas:

**AccuPROBE SONDA PARA ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B**

Reagente Sonda (P) (2 x 10 tubos)  
Estreptococos do Grupo B

**AccuPROBE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA**

Reagente 1 (Reagente de Lise) (1) 1 x 10 ml  
Solução tampão contendo 0.04% de azida sódica

Reagente 2 (Tampão de Hibridização) (2) 1 x 10 ml  
Solução tampão

Reagente 3 (Reagente de Seleção) (3) 1 x 60 ml  
Solução tampão

**REAGENTES DE DETECÇÃO GEN-PROBE**

Reagente de Detecção I (RI) 1 x 240 ml  
0.1% peróxido de hidrogéneo em 0.001 N ácido nítrico

Reagente de Detecção II (RII) 1 x 240 ml  
1 N hidróxido de sódio

**PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO**

- A. Unicamente para diagnóstico *in vitro*.
- B. Usar as precauções habituais quando efectuar este teste (3).
- C. Utilizar unicamente para a identificação das micobactérias do complexo *S. agalactiae* isoladas de uma cultura.
- D. Utilizar unicamente o material fornecido ou material de utilização única.
- E. Os reagentes desta embalagem contêm azida sódica susceptível de reagir com as canalizações de chumbo ou de cobre formando azidas metálicas explosivas. Quando eliminar estes reagentes, é aconselhável diluir com bastante água para prevenir a formação de azidas na canalização.
- F. Evitar o contacto dos Reagentes de Detecção I e II com a pele, os olhos e com as mucosas. No caso de contacto, lavar com água. Se estes reagentes forem derramados, diluí-los com água antes de limpar.
- G. Para obter um melhor comportamento funcional, é recomendado assegurar-se de que o produto está depositado no fundo do tubo. Se não estiver, agitar o tubo para juntar o produto no fundo.

**CONSERVAÇÃO**

Os tubos de Reagente Sonda devem ser conservados nas saquetas/sachet de alumínio a 2° - 8°C. Antes da abertura, permanecem estáveis até à data de validade indicada. Depois da abertura, a saqueta/sachet deve ser bem fechada e os tubos devem ser utilizados num prazo de dois meses, dentro do prazo de validade.

Os outros reagentes do AccuPROBE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA podem ser conservados entre 2° e 25°C e permanecem estáveis até à data de validade.

**NÃO CONGELAR OS REAGENTES.**

## **COLHEITA/COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA**

O ACCU<sup>PROBE</sup> ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi concebido para identificar Estreptococos do Grupo B isolados de uma cultura.

- A. Identificação a partir de cultura em meio sólido.** O teste pode ser efectuado com culturas realizadas num meio sólido apropriado, quando se observar uma morfologia que sugere os Estreptococos do grupo B. A amostra pode ser analisada logo que a proliferação seja visível e durante 72 horas.
1. A amostra de cultura pode ser colhida/coletada com uma ansa de plástico descartável de 1 µl, com uma ansa metálica ou com uma agulha de plástico descartável. Não utilizar zaragatoa/swab uma vez que as bactérias vão ser colocadas em suspensão numa quantidade mínima de líquido.
  2. É possível testar várias colónias (3 ou 4) ou uma única colónia com um diâmetro de pelo menos 1 mm.
  3. Evitar colher/coletar parte do meio sólido de cultura.
  4. O bacteriologista pode, nesta etapa, decidir semear outro meio de cultura para confirmar a pureza da amostra isolada.
- B. Identificação a partir de caldo de cultura.** O teste pode ser efectuado a partir de caldos de cultura apropriados, como Todd Hewitt, Lim Broth, Tioglicolato ou o caldo Trypcase Soja, cuja turbidez deve ser superior ou igual a 1 McFarland. Pipetar 50 µl da suspensão do caldo correctamente homogeneizado, para o tubo de Reagente Sonda seguindo as instruções do parágrafo PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.
- C. Método para colher com zaragatoa amostras vaginais e/ou anorrectais.**

Transportar amostras vaginais e/ou anorrectais numa zaragatoa/swab para o laboratório à temperatura ambiente, dentro de, no máximo, 48 horas. As amostras podem ser conservadas no laboratório durante mais 24 horas a 2° - 8°C antes de as analisar. Mergulhar a zaragatoa/swab num tubo de caldo Lim (caldo Todd Hewitt com ácido nalidíxico e colistina) durante, pelo menos, 1 minuto e em seguida premi-la contra a parede do tubo. Homogeneizar o tubo em vortex e incubar a 36° ± 1°C durante 18 a 24 horas antes de efectuar o procedimento do teste. Após incubação, homogeneizar em vortex o caldo e pipetar 50 µl da amostra do caldo bem homogeneizado para os Tubos de Reagente Sonda como descrito no item Procedimento do Teste.

## **MATERIAL FORNECIDO**

O ACCU<sup>PROBE</sup> ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA (bioMérieux ref. 39206 / Gen-Probe Cat. No. 102820/2820)

### **20 Testes**

Reagente Sonda (P) 2 x 10 tubos

## **MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO**

Ansas de 1 µl de plástico estéril, ansas metálicas ou agulhas de plástico para colheita/coleta das colónias  
Estirpes/Cepas de controlo das culturas

Banho-maria ou bloco de aquecimento\* (35° a 37°C)

Banho-maria ou bloco de aquecimento\* (60° ± 1°C)

Micropipetas (50 µl, 300 µl)

Pipetas de repetição (50 µl, 300 µl)

Vortex

Zaragatoas/Swabs com ou sem meio de transporte (Meios de Stuart, Stuart modificado ou Amies)

Caldos de cultura (Todd-Hewitt, Lim, Tioglicolato ou Tripcase Soja)

\*Os orifícios do bloco de aquecimento devem estar adaptados a tubos de 12 x 75 mm. Aconselha-se a utilização dos blocos de aquecimento GEN-PROBE.

#### MATERIAL SUPLEMENTAR DISPONÍVEL NO SEU DISTRIBUIDOR GEN-PROBE:

Luminómetro GEN-PROBE LEADER 50i

(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)

AccuPROBE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA

(bioMérieux ref. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 102800/2800)

REAGENTES DE DETECÇÃO GEN-PROBE

(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791/1791)

Bloco de aquecimento (60° ± 1°C)

(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)

#### **PROCEDIMENTO**

##### A. PREPARAÇÃO DO MATERIAL

1. Regular um bloco de aquecimento ou um banho-maria a 35° - 37°C.
2. Regular um banho-maria ou um bloco de aquecimento a 60° ± 1°C.
3. Preparar o luminómetro GEN-PROBE. Assegurar-se de que a quantidade de Reagentes de Detecção I e II é suficiente para efectuar todos os testes.

##### B. CONTROLOS

As estirpes/cepas de controlo positivo e negativo devem ser testadas por rotina em cada laboratório, em conformidade com a regulamentação em vigor. Pode utilizar-se uma cultura de *Estreptococos* do grupo B (por exemplo, American Type Culture Collection, ATCC #13813) como controlo positivo, e uma cultura de *Streptococcus bovis* (por exemplo, ATCC #33317) como controlo negativo.

Se as amostras a analisar forem provenientes de meios sólidos, colher/coletar uma colónia de 1 mm de cada estirpe/cepa de controlo a partir da cultura em meio sólido. Se as amostras a analisar forem provenientes de caldos de cultura, semear uma colónia de cada estirpe/cepa de controlo no caldo e incubar segundo o método preconizado no parágrafo COLHEITA/COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.

##### C. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

1. Cortar horizontalmente a parte superior das saquetas/sachets de alumínio. Retirar o número necessário de tubos de Reagente Sonda para analisar as amostras e/ou as estirpes/cepas de controlo. Fechar bem a saqueta/sachet dobrando várias vezes a sua extremidade e fixando-a com fita-cola ou com um clip. **Não retirar a saqueta/sachet que contém o dissecante.**
2. Identificar um número suficiente de tubos de Reagente Sonda para testar as amostras e/ou as estirpes/cepas de controlo. Tirar e conservar as tampas.
3. Pipetar 50 µl de Reagente 1 (Reagente de Lise) para os tubos de Reagente Sonda. Se o teste for efectuado com estirpes/cepas isoladas a partir do caldo de cultura, não adicionar Reagente 1 aos Tubos de Lise.
4. Transferir a amostra proveniente do meio sólido ou 50 µl do caldo de cultura correctamente homogeneizado para os tubos de Reagente Sonda, seguindo as instruções descritas no parágrafo COLHEITA/COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. Se o teste for efectuado com uma cultura em meio sólido, agitar a ansa ou a agulha no Reagente 1 (Reagente de Lise) para colocar as células em suspensão.
5. Fechar os tubos de Reagente Sonda e incubá-los a 35° - 37°C durante 5 minutos em banho-maria ou

durante 10 minutos a 35° - 37°C no bloco de aquecimento.

**D. HIBRIDIZAÇÃO**

1. Retirar os tubos do Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento. Tirar e conservar as tampas. Pipetar 50 µl de Reagente 2 (Tampão de Hibridização) para cada tubo de Reagente Sonda.
2. Fechar os tubos de Reagente Sonda e colocá-los em incubação durante 15 minutos a 60° ± 1°C em banho-maria ou bloco de aquecimento.

**E. SELECÇÃO**

1. Retirar os tubos de Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento. Tirar e conservar as tampas. Distribuir 300 µl de Reagente 3 (Reagente de Selecção) em cada tubo. Voltar a tapar os tubos e agitá-los num VORTEX para obter uma mistura homogénea.
2. Incubar os tubos de Reagente Sonda durante 5 minutos a 60° ± 1°C em banho-maria ou num bloco de aquecimento.
3. Retirar os tubos de Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento e deixá-los à temperatura ambiente durante, pelo menos, 5 minutos. Retirar e eliminar as tampas. Ler os resultados no luminómetro durante a hora seguinte.

**F. DETECÇÃO**

1. Seleccionar o protocolo apropriado no luminómetro.
2. Para retirar resíduos da superfície dos tubos, limpá-los com papel absorvente húmido. Em seguida, colocá-los no luminómetro e seguir as instruções.
3. Quando a análise tiver terminado, retirar os tubos do luminómetro.

**NOTAS**

- A. REAGENTE: O Reagente 2 (Tampão de Hibridização) pode precipitar. Aquecê-lo a 35° - 60°C e agitá-lo para dissolver o precipitado.
- B. TEMPERATURA: A preparação da amostra, a hibridização e a selecção são reacções termodependentes. Consequentemente, é imperativo manter o banho-maria ou o bloco de aquecimento à temperatura preconizada.
- C. DURAÇÃO DAS OPERAÇÕES:
  1. A reacção de hibridização deve ser iniciada na hora a seguir à introdução da amostra e do Reagente 1 nos tubos de Reagente Sonda.
  2. As reacções de Hibridização e de Selecção dependem do tempo. A hibridização deve durar, pelo menos, 15 minutos, mas não mais de 20 minutos. Durante a etapa de SELECÇÃO, incubar os tubos de Reagente Sonda durante, pelo menos, 5 minutos, mas não mais de 6 minutos.
- D. BANHO-MARIA: a água deve estar ao nível do anel de fecho dos tubos de Lise, não acima. Certificar-se de que a totalidade do líquido reaccional dos tubos de Reagente Sonda está bem imersa.
- E. UTILIZAÇÃO DO VORTEX: é essencial dispor de uma mistura homogénea durante a etapa de SELECÇÃO, especialmente após a adição do Reagente 3.

## F. RESOLUÇÃO DE INCIDENTES:

1. Podem observar-se valores de controlo negativo elevados (*Streptococcus bovis*, ATCC #33317) superiores a 20,000 RLU (Relative Light Units) no LEADER ou 600 PLU (Photometric Light Units) no AccuLDR (anteriormente PAL) se a homogeneização tiver sido insuficiente depois da adição do Reagente 3 (Reagente de Selecção), ou se estiverem presentes varios tipos de colónias. Para verificar se se trata de uma cultura mista, repicar uma parte num meio gelosado apropriado e incubar.
2. Podem observar-se valores fracos de controlo positivo (*Streptococcus agalactiae*, ATCC #13813) inferiores a 50.000 RLU no LEADER ou 1.500 PLU no AccuLDR (anteriormente PAL) se o número de microrganismos for insuficiente ou se o teste tiver sido efectuado com culturas mistas ou antigas. Para verificar se se trata de uma cultura mista, repicar uma parte num meio gelosado apropriado e incubar.

## RESULTADOS

### A. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados do ACCUPROBE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA são interpretados em função de um valor limiar. As amostras que emitam um sinal luminoso de valor superior ou igual a este limiar são consideradas positivas. Os sinais luminosos inferiores a este limiar são considerados negativos. Quando o resultado se situar na zona duvidosa, o teste deve ser repetido. Se a segunda análise der também um resultado equívoco, é necessário repicar a estirpe/cepa para verificar a sua pureza.

	<b>AccuLDR</b> (anteriormente PAL)	<b>LEADER</b>
Valor limiar	1.500 PLU	50.000 RLU
Zona duvidosa	1.200 - 1.499 PLU	40.000 - 49.999 RLU

### B. CONTROLO DE QUALIDADE E VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

O controlo negativo (por exemplo, *S. bovis*, ATCC #33317) e positivo (por exemplo, *S. agalactiae*, ATCC #13813) devem estar dentro dos seguintes valores:

	<b>AccuLDR</b> (anteriormente PAL)	<b>LEADER</b>
Controlo negativo	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Controlo positivo	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

### LIMITES DO TESTE

Este método foi testado com culturas frescas efectuadas em meios sólidos e com os caldos de cultura citados no parágrafo COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. A eficácia deste teste, a partir da amostra clínica não foi avaliada.

As culturas provenientes de amostras de despiste pré-natal foram validadas unicamente com o TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DO ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B a partir do caldo de Lim (caldo Todd-Hewitt com ácido nalídixico e colistina). Os outros caldos selectivos líquidos não foram testados.

O ACCUPROBE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA leva a resultados positivos com *Streptococcus equi*.

Os resultados do AccuPROBE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA devem ser interpretados conjuntamente com outros dados do laboratório e correlacionados com os dados clínicos.

### **VALORES ESPERADOS**

O AccuPROBE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi comparado com métodos bioquímicos clássicos de identificação de cultura em três locais, utilizando 299 estirpes/cepas de Estreptococos do grupo B e 419 estirpes/cepas bacterianas provenientes de 16 géneros diferentes. Foi efectuada uma identificação pelos métodos tradicionais, incluindo a coloração de Gram, o teste de catalase, teste de hidrólise de PYR e CAMP. As estirpes/cepas foram consideradas como positivas ( $\geq 50.000$  RLU) ou negativas ( $< 50.000$  RLU). As culturas negativas deram resultados compreendidos entre 221 e 8.800 RLU e as culturas positivas deram resultados entre 56.300 e 1.360.000 RLU. A comparação destes resultados com os métodos clássicos de identificação figura de seguida.

#### **AccuPROBE/ IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA**

<b>AccuPROBE Cultura</b>	<b>Pos Pos</b>	<b>Pos Neg</b>	<b>Neg Pos</b>	<b>Neg Neg</b>	<b>Sensibilidade/ Especificidade</b>	<b>Taxa de Concordância</b>
Local 1	99	0	0	152	100%/100%	100%
Local 2	100	0	0	100	100%/100%	100%
Local 3	100	0	0	167	100%/100%	100%
<b>Total</b>	<b>299</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>419</b>	<b>100%/100%</b>	<b>100%</b>

### **COMPORTEAMENTO FUNCIONAL DO TESTE**

#### **A. PRECISÃO INTRA-ENSAIO**

A precisão intra-ensaio do AccuPROBE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi calculada analisando duas concentrações diferentes de ARN ribossómico de *Streptococcus agalactiae* 10 vezes numa mesma série.

<b>Amostra</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Número de ensaios	10	10
Resposta média	70.552	150.691
Desvio-padrão	5.472	11.428
Coefficiente de Variação	7,8%	7,6%

#### **B. PRECISÃO INTER-ENSAIO**

A precisão inter-ensaio foi calculada analisando duas concentrações diferentes de ARN ribossómico de *Streptococcus agalactiae*, ao longo de 12 séries distintas.

<b>Amostra</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Número de ensaios	12	12
Resposta média	74.825	147.682
Desvio-padrão	5.125	8.248
Coefficiente de Variação	6,9%	5,6%

### C. SENSIBILIDADE ANALÍTICA

A sensibilidade analítica (limites de detecção) do AccuPROBE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi determinada em  $1.05 \times 10^5$  CFU do Estreptococos do Grupo B por ensaio com culturas em meio sólido ou em caldo. As amostras vaginais e anorrectais analisadas com o ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA demonstraram detectar até 300 CFU do Estreptococos do Grupo B quando inoculadas no caldo Lim e incubadas durante 18 a 24 horas.

### D. ESPECIFICIDADE


Foram testadas 93 estirpes/cepas de cultura ATCC com o AccuPROBE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA. Estas estirpes/cepas compreendiam 93 espécies provenientes de 47 géneros diferentes. Foi testado um painel filogenético de 25 estirpes/cepas de 14 outras espécies de *Streptococcus* incluindo 9 serotipos do Grupo B, 12 espécies de *Enterococcus* e 54 outras espécies de 45 géneros. Tanto os 9 serotipos Estreptococos do Grupo B como os *Streptococcus equi* deram resultados positivos. Todas as outras espécies testadas foram negativas.

### E. TESTE DE SOBRECARGA

Foram testadas diluições de *S. agalactiae* tendo 2.000 a 21 milhões de bactérias por diluição, na presença de *Streptococcus bovis* com uma concentração de 21 milhões de microrganismos por teste. Não foi detectada nenhuma interferência nem reacção cruzada, com AccuPROBE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA.

#### BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA

1. **Anthony, B. F., and D. M. Okada.** 1977. The emergence of Group B streptococci infections of the newborn infant. *Ann. Rev. Med.* **28**: 355-369.
2. **Bayer, A. S., A. W. Chow, B. F. Anthony, and L. B. Gauze.** 1976. Serious infections in adults due to Group B streptococci; clinical and serological characterization. *Am. J. Med.* **61**: 498-503.
3. **Centers for Disease Control.** 1988. United States Morbid. and Mortal. *Weekly Rep.* **37**: 377-382, 387-388.
4. **Facklam, R. R., and R. B. Carey.** 1985. Streptococci and aerococci. p. 154-175. In E. H. Linnette, A. Ballows, W. J. Hausler, Jr., and H. J. Shadomy (eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, 4th ed., American Society for Microbiology. Washington, D.C.
5. **Fisher, G., R. E. Horton and R. Edelman.** 1973. Summary of the national institutes of health workshop on group B streptococcal infections. *J. Infec. Dis.* **14**: 163-166.
6. **Kohne, D. E., A. G. Steigerwalt, and D. J. Brenner.** 1984. Nucleic acid probe specific for members of the genus *Legionella*. p. 107-108. In C. Thornsberry, et al. (ed.), *Legionella: proceedings of the 2nd international symposium*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. **Patterson, M. J., and A.E. B. Hafez.** 1976. Group B streptococci in human disease. *Bacteriol. Rev.* **40**: 774-792.



**Gen-Probe Incorporated**  
**San Diego, CA 92121 (USA)**



<b>EC</b>	<b>REP</b>
-----------	------------

Authorized Representative  
EMERGO EUROPE  
Molenstraat 15  
2513 BH The Hague  
The Netherlands