



Dryspot Pneumo Latex Test Symbol: DR 0420M

Test lateksowy do wykrywania antygenu otoczkowego *Streptococcus pneumoniae*, pozwalający na szybką identyfikację *Streptococcus pneumoniae* z wyhodowanych kolonii lub z posiewów krwi.

Zalety testu:

- Łatwy odczyt: cząstki lateksu zabarwione są na kolor niebieski
- Szybkie oznaczenie: z podłoża stałych 1 minuta, z posiewów krwi 2 minuty
- Wiarygodność: do testu załączono kontrole dodatnie i ujemne
- Warunki przechowywania: zestaw można przechowywać w temperaturze pokojowej przez dwa lata od daty produkcji.

ZASADA OZNACZENIA:

Streptococcus pneumoniae to drobnoustrój powodujący m.in. zapalenie płuc, zapalenie opon mózgowych czy zapalenie ucha. Otoczka polisacharydowa skutecznie uniemożliwia działalność fagocytów wpływając na wysoką wirulencję tego mikroorganizmu.

Test firmy OXOID wykrywa antygeny klinicznie istotnych serotypów *Streptococcus pneumoniae*.

ZAWARTOŚĆ ZESTAWU DR 0420M:

- **Dryspot Pneumo Test Kartoniki Reakcyjne**
Niebieskie cząstki lateksu opłaszczone przeciwciałami króliczymi specyficznymi dla ważnych klinicznie serotypów *Streptococcus pneumoniae*, które umieszczono w postaci liofilizatu na kartoniku reakcyjnym (pole testowe).
Niebieskie cząstki lateksu opłaszczone obojętnymi przeciwciałami (pole kontrolne)
Dwie saszetki, każda zawiera po 10 kartoników oraz wkład absorbujący wilgoć. Na każdym kartoniku znajdują się 3 pola testowe i 3 pola kontrolne: w sumie 60 testów.
- **Paski kontroli dodatniej (10 pasków-różowe „kropelki”)**
Pasek zawierający zabarwiony na różowo inaktywowany ekstrakt antygenowy *Streptococcus pneumoniae*.
- **Paski kontroli ujemnej (10 pasków- zielone „kropelki”)**
Pasek zawierający zabarwiony na zielono inaktywowany ekstrakt *Aerococcus viridans*.
- **PBS** – roztwór buforu pH 7,3 ± 0,1. Zawiera 0.095% azydku sodu jako konserwant.
- **Bagietki** do mieszania zawiesin.
- 2 zaciski do zamykania saszetek.
- Instrukcja użycia

MATERIAŁY WYMAGANE NIE ZAWARTE W ZESTAWIE:

- Sterylne ezy
- Środek dezynfekujący np. podchloryn sodu >1,3% w/v
- Wirówka laboratoryjna (w przypadku badania posiewów krwi)

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Produkt tylko do diagnostyki *in vitro*.

Próbka badana może zawierać organizmy patogenne. Próbką operować z odpowiednią ostrożnością. Azydek sodu może reagować z ołowiem lub miedzią z rur kanalizacyjnych, wytwarzając azydki metali, które są wybuchowe. Dlatego, aby zapobiec gromadzeniu się azydków w rurach kanalizacyjnych, natychmiast po usunięciu odpadów spłukać je dużą ilością wody

PRZECHOWYWANIE I OTWIERANIE

Zestaw musi być przechowywany w temperaturze od 2 do 25°C. Jeżeli jest przechowywany w niskiej temperaturze, przed użyciem pozostawić koperty do osiągnięcia temperatury pokojowej, co zapobiega kondensacji wody na kartoniku. Odczynniki ulegają zniszczeniu i dają fałszywe wyniki gdy zaabsorbują wilgoć. Kopertę rozciąć nożyczkami tuż poniżej zgrzewu.

Otworzyć kopertę i wyjąć potrzebną do natychmiastowego wykonania ilość testów (test należy wykonać w ciągu 10 minut), a następnie zamknąć kopertę dołączonym do zestawu klipssem. Gdy potrzebna jest mniejsza ilość

testów, odciąć potrzebną ilość wzdłuż wskazanej na kartoniku linii, a pozostałą część kartonika umieścić w kopercie. Nie umieszczać użytych kartoników ponownie w kopertach.

Paski kontrolne opakowane są również w saszetki zabezpieczające przed wilgocią. Upewnić się, że stosowana jest ta sama technika unikania zawilgocenia.

W takich warunkach, test zachowa aktywność do daty ważności umieszczonej na pudełku.

PROCEDURA KONTROLNA

Dodać 50µl kroplę roztworu soli fizjologicznej na małe kółko w obrębie owalnego pola testowego (Test Reaction Area). Wyjąć kartonik z paskami kontroli dodatkowo z saszetki i oderwać jeden pasek, zwracając uwagę, aby nie dotykać końca paska z naniesionymi różowymi „kropelkami”. Zamknąć saszetkę. Trzymać pasek tak, aby kolorowe kropelki były na dole i dotknąć nimi naniesionego płynu. Docisnąć pasek tak, aby zgiął się w zawiasie i mieszać ruchem okrężnym przez 10 sekund do uwodnienia liofilizowanego odczynnika. Kontynuować tym samym paskiem mieszanie uzyskanej zawiesiny z liofilizowanym niebieskim odczynnikiem w owalnym polu testowym, aż do jego uwodnienia i całkowitej homogenności. Kartonik obracać ruchem rotacyjnym obserwując aglutynację. Procedura powinna być powtórzona z użyciem paska kontroli ujemnej.

Kontrola dodatnia musi wykazywać aglutynację w ciągu 60 sekund.

Kontrola ujemna musi wykazywać brak aglutynacji w ciągu 60 sekund.

Nie używać testu jeżeli wyniki kontroli są nieprawidłowe.

Ważne uwagi do procedury

Nie dotykać pól reakcyjnych na kartonikach, co może powodować zanieczyszczenie odczynnika i błędne reakcje.

W bardzo wilgotnej atmosferze, nie pozostawiać otwartych kopert na dłużej niż 2 minuty. Nie używać kartoników na których widoczne jest zawilgocenie kropelki lateksu.

Nie nakładać kropli soli fizjologicznej bezpośrednio na suche kropelki lateksu.

Klips zamykający może być użyty wielokrotnie.

Test przechowywać z dala od światła słonecznego i bezpośredniego źródła ciepła.

POBIERANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

A. Hodowla

Pobieranie, przechowywanie i transport próbek powinien odbywać się zgodnie ze standardowymi procedurami. α-hemolityczne, Gram-dodatnie, katalazo-ujemne kolonie mogą być pobierane do badania z następujących pożywek:

Agar krwawy, Trypton Soya Agar z 5% krwią, Columbia Blood Agar, Columbia CNA Agar, Chocolate Blood Agar.

Stosować świeżą całonocną hodowlę (18-36 godziną). Tendencja do autoaglutynacji kolonii wzrasta po 36 godzinach inkubacji.

B. Hodowla krwi

Próbkę pobrać i zbadać po 18-24 godzinnej inkubacji w 37°C i/lub tak szybko jak tylko zaobserwowano wzrost bakterii. Obecność *Strep. pneumoniae* powinna być potwierdzona wykonaniem barwienia Grama.

PROCEDURA OZNACZENIA:

Hodowla na podłożach stałych:

1. Nanieść po 1 kropli (50µl) PBS na małe kółko (wewnątrz owalnego) w Polu Testowym i Polu Kontrolnym tak, aby płyn nie zmieszał się z suchymi kropelkami lateksu.
2. Za pomocą sterylnej ezy (lub dołączonej bagietki) pobrać kilka kolonii z podłoża stałego i nanieść na Pole Kontrolne mieszając z kroplą uprzednio naniesionego PBS. Mieszać do uzyskania gładkiej, opalizującej emulsji.
3. Stosując ezę lub bagietkę, wymieszać uzyskaną emulsję z kropelkami lateksu kontrolnego, aż do ich kompletnego rozpuszczenia i pokryć nią całe Pole Kontrolne. Usunąć w odpowiedni sposób użytą ezę/bagietkę.
4. Używając nowej ezy/bagietki postąpić w ten sam sposób na Polu Testowym.
5. Kartonik obracać ruchem rotacyjnym przez 60 sekund. Zwrócić uwagę na występowanie aglutynacji w normalnym oświetleniu. Nie używać szkła powiększającego.
6. Po zakończonym oznaczeniu kartonik umieścić w płynie dezynfekującym.

Hodowla krwi

1. Odwirować 1-2 ml bulionu z dodatnim wynikiem na posiew krwi tak, aby utworzył się osad krwinek np. przy 1000 g przez 5-10 minut. Wykonać badanie z supernatantu.
2. Przenieść po 1 kropli supernatantu na małe kółko w Polu Testowym i w Polu Kontrolnym kartonika tak, aby płyn nie zmieszał się z suchymi kropelkami lateksu.
3. Stosując ezę lub bagietkę, wymieszać supernatant z kropelkami lateksu kontrolnego, aż do ich kompletnego rozpuszczenia i pokryć nią całe Pole Kontrolne. Usunąć w odpowiedni sposób użytą ezę/bagietkę.
4. Używając nowej ezy/bagietki postąpić w ten sam sposób na Polu Testowym.

5. Kartonik obracać ruchem rotacyjnym przez 2 minuty. Zwrócić uwagę na występowanie aglutynacji w normalnym oświetleniu. Nie używać szkła powiększającego.
6. Po zakończonym oznaczeniu kartonik umieścić w płynie dezynfekującym.
7. Obecność *Strep. pneumoniae* w próbce hodowli krwi, dająca dodatni wynik testu lateksowego, powinna być potwierdzona wykonaniem barwienia Grama.

ODCZYT I INTERPRETACJA WYNIKÓW

Wynik Dodatni

Wynik jest dodatni, jeżeli aglutynacja niebieskich cząsteczek lateksu w Polu Testowym pojawi się w ciągu 60 sekund dla potwierdzeń hodowli na podłożach i w ciągu 2 minut dla hodowli krwi. Taki wynik wskazuje na obecność *Strep. pneumoniae*.

Wynik Ujemny

Wynik jest ujemny, jeżeli nie pojawi się aglutynacja w Polu Testowym i niebieska zawiesina pozostaje gładka w ciągu 60 sekund dla potwierdzeń hodowli na podłożach i w ciągu 2 minut dla hodowli krwi. Reakcje zachodzące po tym czasie nie powinny być brane pod uwagę.

Wynik nie do interpretacji

Wynik testu nie nadaje się do interpretacji jeżeli odczynnik kontrolny wykazał aglutynację. Wskazuje to na zdolność do autoaglutynacji badanej hodowli.

Ziarniste lub Włókniste Reakcje

Czasami pojawiają się reakcje ziarniste lub włókniste, spowodowane cechami właściwymi dla badanych materiałów. W przypadku zaobserwowania takiej reakcji, przy odczycie należy kierować się następującymi kryteriami:

Wynik jest dodatni w przypadku gdy tło w teście z odczynnikiem w Polu Testowym, jest bardziej przejaśnione niż w reakcji z odczynnikiem w Polu Kontrolnym.

Wynik jest **ujemny** kiedy nie ma różnicy między przejaśnieniem tła w reakcji z odczynnikiem lateksowym w Polu Testowym, a tłem w reakcji z odczynnikiem w Polu Kontrolnym.

OGRANICZENIA

Bagietki do mieszania dołączone do opakowania nie są sterylne. Jeżeli jest to wymagane, mogą być sterylizowane w autoklawie.

Test Dryspot Pneumo daje wstępne wyniki. Wynik dodatni potwierdzić z zastosowaniem testów biochemicznych.

Reakcja dodatnia z próbki z hodowli krwi zależy od tego, czy antygen występujący w pożywce w której przeprowadzono hodowlę krwi występuje na wykrywalnym poziomie. Badania przeprowadzone bezpośrednio z próbek klinicznych mogą służyć do skriningu i nie powinny zastępować procedur hodowlanych.

Fałszywie ujemne reakcje mogą również występować, jeżeli do badania wzięta jest nieodpowiednia liczba kolonii. W tym przypadku, izolat powinien być przesiany i zbadany ponownie po uzyskaniu odpowiedniego wzrostu.

Jeżeli szczep pneumokokowy nie posiada antygeny otoczkowego nie może być identyfikowany za pomocą techniki immunologicznej.

Fałszywie dodatnie reakcje mogą występować z większością szczepów *Streptococcus* z grupy C i z *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mitori*, *Streptococcus sanguis* i *Streptococcus oralis*⁶. Ponadto, obserwowano kilka przykładów serologicznych reakcji krzyżowych między pneumokokami i Gram-ujemnymi bakteriami np. *E coli*, *Klebsiella* spp. i *H influenzae*^{7,8}.

CHARAKTERYSTYKA PRACY TESTU

Próbki z hodowli

Zestaw Dryspot Pneumo sprawdzany był przez National Reference Centre for Streptococcus i Diphteria w Wielkiej Brytanii⁹. Pożywkę Columbia Agar z 5% krwią końską zaszczepiono 216 szczepami (144 *Strep. pneumoniae* i 72 nie-*Strep. pneumoniae*). Po inkubacji czyste kultury sprawdzane były testem Dryspot Pneumo i innym komercyjnym testem aglutynacyjnym.

Czułość Dryspot Pneumo wynosiła 97.9% i specyficzność 93.2%. Trzydzieści szczepów nie-*Strep.pneumoniae* dawało wyniki nie do interpretacji (aglutynacja lateksu kontrolnego) w teście Dryspot Pneumo, a 16 dawało takie wyniki z zestawem konkurencyjnym. 4 szczepy nie- *Strep. pneumoniae*, które dały fałszywie dodatnie wyniki z Dryspot Pneumo, znane są jako organizmy dające serologiczne reakcje krzyżowe ze *Streptococcus pneumoniae*⁶. Działanie testu Dryspot Pneumo było takie samo lub lepsze od działania innego sprawdzanego testu.

Próbki z hodowli krwi

Test Dryspot Pneumo był również sprawdzany w Oxoid Ltd pod kątem działania z próbkami z hodowli krwi.⁹ Sprawdzanie polegało na zaszczerpieniu pożywki do hodowli krwi Oxoid Signal i dwóch innych komercyjnie dostępnych pożywek do hodowli krwi, 37 szczepami *Strep. pneumoniae* i 35 nie- *Strep. pneumoniae*. Po inkubacji hodowle były sprawdzane za pomocą testu Dryspot Pneumo i dwoma innymi komercyjnie dostępnymi testami aglutynacyjnymi.

Z systemem do posiewu krwi Signal, czułość Dryspot Pneumo wynosiła 98.8%. Wyniki z innymi pożywkami do hodowli krwi były porównywalne. Cztery szczepy nie-*Strep. pneumoniae* dały wyniki nie do interpretacji ze wszystkimi trzema testami ze wszystkich badanych pożywek.

Działanie testu Dryspot Pneumo było takie samo lub lepsze od innych sprawdzanych testów.

Literatura

1. Kalin, M. (1998). *Thorax* **53**: 159–162.
2. Feldman, C. and Klugman, K. (1997). *Current opinions in Infectious Diseases* **10**: 109–115.
3. Henrichsen, J. (1995). *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2759–2762.
4. Lee, P. and Wetherall, B. L. (1987). *J. Clin. Microbiol.* **25**: 152–153.
5. Miller, M. M. and Holmes, H. T. (1999). In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. and Tenover, R. H. (ed) Seventh Edition. p. 33–63. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Cowan, S. T. and Steel, K. J. (1965). Characters of Gram-positive bacteria. In *Manual for the identification of Medical Bacteria*. Barrow, G. I. and Feltham, R. K. A. (ed) Third Edition. p. 50–90. Cambridge University Press. Cambridge, U.K.
7. Kilpper-Bälz, R., Wenzig, P. and Schleifer, K. H. (1985). *Int. J. System. Bacterial.* **35**: 482–488.
8. Lund, E. and Henrichsen, J. (1978). Chapter XI: 241–262. *Methods in Microbiology* XII, ed. Bergan and Norris, Academic Press, Orlando.
9. Data on file, Oxoid.



Oxoid Limited, Wade Road, Basingstoke,
Hampshire, RG24 8PW, UK