



S. PneumoStrip

Test para la identificación de 76 serotipos de Streptococcus pneumoniae

Test for the identification of 76 serotypes of Streptococcus pneumoniae

Test per l'identificazione di 76 sierotipi di Streptococcus pneumoniae



ES

S. PneumoStrip

Test para la identificación de 76 serotipos de *Streptococcus pneumoniae*

FINALIDAD PREVISTA

El test S. PneumoStrip es un test basado en la técnica del blot reverso que permite la identificación, en base a su secuencia genética, de 76 serotipos de *S. pneumoniae*:

- Tira A: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F/7A, 9A/9V, 14, 18A, 18B/18C, 18F, 19A, 19F, 23A, 23B, 23F.
- Tira B: 2, 8, 9N/9L, 10A, 10B, 10F/C, 11A/D, 11B, 11C, 11F, 12A/46, 12B/44, 12F, 15B/15C, 17F, 20, 22F/22A, 33F/33A, 37.
- Tira C: 7B, 7C/40, 15A, 15F, 16F, 19B/19C, 21, 25A/25F, 38, 24A, 24B/24F, 31, 32A/32F, 33B/33D, 33C, 35A, 35C, 35F, 47F, 41A, 41F.

De los 76 serotipos, 42 se identifican de forma individual y 34 en forma de parejas (por ejemplo, presencia de serotipos 7F o 7A).

Entre los serotipos detectados se encuentran los 23 incluidos en las diferentes vacunas disponibles (7-valente, 10-valente, 13-valente y 23-valente):

Vacuna	Serotipos <i>S. pneumoniae</i>
PCV7	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F
PCV10	1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F
PCV13	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F
PCV23	1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F

FUNDAMENTO

El kit S. PneumoStrip se basa en el principio de la hibridación reversa, y permite la detección e identificación en muestras de ADN, extraídas de cultivos de bacterias, de 76 serotipos de *S. pneumoniae*.

Las infecciones por *S. pneumoniae* representan un importante problema de salud pública tanto en los países industrializados como en aquellos menos desarrollados. Es responsable de elevada morbilidad y letalidad, ya que es uno de los principales agentes causales de una gran variedad de cuadros clínicos, desde infecciones benignas como otitis media y sinusitis agudas, hasta infecciones severas como septicemia, meningitis y neumonía.

Entre las estructuras más interesantes de esta bacteria hay que mencionar una cápsula externa a la pared celular, de naturaleza polisacárida compleja. Esta cápsula protege a la bacteria de la fagocitosis y es indispensable para su virulencia. De hecho, las variantes no capsuladas de la bacteria son, normalmente, no virulentas.

La composición antigénica de la cápsula es variable entre las diferentes cepas y permite agrupar a los *S. pneumoniae* en más de 100 serotipos capsulares diferentes y aproximadamente 45 serogrupos.

Se definen como pertenecientes a un mismo serogrupo los serotipos que presentan inmunogenicidad cruzada, por ejemplo 6A y 6B. La identificación de cada serotipo se realiza mediante una reacción antígeno-anticuerpo utilizando antisueros específicos, lo que da como resultado una hinchazón de la cápsula, fenómeno conocido como “Quellung”, término que en alemán significa hinchazón.

El procedimiento del kit S. PneumoStrip consta de tres pasos: a) Extracción de ADN, b) Amplificación mediante PCR y c) Hibridación/revelado.

a) Extracción de ADN

Reactivos no incluidos en el kit.

Puede utilizarse cualquier protocolo estándar de purificación de ADN, incluida la extracción rápida de ADN de colonias mediante hervido (ver punto “MUESTRAS”).

b) Amplificación mediante PCR

El kit S. PneumoStrip incluye los reactivos necesarios para realizar la amplificación de secuencias genéticas específicas de los serotipos que se detectan con el kit.

Para la diferenciación de los distintos serotipos de *S. pneumoniae* mediante PCR se trabaja con el locus *cps*, responsable de la síntesis de la cápsula de la bacteria. Este locus muestra una organización genética común en todos los serotipos: flanqueado por dos genes conservados, *dex B* y *aliA*, incluye cuatro primeros genes reguladores y procesadores (*wzg*, *wzh*, *wzd* y *wze*), altamente conservados en casi todos los serotipos, y una parte central que contiene genes específicos de serotipo (como *wzy* y *wzx*) que codifican proteínas como la polisacárido sintetasa, la flipasa, diversas glicosil transferasas, etc. Son estos genes específicos los que se utilizan para distinguir unos serotipos de otros.

Durante la PCR se produce también la amplificación de tres genes control:

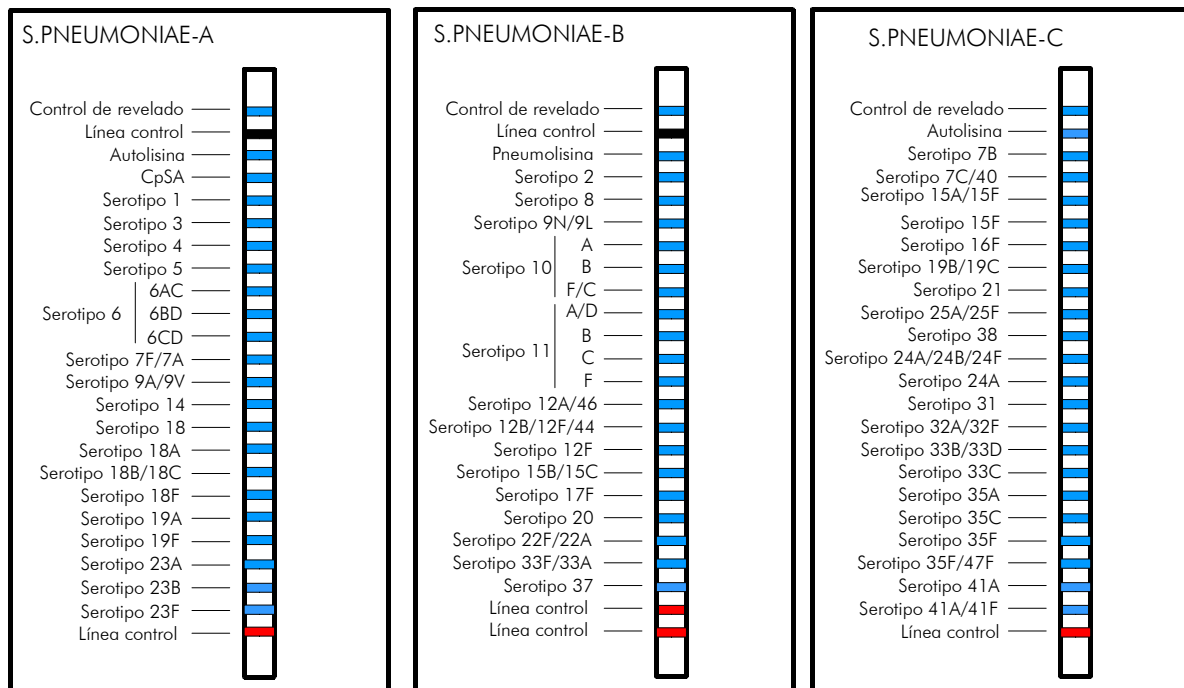
- La autolisina, codificada por el gen *lytA*, proteína necesaria para la patogénesis de *S. pneumoniae* y marcador de virulencia muy bien caracterizado, altamente conservado y que permite distinguir a la bacteria de otras especies genotípicamente similares como *S. mitis* y *S. oralis* (McAvin J. *et al.*, 2001).
- La pneumolisina, toxina formadora de poros de 53 kDa codificada por el gen *ply*, otra proteína clave en la virulencia de *S. pneumoniae* presente en todos los serotipos descritos de la bacteria (Hirst R.A. *et al.*, 2004).
- Un gen del locus *cps*, *CpSA*, presente en todos los pneumococos con cápsula. La expresión de esta cápsula es importante para la supervivencia de la bacteria en la sangre y está fuertemente asociada a la capacidad del pneumococo de desarrollar una infección invasiva (Bentley S.D. *et al.*, 2006).

c) Hibridación y revelado

En esta etapa se produce la unión específica de los fragmentos de ADN amplificados durante la PCR a una serie de sondas depositadas sobre unas membranas de nylon.

Las membranas llevan unidas de forma covalente sondas específicas para cada serotipo detectado, además de sondas para los genes control (*CpSA*, *ply* y *lyt*), una sonda control del revelado y entre una y tres líneas, negra o rojas, para el control de la posición de la tira y como ayuda en la interpretación de los resultados (ver dibujo adjunto).

La detección de los fragmentos hibridados a las diferentes sondas se realiza mediante el uso de un conjugado (estreptavidina-peroxidasa) que se une a una marca de biotina que se añade a los fragmentos de ADN amplificados durante la PCR. Tras la adición de un sustrato de la peroxidasa (TMB) se genera un precipitado de color azul allí donde se haya producido la hibridación. Como resultado final del test se obtiene un patrón de bandas que se interpreta con la ayuda de una tira control.



MATERIALES INCLUIDOS EN EL KIT

S. PneumoStrip			Kit 16 tests
	Membranas	STRIPS	16 + 16 + 16 tiras
	Cubetas 8 canales	PL	6
Reactivos de PCR REAG PCR	Premezcla PCR	REAG PCR MIX	0,8 ml
	Primers	REAG PRIMER	0,06 + 0,06 + 0,06 ml
	Taq	REAG TAQ HS	0,030 ml
	Desnaturalizante	SOLN DN	1 ml
	Tampón de hibridación	BUF HYB	125 ml
	Tampón de lavado 1	BUF WASH 1	250 ml
	Conjugado	CONJ HRP	125 ml
	Tampón de lavado 2	BUF WASH 2	350 ml
	Substrato	SUBS TMB	65 ml
	Instrucciones de uso		1
	Plantilla de interpretación		1 + 1 + 1

MATERIALES NO INCLUIDOS EN EL KIT

Para el desarrollo del kit se requieren, además, los siguientes materiales:

1. Microtubos para PCR.
2. Micropipetas y puntas para micropipetas (estériles o irradiadas con UV e, idealmente, con filtro).
3. Pinzas y lápiz (opcional).
4. Cronómetro.
5. Termómetro.

EQUIPOS NECESARIOS PARA EL DESARROLLO DEL KIT

1. Termociclador
Se han probado con éxito los siguientes termocicladores: 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems), SimpliAmp Thermal cycler (Applied Biosystems), MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad), Mastercycler Personal (Eppendorf), S1000 Thermal Cycler (BioRad).
2. Termoagitador para placas
El kit ha sido validado con los termoagitadores: PST-60HL (Biosan S.L.), Profiblot T30 y T48 (Tecan), Autoblot 3000H (medTEC), TENDIGO (Fujirebio), Dynablot Heat (Dynex).
3. Escáner BLOTrix S1 o BLOTrix R2 (BioSciTec, opcional).

PRECAUCIONES

1. Utilizar todos los reactivos únicamente *in vitro*.
2. Seguir rigurosamente las instrucciones indicadas. La modificación de cualquiera de los **pasos o temperaturas** puede afectar gravemente a los resultados del test.
3. Es esencial que todos los materiales que se vayan a usar estén libres de DNAsas. Se recomienda usar puntas de pipeta con filtro en la preparación de PCRs, para evitar problemas de contaminación por formación de aerosoles. Siga todas las precauciones normales para la preparación de las amplificaciones. Utilice material autoclavado para el proceso de hibridación/revelado.
4. Almacenar los componentes del kit en las condiciones indicadas.
5. No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.
6. No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.
7. Las tiras reactivas son de un único uso.
8. Las cubetas proporcionadas son de un único uso.
9. Cada canal de la cubeta es para una única tira.
10. En caso de rotura del envase, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes ha sido dañado.
11. El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.
12. Las muestras de pacientes deben considerarse siempre como potencialmente infecciosas. Observe todas las normas medioambientales y de seguridad.
13. Es aconsejable que la tira, una vez utilizada se manipule teniendo las mismas consideraciones que con la muestra. Se recomienda gestionarla como material potencialmente peligroso.
14. La solución de desnaturalización contiene < 2 % de NaOH y es irritante para ojos y piel (H314 y P280, P305, P351, P338, P310).
15. No tirar la caja externa del kit hasta que se haya utilizado todo el contenido. La caja contiene información esencial respecto al marcado CE del producto y lotificación.

ALMACENAMIENTO

Almacenar todos los reactivos a 2-8 °C. Debido al almacenamiento a 2-8 °C puede observarse la aparición de precipitados en alguna de las soluciones (tampón de hibridación, tampones de lavado 1 y 2, conjugado). Estos precipitados se disuelven al atemperar (conjugado) o calentar a 42 °C (tampón de hibridación y tampones de lavado 1 y 2).

La fecha de caducidad de todos los reactivos está impresa en la etiqueta.

MUESTRAS

El test ha sido diseñado y validado para su uso con ADN obtenido de cultivos de bacterias (por ejemplo, en placa de agar sangre).

Algunos de los procedimientos de extracción de ADN que han sido evaluados con resultados satisfactorios con el kit S. PneumoStrip son:

- a) Extracción de ADN con partículas magnéticas (NucliSENS easyMAG; BioMérieux). Dilución de ADN a 1 ng/μl.

- b) Extracción de ADN con resinas de sílice (QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen). Dilución de ADN a 1 ng/ μ l.
- c) Extracción rápida de ADN mediante lisado en tampón TE: una colonia aislada o el equivalente de cultivo se introduce en un microtubo con 50 μ l de tampón TE calidad PCR. Se calienta a 100 °C durante 15 minutos y se centrifuga 2 min a 14.000 rpm. Se amplifican 5 μ l del sobrenadante.



Almacenar las muestras de ADN a 2-8 °C, si se van a analizar en un tiempo breve, o a -20 °C para almacenamientos más prolongados.

PROCEDIMIENTO S. PNEUMOSTRIP

1.- Reacción en cadena de la polimerasa

Preparación de PCRs

Importante: antes de abrir los viales con los reactivos de PCR centrifugarlos brevemente. De este modo se asegurará de que todo el contenido de los mismos esté en el fondo del tubo.

- Preparar los tubos de PCR necesarios según el número de ADNs que se vayan a amplificar.
- En cada tubo de PCR añadir: 36,5 μ l de premezcla de PCR + 2,5 μ l de primers A + 2,5 μ l de primers B + 2,5 μ l de primers C + 1 μ l de Taq + 5 μ l de ADN (1 ng/ μ l). Mezclar. Si es posible, mantener todos los reactivos a 2-8 °C durante la preparación.
Si se van a amplificar varios ADNs se recomienda preparar una mezcla común con todos los reactivos, de modo que finalmente se añadan 45 μ l de mezcla + 5 μ l de ADN. Por ejemplo:

Nº de PCRs	Premezcla PCR	Primers A	Primers B	Primers C	Taq
1	36,5 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l	1 μ l
3	146 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	4 μ l
5	219 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l	6 μ l
8	328,5 μ l	22,5 μ l	22,5 μ l	22,5 μ l	9 μ l

* Las mezclas con todos los reactivos para la PCR deben prepararse siempre en exceso, para contrarrestar las pérdidas de volumen que se producen durante el proceso de pipeteo.

Siguiendo las buenas prácticas de laboratorio, el usuario debería amplificar también un control negativo (agua o tampón TE, por ejemplo) y, si fuera necesario, un control positivo (no incluido en el kit).

Amplificación

Debe tenerse en cuenta la importancia de conseguir una adecuada concentración de ADN para obtener los resultados esperados.

Introducir los tubos en el aparato de PCR (si se requiere, añadir 1 gota de aceite Nujol sobre cada reacción de PCR) y amplificar el ADN con el siguiente programa:

96 °C, 5 min
40 ciclos de: 96 °C, 15 seg
 58 °C, 1 min
 72 °C, 30 seg
72 °C, 10 min
4 °C

Una vez terminada la PCR continuar con el desarrollo de la tira. Si las muestras no se van a analizar en el momento, almacenarlas a 2-8 °C durante no más de 24 h. Para almacenamientos más prolongados, congelar a -20 °C.

→ Ver esquema de preparación de PCR en Anexo al documento

2.- Desarrollo de la tira

Bajo petición, Operon facilitará al usuario el procedimiento de trabajo según el instrumento que se vaya a utilizar para el desarrollo de las tiras (PST-60HL, Profiblot, Tendigo, Autoblot 3000H o Dynablot Heat). Alternativamente, puede consultarlo en la siguiente dirección web:

<https://operon.es/es/products-protocols/>

Cada PCR se analizará con 3 tiras: tira A, tira B y tira C. Los reactivos y procedimiento a seguir son comunes. Para el proceso de desnaturalización se emplearán **12,5 µl de desnaturalizante + 12,5 µl** de PCR por tira a analizar.

El producto se ha probado utilizando diferentes plataformas de trabajo. A modo informativo se especifican los nombres comerciales de las plataformas de trabajo utilizadas, lo que no implica un uso exclusivo y dependiente de dichas marcas comerciales, sino que se refieren de forma representativa al modo de trabajo utilizado. El producto funciona correctamente mientras se utilice una plataforma que asegure el programa de temperatura planteado para el producto.

→ Ver esquema básico del desarrollo de la tira en Anexo al documento

3.- Interpretación de la tira

La interpretación de las tiras puede hacerse de manera visual, con ayuda de la plantilla incluida en el kit (ver procedimientos de trabajo para cada instrumento) o de forma automática, mediante el uso de los escáneres BLOTrix R2 o BLOTrix S1 (BioSciTec).

Bajo petición, OPERON, S.A., S.A. facilitará al usuario las instrucciones para la interpretación automática de las tiras mediante escáner (DO-09053002 "Instrucciones de uso BLOTrix R2_S1"). Alternativamente, puede consultarlo en la siguiente dirección web:

<https://operon.es/es/products-protocols/>

Importante: la interpretación automática de los resultados requiere siempre de una verificación visual de las tiras; bandas muy débiles podrían no ser detectadas por el instrumento.

RESULTADOS

El kit S. PneumoStrip permite la detección y genotipado de 76 de los serotipos más frecuentes de *S. pneumoniae*:

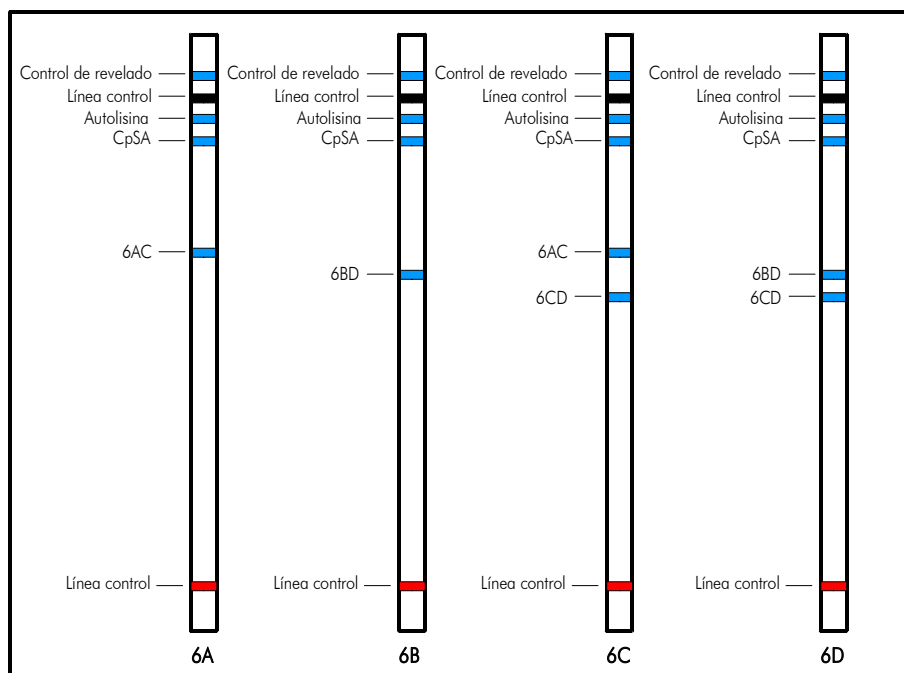
- Tira A: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F/7A, 9A/9V, 14, 18A, 18B/18C, 18F, 19A, 19F, 23 F.
- Tira B: 2, 8, 9N/9L, 10A, 10B, 10F/C, 11A/D, 11B, 11C, 11F, 12F, 15B/15C, 17F, 20, 22F/22A, 33F/33A.
- Tira C: 7B, 7C/40, 15A, 15F, 16F, 19B/19C, 21, 25A/25F, 38, 24A, 24B/24F, 31, 32A/32F, 33B/33D, 33C, 35A, 35C, 35F, 47F, 41A, 41F.

Una muestra de ADN podrá dar como resultado:

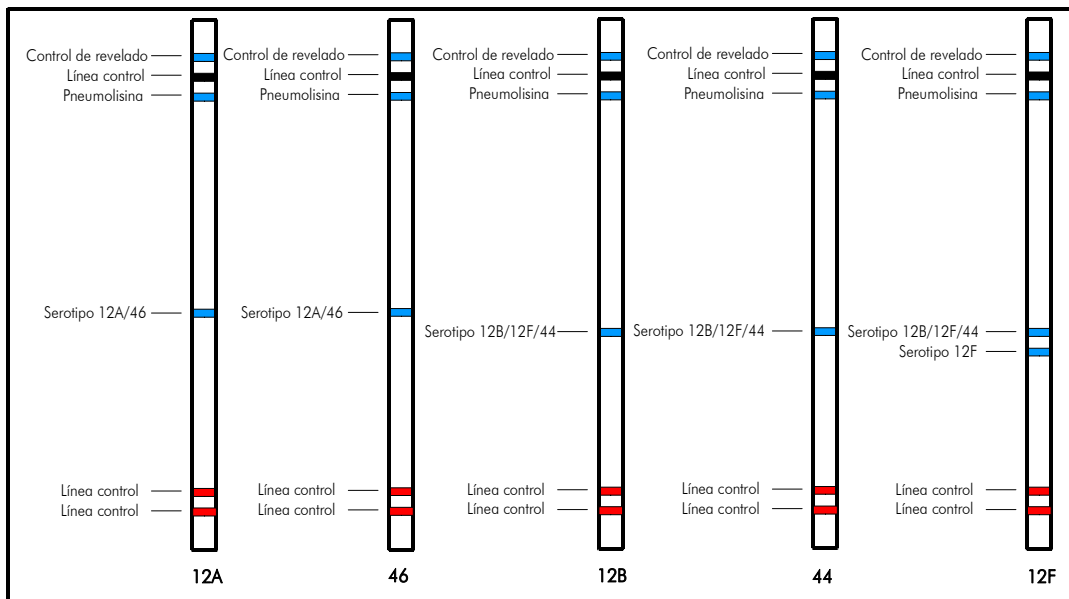
- Ninguna banda: no se identifica la bacteria como *S. pneumoniae*. Importante verificar en estos casos que la PCR ha funcionado correctamente (positivo en muestra control).
- Sólo las bandas correspondientes a los genes control: la bacteria es un *S. pneumoniae* pero el serotipo no se corresponde con ninguno de los detectados con el kit. En estos casos, se detectarán las bandas correspondientes a los genes *lyt* y *ply*, pudiendo estar presente o no la banda asociada al gen *CpSA* (presente si se trata de una bacteria capsulada o ausente si es acapsulada).
Atención: los serotipos 25A, 25F y 38, independientemente de si son acapsulados o no, no mostrarán la banda correspondiente al gen *CpSA*, debido a la presencia de mutaciones y deleciones que impiden la amplificación dicho gen (Leung M. *et al.*, 2012).
- Las bandas control y una/dos bandas asociada a un serotipo determinado: muestra positiva para ese determinado serotipo. *CpSA* podrá estar presente o no, en función de si se trata de una muestra capsulada o acapsulada (con excepción de los serotipos 25A, 25F y 38, en los que la banda de *CpSA* estará siempre ausente).
- Las bandas control y varias bandas asociadas a diversos serotipos: muestra positiva con varios serotipos.

Cada serotipo se identifica con una banda (además de las control) con excepción de:

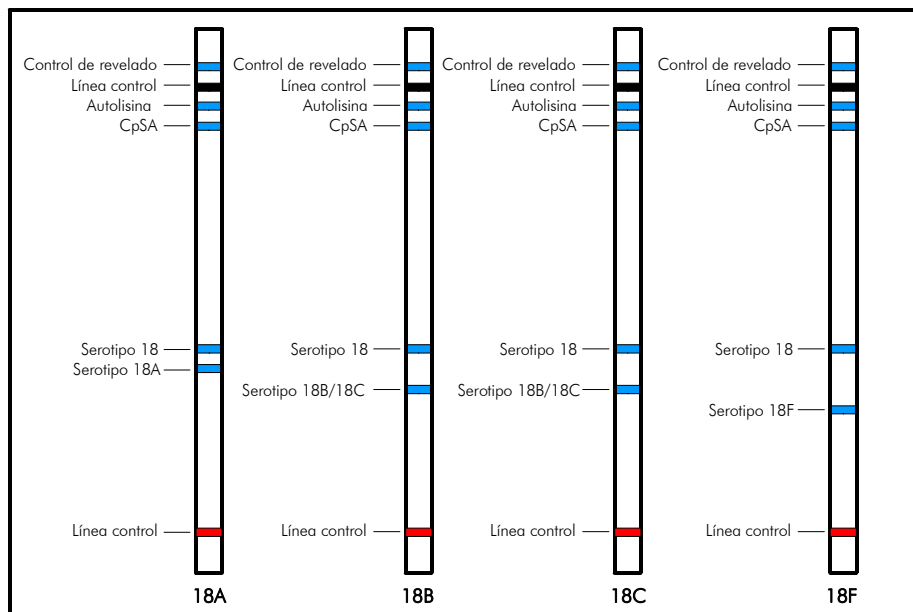
- Serotipos del grupo 6: la identificación de los serotipos 6A, 6B, 6C y 6D se hace mediante una combinación de tres bandas (6AC, 6BD y 6CD). Si la muestra corresponde a un serotipo 6A, aparecerá la banda 6AC, si la muestra corresponde a un serotipo 6B, aparecerá la banda 6BD, si la muestra corresponde a un serotipo 6C, aparecerán las bandas 6AC y 6CD, y si la muestra corresponde a un serotipo 6D, aparecerán las bandas 6BD y 6CD.



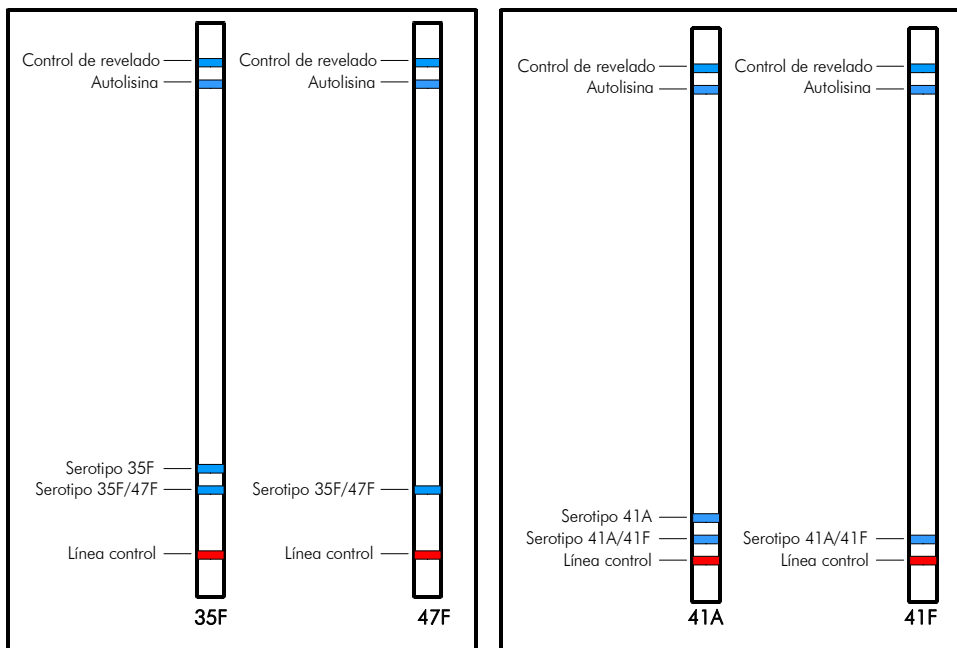
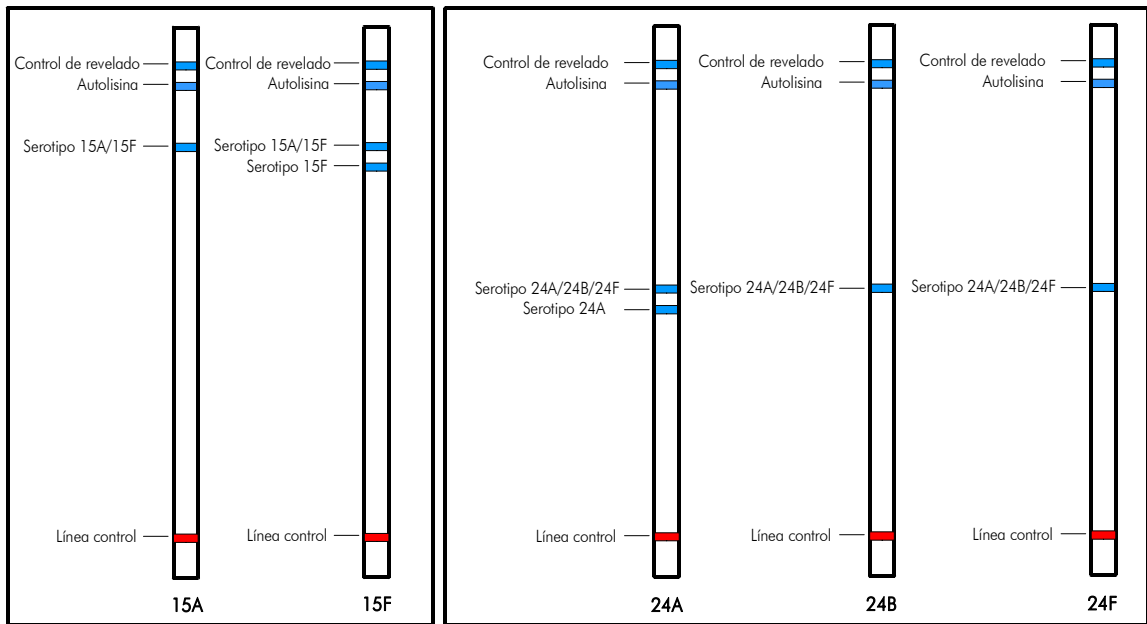
- Serotipos del grupo 12: la identificación de los distintos serotipos del grupo 12 se hace mediante una combinación de 3 sondas que permiten distinguir 12A/46, 12B/44 y 12F.



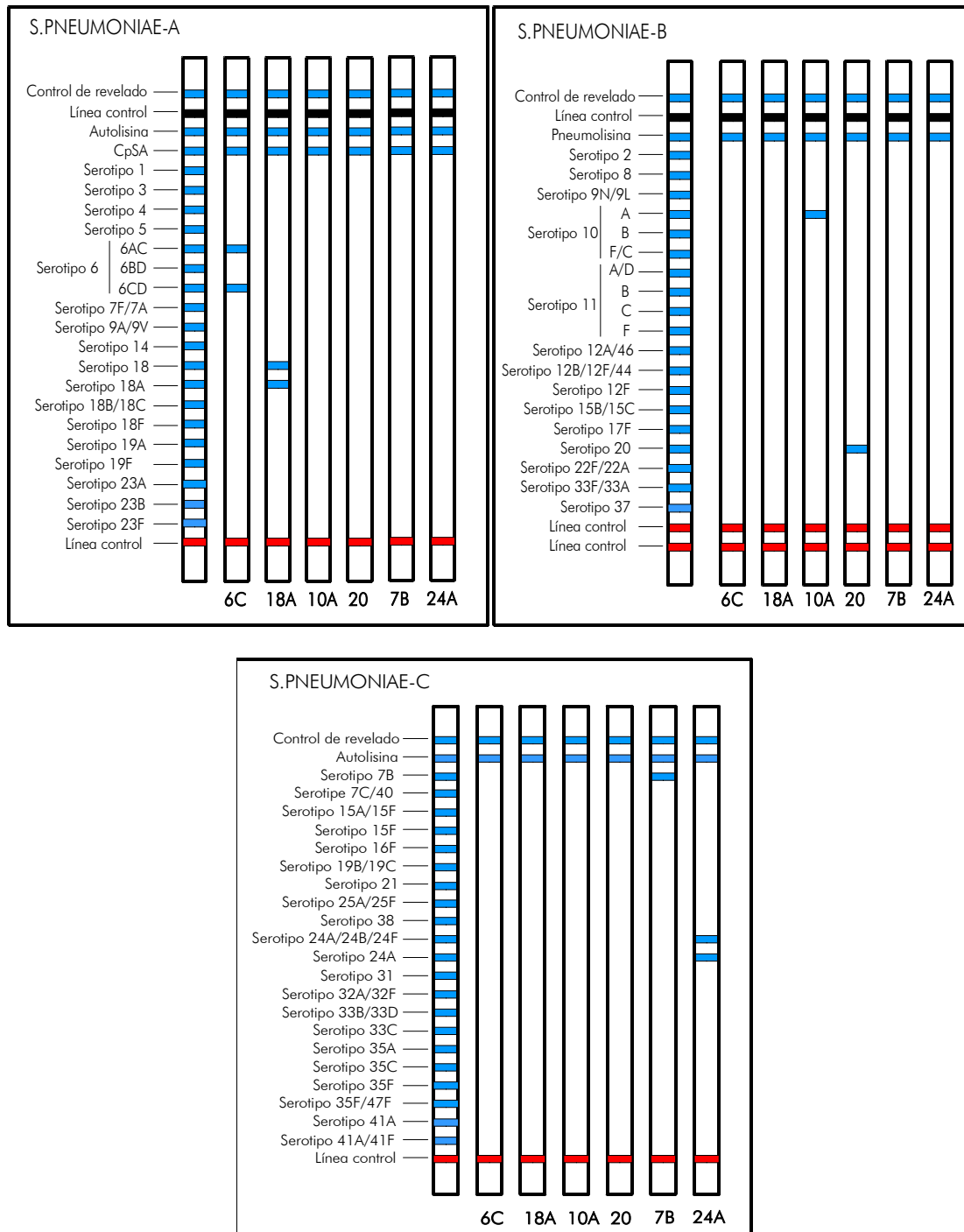
- Serotipos del grupo 18: la identificación de los serotipos 18A, 18B/C y 18F se hace mediante una combinación de dos bandas (banda del serotipo 18, común a todos los subtipos, y la banda correspondiente a cada subtipo particular). La presencia de la primera banda (serotipo 18) sin la banda asociada a un subtipo es indicativa de la presencia de alguna mutación en la zona de unión de las sondas. En estos casos, se confirma la presencia de un serotipo 18, pero no se puede identificar el subtipo al que pertenece.



- Serotipos 15A y 15F; 24A, 24B y 24F; 35F y 47 F, 41A y 41F: la identificación de estos serotipos se hace mediante una combinación de dos bandas, una banda común a ambos serotipos y una banda específica de uno de ellos.



Otros ejemplos de serotipado utilizando las tiras S. PneumoStrip



CONTROL DE CALIDAD

La línea control de revelado debe aparecer siempre (en las tiras A y B, por encima de la línea negra superior). Su ausencia será indicativa de problemas en la fase de hibridación/revelado del producto.

La tira correspondiente al control de amplificación negativo mostrará únicamente la línea de control de revelado.

La tira correspondiente al control de amplificación positivo mostrará las bandas asociadas al serotipo presente en la muestra.

PRESTACIONES / EVALUACIONES INTERNAS Y EXTERNAS

La utilización de este test está limitada a profesionales cualificados y familiarizados con métodos de Biología Molecular.

Se ha evaluado el test con numerosas muestras de ADN de diferentes serotipos de *S. pneumoniae*.

- **Estudio 1**

Realizado por el Dr. José María Marimón en el Departamento de Microbiología del Hospital Universitario de Donostia (HUD, San Sebastián).

Se analizaron 129 muestras de ADN obtenidas de:

a) 84 cepas de referencia: extracción del ADN a partir de cultivo en placa y utilizando el extractor automático Nuclisens EasyMag (BioMerieux).

b) 45 muestras de la rutina diaria del laboratorio de microbiología del Hospital Universitario de Donostia. Extracción de ADN a partir de cultivo en placa y mediante hervido.

Como test de referencia se utilizaron el análisis de fragmentos y la técnica de Quellung, siguiendo el siguiente procedimiento:

a) Todas las muestras se analizan con el kit *S. PneumoStrip* y con el método de serotipado mediante análisis de fragmentos empleado por el grupo del Dr. Marimón en la rutina de diagnóstico del Hospital Universitario de Donostia. Este método se basa en el análisis de amplicones obtenidos en una PCR multiplex mediante electroforesis capilar, tal y como se describe en Muñoz-Almagro C. *et al.*, 2014.

b) Los serotipos obtenidos con los métodos de PCRs multiplex y tiras *SpneumoStrip* se verifican mediante la técnica de Quellung.

La concordancia global obtenida entre los tres métodos de serotipado fue del 99,2 % (128/129 muestras). La concordancia de serotipado con las cepas de referencia fue del 100 % y la concordancia de serotipado con las muestras de rutina diaria fue del 97,8 %, detectándose un 93,3 % de los serotipos presentes en dicho grupo de muestras (reflejan la prevalencia de la zona de procedencia).

- **Estudio 2**

Realizado en Operon S.A. (Zaragoza, España).

Se evaluaron un total de 113 muestras de ADN, previamente analizadas mediante análisis de fragmentos (PCR multiplex + análisis de fragmentos en secuenciador) y Quellung. Para el estudio, se utilizaron tanto cepas de referencia (CDC y SSI) como cepas diagnóstico (obtenidas a partir de muestras de la rutina de diagnóstico en el Hospital Universitario de Donostia, HUD).

Las cepas de referencia fueron serotipadas mediante la técnica de Quellung y el sistema de PCR multiplex empleado de forma rutinaria en el Departamento de Microbiología del hospital.

Las cepas de diagnóstico fueron serotipadas mediante la técnica de Quellung (grupos 11, 10, 18) y/o el sistema de PCR multiplex del hospital.

El porcentaje de concordancia entre los métodos fue del 100%.

POSIBLES PROBLEMAS

1. No aparece ninguna banda en la tira, incluida la banda control.

- No se han equilibrado a temperatura ambiente el conjugado y/o revelador.
- No se ha añadido el conjugado y/o revelador, o se han añadido en poca cantidad.

2. Sólo aparece la línea de la sonda control.

- Fallo de amplificación de la PCR (comprobar en gel de agarosa).
- No se ha añadido la PCR, o se ha añadido en menor cantidad, en el paso de hibridación.
- Temperatura incorrecta del tampón de hibridación/lavado 1 (superior a la indicada).
- Temperatura incorrecta del incubador (superior a la indicada).

3. Fuerte color de fondo en la tira tras el revelado.

- Los pasos de lavado no se realizaron de manera adecuada (tiempo inadecuado, cantidad de tampón menor, tampones fríos).

4. Tinción no homogénea de la tira.

- Agitación inadecuada (revisar la programación del termoagitador para placas).
- Las tiras no quedaron sumergidas por completo durante las incubaciones.

5. Resultados inesperados

- Temperatura de incubación y/o de los tampones/reactivos inadecuadas.
- Contaminación en las PCRs (comprobar con un control negativo).
- Contaminación de canales adyacentes por paso de líquido de un canal a otro al añadir el tampón de hibridación.

Se ha evaluado el rango de temperaturas de trabajo durante el proceso de hibridación con dos termoagitadores (PST 60HL y Profiblot).

En el caso del Profiblot, el rango de temperatura de trabajo óptimo está entre 42-43 °C.

El rango de temperatura de trabajo óptimo en el PST 60 HL está entre 42-44 °C.

La sonda más sensible a los cambios de temperatura es la sonda 6AC, la reducción de la temperatura de trabajo podría afectar a su especificidad. El uso de temperaturas superiores a las indicadas podría afectar a la sensibilidad del kit.

SENSIBILIDAD

Definimos como **límite de detección** del kit a la cantidad mínima de ADN/ARN que puede detectarse con el test.

El límite de detección del kit se ha determinado para cada uno de los serotipos detectados con el kit S. PneumoStrip. Para ello, se analizaron diluciones seriadas 1/10 de ADNs de cada uno de ellos con el producto.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Serotipo	Límite de detección (ng/μl)	Serotipo	Límite de detección (ng/μl)	Serotipo	Límite de detección (ng/μl)
1	0,0001	2	0,001	7B	0,0001
3	0,000001	8	0,0001	7C/40	0,0001
4	0,0001	9N/9L	0,00001	15A	0,00001
5	0,0001	10A	0,0001	15F	0,001
6A	0,0001	10B	0,0001	16F	0,0001
6B	0,0001	10F/C	0,0001	19B/19C	0,0001
6C	0,0001	11A/D	0,00001	21	0,0001
6D	0,0001	11B	0,0001	25A/25F	0,0001
7F/7A	0,0001	11C	0,0001	38	0,0001
9V/9A	0,0001	11F	0,00001	24A	0,00001
14	0,00001	12A/46	0,0001	24B/24F	0,0001

Serotipo	Límite de detección (ng/μl)	Serotipo	Límite de detección (ng/μl)	Serotipo	Límite de detección (ng/μl)
18A	0,0001	12B/12F/44	0,00001	31	0,0001
18B/18C	0,0001	12F	0,00001	32A/32F	0,0001
18F	0,00001	15B/15C	0,0001	33B/33D	0,0001
19A	0,0001	17F	0,00001	33C	0,0001
19F	0,00001	20	0,0001	35A	0,0001
23A	0,00001	22F/22A	0,00001	35C	0,0001
23B	0,0001	33F/33A	0,00001	35F	0,00001
23F	0,00001	37	0,00001	47F	0,00001
				41A	0,00001
				41F	0,00001

ESPECIFICIDAD

Se ha comprobado la ausencia de reacción entrecruzada con las siguientes bacterias: *S. pseudoneumoniae*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *E. coli ST131*, *E. coli O6*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catharralis*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus* (*mec A + y mec A -*).

EFEECTO HOOK

Se ha evaluado el funcionamiento del kit *S. PneumoStrip* en presencia de cantidades crecientes de ADN (hasta 100 ng). No se ha observado efecto de inhibición de la PCR, ni reducción de la intensidad de las bandas obtenidas, ni aparición de problemas de reacción entrecruzada. No existe, por lo tanto, efecto Hook.

PRECISIÓN INTRAENSAYO

Se ha estudiado la precisión intraensayo de *S. PneumoStrip* mediante el análisis de, por un lado, 5 curvas de sensibilidad (diluciones 1/4 de un ADN control compuesto por una mezcla de ADNs de todos los serotipos detectados en el kit) y, por otro lado, cinco réplicas de 8 muestras de ADN positivas para varios serotipos.

El kit ha demostrado tener una muy buena precisión intraensayo, obteniéndose siempre el mismo serotipado en las muestras y una sensibilidad semejante.

PRECISIÓN INTERDÍA

Se ha estudiado la precisión interdía de *S. PneumoStrip* mediante el análisis de una curva de sensibilidad (diluciones 1/4 de un ADN control compuesto por una mezcla de ADNs de todos los serotipos detectados con el kit) y 8 muestras reales. Cada análisis fue realizado por una misma persona, utilizando un mismo lote de producto y a lo largo de cinco días consecutivos.

El kit ha demostrado una buena reproducibilidad variando el día. Al igual que en la precisión intraensayo, todos los días se obtuvo un mismo serotipado en las muestras y una sensibilidad parecida.

PRECISIÓN INTERLABORATORIO

Se ha estudiado la precisión interlaboratorio mediante el análisis de una curva de sensibilidad (diluciones 1/4 de un ADN control compuesto por una mezcla de ADNs de todos los serotipos detectados con el kit) y 8 muestras reales. Cada análisis fue realizado por una persona diferente, en el mismo día y utilizando el mismo lote de producto. Para variar al máximo las condiciones de uso del kit, cada operador utilizó un termociclador y un termoagitador diferentes.

Al igual que en las pruebas anteriores, el kit mostró una buena reproducibilidad variando el operador y condiciones.

PRECISIÓN INTERLOTE

Se ha estudiado la precisión interlote del kit S. PneumoStrip mediante el análisis con tres lotes diferentes del producto de una curva de sensibilidad (diluciones 1/4 de un ADN control compuesto por una mezcla de ADNs de los diferentes serotipos detectados con el kit) y de 25 muestras de ADN positivas para alguno de los serotipos detectados con el kit.

El kit ha mostrado una buena precisión interlote. Los resultados obtenidos con las 25 muestras de ADN fueron idénticos en todos los casos y los resultados obtenidos en las curvas de sensibilidad semejantes.

S. PneumoStrip

Test for the identification of 76 serotypes of Streptococcus pneumoniae

INTENDED USE

The S. PneumoStrip test is a test based on the reverse blot technique that allows the identification, in base of its genetic sequence, of 76 serotypes of *S. pneumoniae*:

- Strip A: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F/7A, 9A/9V, 14, 18A, 18B/18C, 18F, 19A, 19F, 23A, 23B, 23 F.
- Strip B: 2, 8, 9N/9L, 10A, 10B, 10F/C, 11A/D, 11B, 11C, 11F, 12A/46, 12B/44, 12F, 15B/15C, 17F, 20, 22F/22A, 33F/33A, 37.
- Strip C: 7B, 7C/40, 15A, 15F, 16F, 19B/19C, 21, 25A/25F, 38, 24A, 24B/24F, 31, 32A/32F, 33B/33D, 33C, 35A, 35C, 35F, 47F, 41A, 41F.

Of the 76 serotypes, 42 are identified individually and 34 as pairs (for example, the presence of serotypes 7F or 7A).

Among the known serotypes are the 23 included in the various vaccines available (7-valent, 10-valent, 13-valent and 23-valent):

Vaccine	Serotypes <i>S. pneumoniae</i>
PCV7	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F
PCV10	1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F
PCV13	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F
PCV23	1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F.

PRINCIPLE

The S. PneumoStrip kit is based on the principle of reverse hybridization, and allows the detection and identification of DNA samples, extracted from bacterial culture, of 42 serotypes of *S. pneumoniae*.

Infections of *S. pneumoniae* represent an important public health problem in both industrialized nations as well as those that are less-developed. It is responsible for high mortality and lethality, as it is one of the main causative agents for a large variety of clinical conditions, from benign infections like otitis media and acute sinusitis to more severe infections such as septicaemia, meningitis and pneumonia.

Among the interesting structures of this bacteria is a capsule outside the cell wall, made of complex polysaccharides. This capsule protects the bacterium from phagocytosis and is essential to its virulence. In fact, the non-encapsulated forms of the bacteria are, normally, not virulent.

The antigenic composition of the capsule is variable between the various strains and allows *S. pneumoniae* to be grouped into over 100 different capsular serotypes and approximately 45 serogroups. Serotypes that present cross-immunogenicity are considered to belong to the same serogroups, for example, 6A and 6B. The identification of each serotype is made using an antigen-

antibody reaction with specific antisera, which results in swelling of the capsule, a phenomenon known as “Quellung”, a German term that means swelling.

The procedure of *S. PneumoStrip* kit consists in three steps: a) DNA extraction, b) PCR amplification and c) Hybridization/developing.

a) DNA extraction

Reagents not included in the kit.

Any standard DNA purification protocol can be used, including rapid DNA extraction from colonies by boiling (see “SAMPLES” section).

b) PCR amplification

The *S. PneumoStrip* kit includes the reagents needed to perform specific genetic sequence amplification of the serotypes detected with the kit.

For the differentiation of the various serotypes of *S. pneumoniae* by PCR, the *cps* locus is used, responsible for the synthesis of the bacterial capsid. This locus shows a common genetic organisation across all serotypes: flanked by two conserved genes, *dex B* and *aliA*, it includes four primary regulatory and processing genes (*wzg*, *wzh*, *wzd* and *wze*), highly conserved in nearly all serotypes, and a central portion that contains serotype-specific genes (such as *wzy* and *wzx*) that code for proteins such as polysaccharide synthetase, flippase, various glycosyl transferases, etc. These are specific genes that are used to distinguish one serotype from another.

During PCR, three control genes are also amplified:

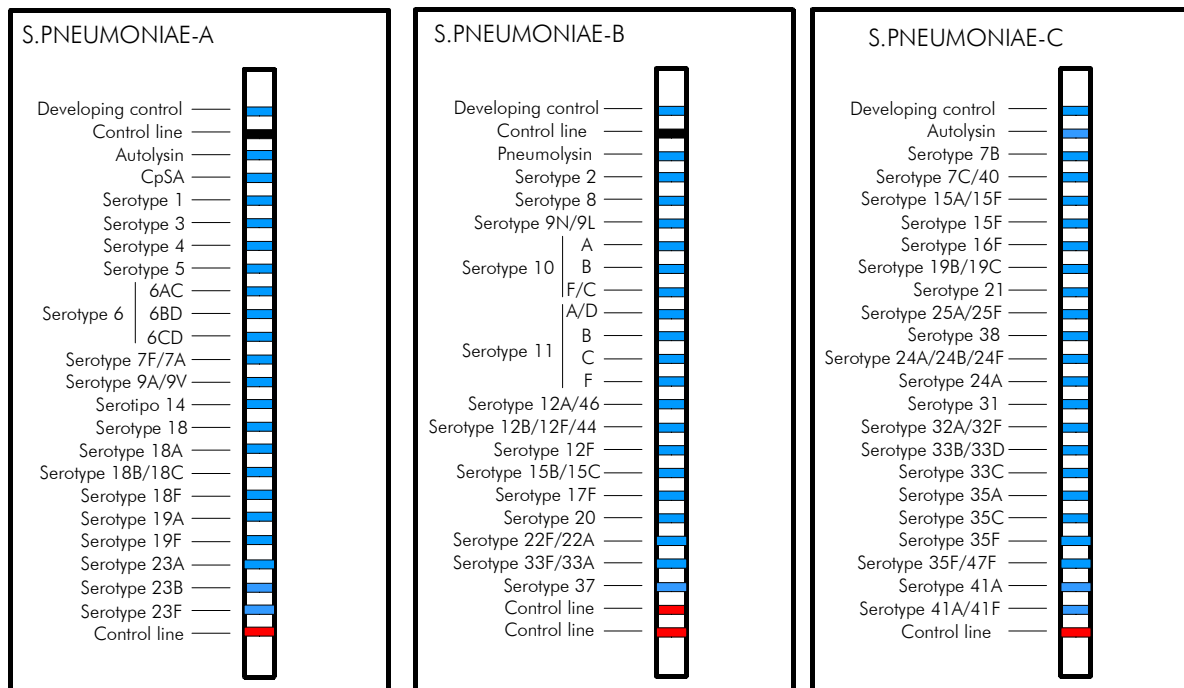
- Autolysin, encoded by the gene *lytA*, a protein necessary for the pathogenesis of *S. pneumoniae* is a well-characterised, highly-conserved virulence marker, that allows the bacteria to be distinguished from other genotypically similar species such as *S. mitis* and *S. orale* (McAvin J. et al., 2001).
- Pneumolysin, a pore-forming toxin 53 kDa long, encoded by the *ply* gene, is another key protein in *S. pneumoniae* virulence, present in all the described serotypes of the bacteria (Hirst R.A. et al., 2004).
- A gene of the *cps* locus, *CpSA*, present in all pneumococci with capsids. The expression of this capsid is important for the survival of the bacteria in blood and is strongly associated with the ability of the pneumococcus to develop an invasive infection (Bentley S.D. et al., 2006).

c) Hybridization and development

Specific binding of PCR-amplified DNA fragments takes place during this step, using a series of probes that are covalently bound to a nylon membrane.

The membranes are covalently bound to probes specific to each detected serotype, along with probes for the control genes (*CpSA*, *ply* and *lyt*), a visible control line probe and between one and three lines, black or red, for the control of the strip's position to aid in the interpretation of results (see attached drawing).

The detection of the fragments that hybridize to the different probes is carried out using a streptavidin-peroxidase conjugate that binds to a biotin marker added to the PCR-amplified DNA fragments. Following the addition of a peroxidase substrate (TMB), a blue precipitate appears in the locations where hybridization has taken place. The end result of the test is a pattern of bands that can be interpreted with the help of a control strip.



KIT CONTENTS

S. PneumoStrip			Kit 16 tests
	Membranes	STRIPS	16 + 16 + 16 tiras
	8 channel tray	PL	6
Reactivos de PCR REAG PCR	PCR Mix	REAG PCR MIX	0,8 ml
	Primers	REAG PRIMER	0,06 + 0,06 + 0,06 ml
	Taq	REAG TAQ HS	0,030 ml
	Denaturing	SOLN DN	1 ml
	Hybridization buffer	BUF HYB	125 ml
	Wash 1 buffer	BUF WASH 1	250 ml
	Conjugate	CONJ HRP	125 ml
	Wash buffer 2	BUF WASH 2	350 ml
	Substrate	SUBS TMB	65 ml
Instructions	Instructions		1
	Interpretation chart		1 + 1 + 1

MATERIALS NOT INCLUDED IN THE KIT

The following additional material is required when using the kit:

1. Microtubes for PCR
2. Micropipettes and micropipette tips (sterile or UV-irradiated and ideally with a filter)
3. Tweezers and a pencil (optional)
4. Chronometer
5. Thermometer

REQUIRED EQUIPMENT FOR KIT DEVELOPMENT

1. Thermocycler
The following thermocyclers have been successfully used with the kit: 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems), SimpliAmp Thermal cycler (Applied Biosystems), MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad), Mastercycler Personal (Eppendorf), S1000 Thermal Cycler (BioRad).
2. Thermoshakers
The kit has been validated with the following thermoshakers: PST-60HL (Biosan S.L.), Profiblot T30 AND T48 (Tecan), Autoblot 3000H (medTEC), TENDIGO (Fujirebio), Dynablot Heat (Dynex).
3. BLOTriX S1 or BLOTriX R2 scanner (BioSciTec, optional).

PRECAUTIONS

1. Only use the reagents *in vitro*.
2. Strictly follow the instructions provided. Modifying any of the prescribed **steps or temperatures** may severely affect the test results.
3. All the materials and reagents used must be free of DNAses. The use of filtered pipette tips is recommended for PCR preparation to prevent aerosol contamination. Ensure that all the usual precautions are taken in the preparation of the amplifications. Use autoclaved material for the hybridization/development process.
4. Store the kit components as indicated in the instructions.
5. Do not exchange components from kits with different lot numbers.
6. Do not use kit components after the expiration dates.
7. Strips are for single-use.
8. Supplied trays are for single-use.
9. Each channel of the supplied trays is for just one strip.
10. If the package is broken, the product can still be used providing none of the components have been damaged.
11. The used product should be discarded in compliance with current legislation.
12. Patient samples must always be treated as potentially infectious. Environmental and safety standards must be adhered to.
13. Once it is used, it is advisable to manipulate the strip taking into account the same considerations as for the sample. The strips have to be manipulated with the proper precautions and should be managed as biohazardous material.
14. The denaturation solution contains < 2% NaOH and is an irritant to both eyes and skin (H314 and P280, P305, P351, P338, P310).
15. Do not discard the external box of the kit until its content has been totally used. The external box contains essential information regarding the CE marking and component lots.

STORAGE

Store all reagents at 2-8 °C. Precipitates may appear in some solutions (hybridization buffer, wash buffers 1 and 2, conjugate) owing to storage at 2-8 °C. The precipitates are dissolved again when they are brought back to room temperature (conjugate) or heated to 42 °C (hybridization buffer and wash buffers 1 and 2).

The expiry date of all the reagents is printed on the label.

SAMPLES

The test has been designed and validated for its use with DNA obtained from bacterial culture (for example, in Blood Agar plates).

Some of the DNA extraction methods that have been evaluated with satisfactory results with S. PneumoStrip kit are:

- DNA extraction with magnetic particles (NucliSENS easyMAG; BioMérieux). Dilution of DNA to 1 ng/ μ L.
- DNA extraction with silica resins (QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen). Dilution of DNA to 1 ng/ μ L.
- Rapid DNA extraction in TE buffer: an isolated colony or equivalent of culture is introduced into a microtube with 50 μ L of PCR-quality TE buffer. It is heated to 100 °C for 15 minutes and centrifuged for 2 min at 14,000 rpm. 5 μ L of the supernatant are amplified.



Store the DNA samples at 2-8 °C if they are going to be used shortly after, or at -20 °C for longer periods of storage.

S. PNEUMOSTRIP PROCEDURE

1.- Polymerase chain reaction

PCR preparation

Important: before opening the vials with the PCR reagents centrifuge them briefly. This will ensure that all the contents will be at the bottom of the tube.

- Prepare the required PCR tubes based on the number of DNAs to be amplified.
- Add to each PCR tube: 36,5 μ L of PCR premix + 2,5 μ L of primers A + 2,5 μ L of primers B + 2,5 μ L of primers C + 1 μ L of Taq + 5 μ L of DNA (1 ng/ μ L). Mix well. If possible, keep the reagents and the mixtures at 2-8 °C during the preparation.
If various DNA samples are to be amplified, it is recommended to prepare a common mixture with all the reagents to finally add 45 μ L of mixture + 5 μ L of DNA. For example:

N° of PCRs	PCR premix	Primers A	Primers B	Primers C	Taq
1	36,5 μ L	2,5 μ L	2,5 μ L	2,5 μ L	1 μ L
3	146 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	4 μ L
5	219 μ L	15 μ L	15 μ L	15 μ L	6 μ L
8	328,5 μ L	22,5 μ L	22,5 μ L	22,5 μ L	9 μ L

** The mixtures containing all PCR reagents should always be prepared in excess to compensate for the loss of volume that takes place during the pipetting process.*

Due to requirements of "good laboratory practice", the user should also include a negative control (e.g. water or TE buffer) to exclude contamination and, if required, a positive control (not included in the kit).

Amplification

Regard the importance of getting a suitable concentration of the DNA to get a proper result.

Place the tubes into the thermocycler (if required, add 1 drop of Nujol oil on top of every PCR reaction) and amplify DNA by the following program:

96 °C, 5 min
40 cycles of: 96 °C, 15 sec
58 °C, 1 min
72 °C, 30 sec
72 °C, 10 min
4 °C

Once the PCR is finished, continue with the developing of the strip. If the samples are not to be tested immediately, they must be stored at 2-8 °C for no more than 24 hrs. For longer storage, freeze at -20 °C.

→ See the PCR preparation diagram in the Annex of the document.

2.- Strip developing

On request, Operon will provide the user with the working procedure for the specific instrument to be used for processing the strips (PST-60HL, Profiblot, Tendigo, Autoblot 3000H or Dynablot Heat). Alternatively, please refer to the following web address:

<https://operon.es/products-protocols/>

Each PCR will be analyzed with 3 strips: strip A, strip B and strip C. Reagents and procedures are the same. For the denaturing process, **12.5 µl of denaturant + 12.5 µl** of PCR will be used per strip.

The product has been tested using different work platforms. For your information, the commercial names of the work platforms used are specified, which does not imply an exclusive use of such trademarks but the work protocol. The product works correctly as long as the platform used ensures the temperature program raised for the product.

→ See the Strip developing diagram in the Annex of the document.

3.- Strip interpretation

Strip interpretation can be done visually, using the evaluation chart included in the kit (see working procedures for each instrument) or automatically, with BLOTRix R2 or BLOTRix S1 scanners (BioSciTec).

On request, OPERON, S.A. will provide the user with the instructions for the automatic strip interpretation with the scanners (DO-09053002 "Instructions of use BLOTRix R2_S1"). Alternatively, please refer to the following web address:

<https://operon.es/products-protocols/>

Important: results of strips interpretation with the scanners must always be visually verified; very faint bands could be not detected by the instruments.

RESULTS

S. PneumoStrip kit allows for the detection and genotyping of 76 of the most common serotypes of *S. pneumoniae*:

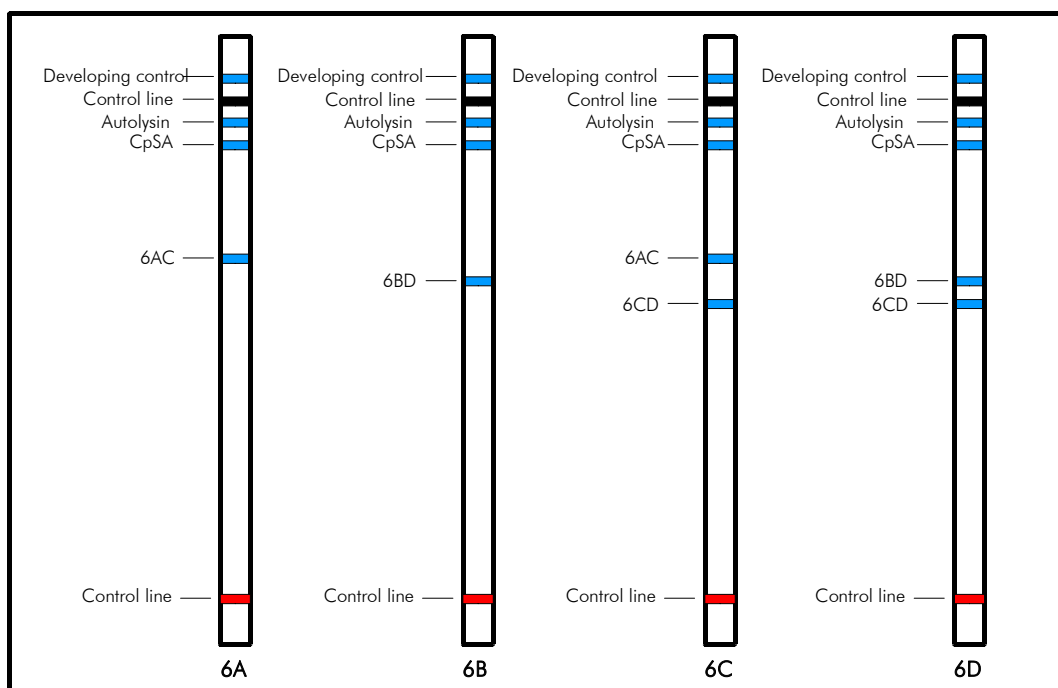
- Strip A: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F/7A, 9A/9V, 14, 18A, 18B/18C, 18F, 19A, 19F, 23 F.
- Strip B: 2, 8, 9N/9L, 10A, 10B, 10F/C, 11A/D, 11B, 11C, 11F, 12F, 15B/15C, 17F, 20, 22F/22A, 33F/33A.
- Strip C: 7B, 7C/40, 15A, 15F, 16F, 19B/19C, 21, 25A/25F, 38, 24A, 24B/24F, 31, 32A/32F, 33B/33D, 33C, 35A, 35C, 35F, 47F, 41A, 41F.

A DNA sample may render the following results:

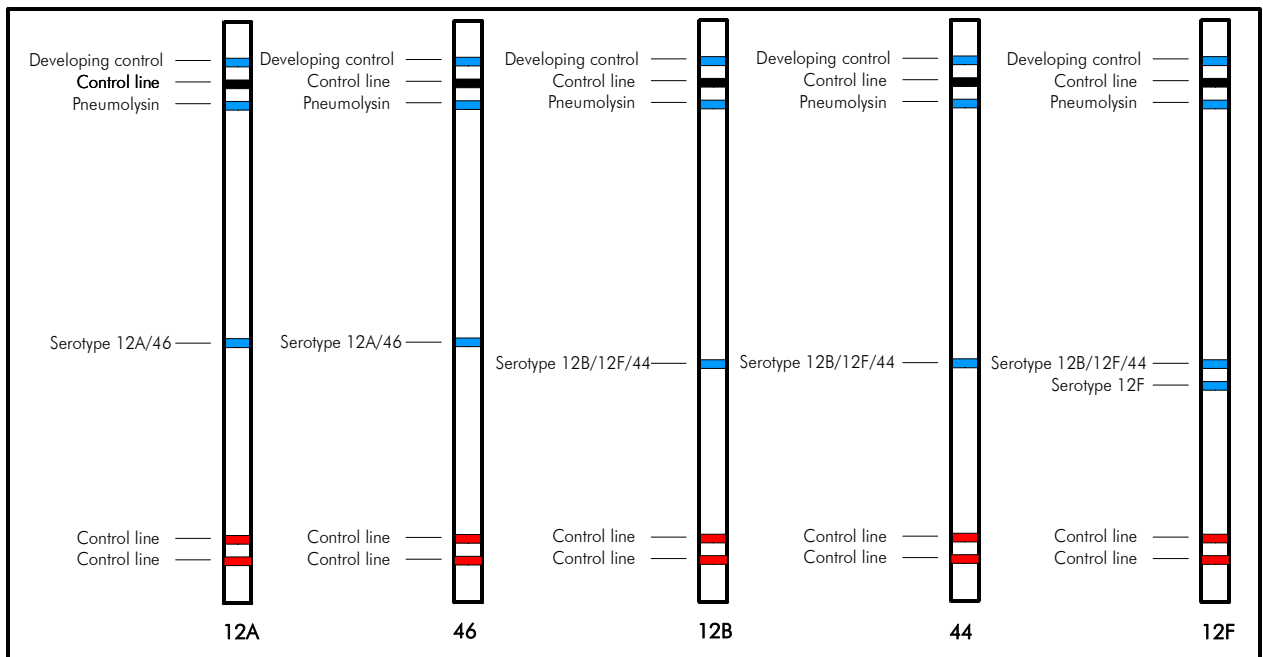
- No band: the bacteria is not identified as *S. pneumoniae*. It is important in these cases to verify that the PCR has worked properly (positive for control sample).
- Only the bands corresponding to the control genes: the bacteria is *S. pneumoniae* but the serotype does not correspond to any of those detected with the kit. In these cases, the bands corresponding to the genes *lyt* and *ply* will be detected, and the band associated with the CpSA gene may or may not be present (depending on whether or not it is an encapsulated or non-encapsulated bacterium). Attention: due to the presence of mutations and deletions that avoid the amplification of the CpSA gene, serotypes 25A, 25F and 38, independent of if they are capsulated or not, will not show the band associated to this gene (Leung M. et al. 2012).
- The control band and one/two bands associated to a certain type of *S. pneumoniae*: sample positive for that particular serotype. CpSA may or may not be present, depending on whether the sample is encapsulated or non-encapsulated (with the exception of serotypes 25A, 25F and 38, in which CpSA band will be always absent).
- The control band and several bands associated to different serotypes: positive sample with multiple serotypes.

Each serotype is identified with a band (aside from the control) except for:

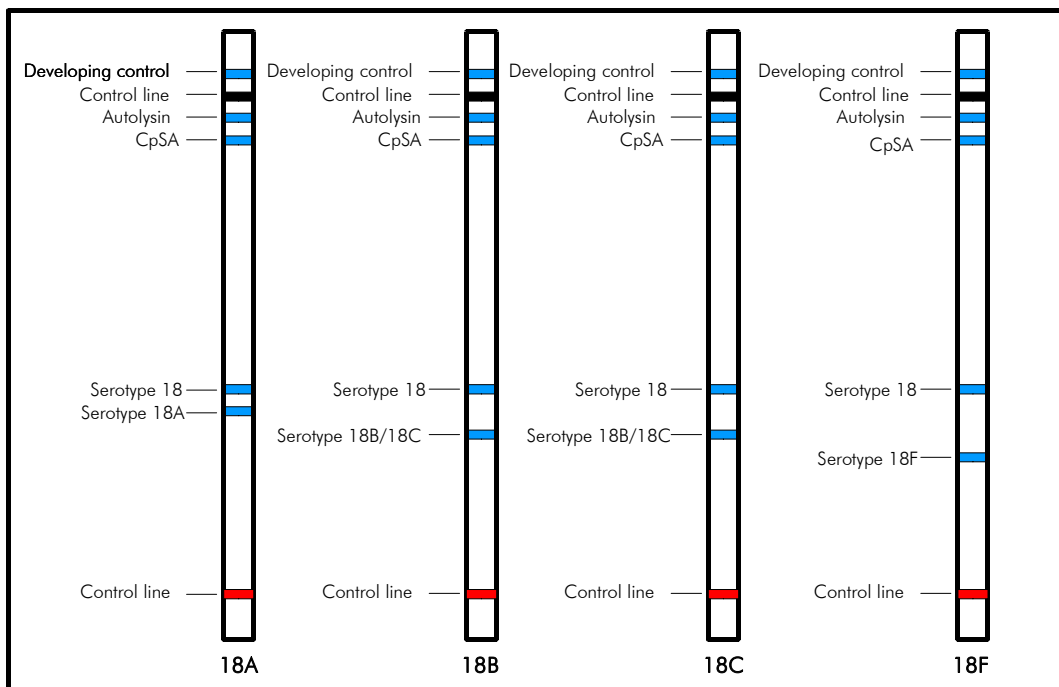
- Serotypes from group 6: the identification of serotypes 6A, 6B, 6C and 6D is determined from a combination of three bands (6AC, 6BD and 6CD). If the sample corresponds to serotype 6A, the 6AC band will appear. If the sample corresponds to serotype 6B, the 6BD band will appear. If the sample corresponds to serotype 6C, the 6AC and 6CD bands will appear, and if the sample corresponds to serotype 6D, the 6BD and 6CD bands will appear.



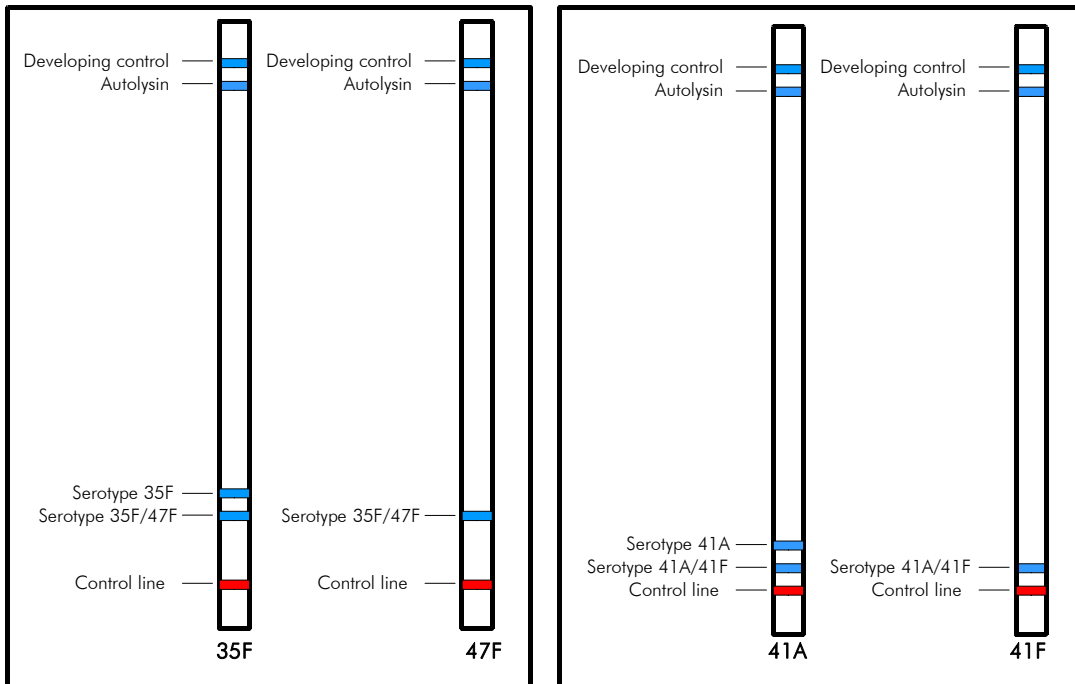
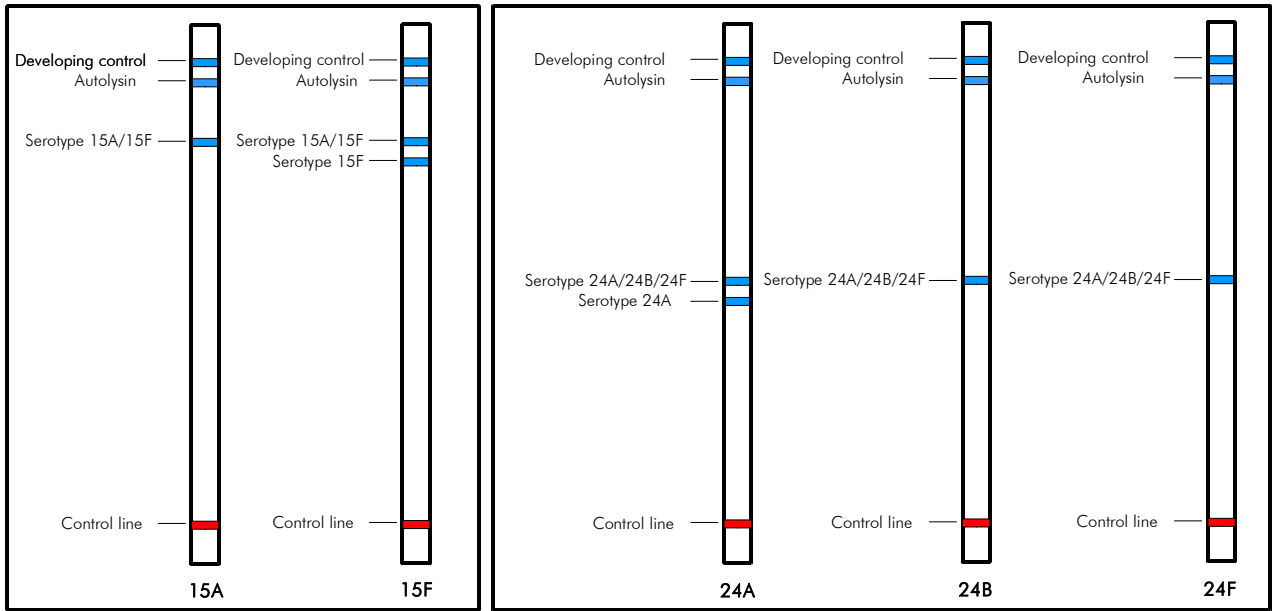
- Serotypes from group 12: the identification of serotypes of group 12 is determined from a combination of three probes that allow to distinguish between 12A/46, 12B/44 and 12F.



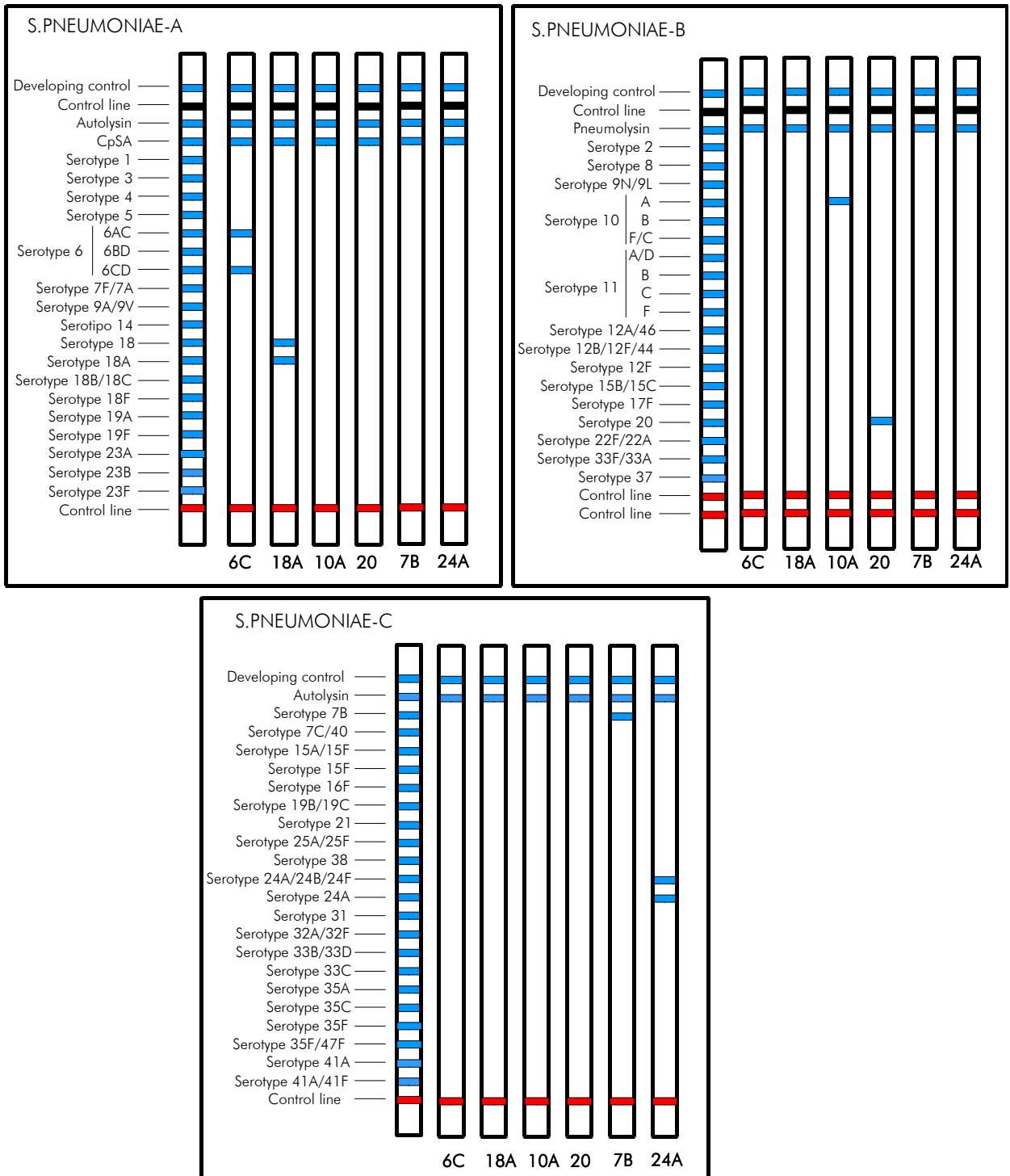
- Serotypes from group 18: the identification of serotypes 18A, 18B/C and 18F is determined from a combination of two bands (the serotype 18 band common to all subtypes, and the band corresponding to each specific subtype). The presence of the first band (serotype 18) without the band associated to a subtype is indicative of the presence of a mutation in the probe binding zone. In these cases, the presence of serotype 18 is confirmed, but the subtype to which it belongs cannot be identified.



- Serotypes 15A and 15F; 24A, 24B and 24F; 35F and 47 F, 41A and 41F: the identification of these serotypes is determined from the combination of two bands, one band common to both serotypes and one band specific to one of them.



More serotyping examples using *S. PneumoStrip*



QUALITY CONTROL

The development control line should always appear (above the upper black line in strips A and B). Its absence will be indicative of issues encountered during the product hybridization/development stage.

The strip corresponding to the amplification negative control will show only the developing control band.

The strip corresponding to the positive amplification control will show the bands associated with the serotype present in the sample.

FEATURES / EXTERNAL AND INTERNAL EVALUATIONS

The use of this test is restricted to professional users that are familiar with the methods used in Molecular Biology.

The test has been evaluated with several DNA samples from different serotypes of S. pneumoniae.

- **Evaluation 1**

Conducted by Dr. José María Marimón in the Department of Microbiology of the Hospital Universitario de Donostia [University Hospital of Donostia] (San Sebastián).

129 samples of DNA were analysed from:

- 84 reference strains: DNA extraction from plate culture using the automated Nuclisens EasyMag extractor (BioMerieux).
- 45 samples from the routine operations of the microbiology laboratory of the Hospital Universitario de Donostia. DNA extraction from plate culture after boiling.

As a reference test, fragment analysis and the Quellung technique were used, according to the following procedure:

- a) All the samples were analysed with the S. PneumoStrip kit and with the fragment analysis serotyping method used by Dr. Marimón's group in routine diagnosis at the Hospital Universitario de Donostia. This method is based on the analysis of amplicons obtained from multiplexed capillary electrophoresis PCR, as described in Muñoz-Almagro C. *et al.*, 2014.
- b) The serotypes obtained with the multiplex PCR methods and S. PneumoStrip strips are verified using the Quellung technique.

The overall concordance obtained between the three serotyping methods was 99,2 % (128/129 samples). The serotyping concordance with the reference strains was 100 % and the serotyping concordance with the routine samples was 97,8 %, detecting 93.3% of serotypes present in this group of samples (reflecting the prevalence of the area of origin).

- **Evaluation 2**

Conducted at Operon S.A. (Zaragoza, Spain).

A total of 113 DNA samples were evaluated, previously analysed by fragment analysis (multiplex PCR + fragment analysis in a sequencer) and Quellung. For the study, both reference strains (CDC and SSI) and diagnostic strains (obtained from routine operations at the Hospital Universitario de Donostia) were used.

The reference strains were serotyped using the Quellung technique and the multiplex PCR system used routinely in the Department of Microbiology of the hospital.

The diagnostic strains were serotyped using the Quellung technique (groups 11, 10, 18) and/or the hospital's PCR multiplex system.

The percentage of concordance between methods was 100%.

POTENTIAL ISSUES

1. No bands appear on the strip, including the control band.

- The conjugate and/or developer were not balanced at room temperature.
- The conjugate and/or developer were not added, or were added in too small quantity.

2. Only the control band appears

- PCR amplification has failed (check with an agarose gel).
- The PCR was not added, or was added in too small quantity in the hybridization step.
- Incorrect hybridization or wash 1 buffers temperature (higher than instructed).
- Incorrect incubator temperature (higher than instructed)

3. The strip has a strong background colour following development

- The washing steps were not performed effectively (wrong timing, buffer quantity too small, cold buffers).

4. Non-homogenous strip staining

- Inadequate shaking (please review the plate thermo-shaker programme).
- The strips were not entirely submerged during the incubations.

5. Unexpected results

- Inadequate incubation and/or buffer/reagent temperatures.
- PCR contamination (verify using a negative control).
- Contamination of adjacent channels owing to the transfer of liquid from one channel to another when adding the hybridization buffer.

The working temperature range during the hybridisation process was evaluated with two thermoshakers (PST 60HL and Profiblot).

In the case of the Profiblot, the optimal working temperature range is between 42-43 °C.

The optimal working temperature range in the PST 60 HL is between 42-44 °C.

The probe most sensitive to temperature changes is the 6AC probe, for which reduction in working temperature could affect its specificity. The use of temperatures above those indicated could affect the sensitivity of the kit.

SENSITIVITY

We define **the limit of detection** of the kit as the minimum amount of DNA/RNA that can be detected with the test.

We define **the test limit** as the minimum amount of DNA/RNA that we can always genotype or always detect with the test.

Both limits have been determined for each one of the serotypes detected with the S. PneumoStrip kit. For this, 1/10 serial dilutions of DNA were analysed from each one of them, with three different product batches.

The sensitivity results obtained are shown in the following table:

Serotype	Limit of detection (ng/μl)	Serotype	Limit of detection (ng/μl)	S Serotype	Limit of detection (ng/μl)
1	0,0001	2	0,001	7B	0,0001
3	0,000001	8	0,0001	7C/40	0,0001
4	0,0001	9N/9L	0,00001	15A	0,00001
5	0,0001	10A	0,0001	15F	0,001
6A	0,0001	10B	0,0001	16F	0,0001
6B	0,0001	10F/C	0,0001	19B/19C	0,0001
6C	0,0001	11A/D	0,00001	21	0,0001
6D	0,0001	11B	0,0001	25A/25F	0,0001

Serotype	Limit of detection (ng/μl)	Serotype	Limit of detection (ng/μl)	S Serotype	Limit of detection (ng/μl)
7F/7A	0,0001	11C	0,0001	38	0,0001
9V/9A	0,0001	11F	0,00001	24A	0,00001
14	0,00001	12A/46	0,0001	24B/24F	0,0001
18A	0,0001	12B/12F/44	0,00001	31	0,0001
18B/18C	0,0001	12F	0,00001	32A/32F	0,0001
18F	0,00001	15B/15C	0,0001	33B/33D	0,0001
19A	0,0001	17F	0,00001	33C	0,0001
19F	0,00001	20	0,0001	35A	0,0001
23A	0,00001	22F/22A	0,00001	35C	0,0001
23B	0,0001	33F/33A	0,00001	35F	0,00001
23F	0,00001	37	0,00001	47F	0,00001
				41A	0,00001
				41F	0,00001

SPECIFICITY

The absence of reaction was checked with the following bacteria: *S. pseudoneumoniae*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *E. coli* ST131, *E. coli* O6, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catharralis*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus* (*mec A* + and *mec A* -).

HOOK EFFECT

The performance of *S. PneumoStrip* kit in the presence of increasing amounts of DNA (up to 100 ng) was evaluated. No PCR inhibition effect, or reduction in the intensity of the bands obtained, or problems arising from cross-reaction were observed. Therefore, there is no hook effect.

INTRA-ASSAY PRECISION

The intra-assay precision of *S. PneumoStrip* has been studied examining, first, 5 sensitivity curves (1/4 dilutions of a control DNA consisting of a mixture of DNA from all the serotypes detected by the kit) and on the other side, five replicates of 8 DNA samples positive for several serotypes.

Overall, the kit has shown a good intra-assay precision, obtaining the same serotyping for the samples and a similar sensitivity.

INTER-DAY PRECISION

The inter-day precision of *S. PneumoStrip* has been studied examining, first, a sensitivity curve (1/4 dilutions of a control DNA consisting of a mixture of DNA from all the serotypes detected by the kit) and on the other side, 8 real DNA samples. Each sensitivity curve was constructed by the same operator, using the same product lot and over five consecutive days.

Overall, the kit has shown a good inter-day precision, obtaining the same serotyping for the samples and a similar sensitivity.

INTER-LAB PRECISION

The inter-lab precision has been studied examining a sensitivity curve (1/4 dilutions of a control DNA consisting of a mixture of DNA from all the serotypes detected by the kit) and 8 real DNA samples. Each curve was constructed by a different operator, on the same day and using the same product lot. To vary the most of the conditions of use of the kit, each operator used a thermal cycler and different thermoshaker.

Overall, the kit has shown a good inter-lab precision, obtaining the same serotyping for the samples and a similar sensitivity.

INTER-LOT PRECISION

The inter-lot precision of S. PneumoStrip kit has been studied by the analysis using three different product lots of a sensitivity curve (1/4 dilutions of a control DNA consisting of a mixture of DNA from all the serotypes detected by the kit) and 25 DNA samples positive for some of the serotypes detected by the kit.

The kit has shown a good inter-lab precision. The results obtained for the 25 DNA samples were identical in all cases, and a similar sensitivity.

S. PneumoStrip

Test per l'identificazione di 42 sierotipi di *Streptococcus pneumoniae*

USO PREVISTO

Il test S. PneumoStrip è un test basato sulla tecnica del blot inverso che permette l'identificazione in base alla sequenza genetica, di 76 sierotipi di *S. pneumoniae*:

- Striscia A: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F/7A, 9A/9V, 14, 18A, 18B/18C, 18F, 19A, 19F, 23A, 23B, 23 F.
- Striscia B: 2, 8, 9N/9L, 10A, 10B, 10F/C, 11A/D, 11B, 11C, 11F, 12A/46, 12B/44, 12F, 15B/15C, 17F, 20, 22F/22A, 33F/33A, 37.
- Striscia C: 7B, 7C/40, 15A, 15F, 16F, 19B/19C, 21, 25A/25F, 38, 24A, 24B/24F, 31, 32A/32F, 33B/33D, 33C, 35A, 35C, 35F, 47F, 41A, 41F.

Dei 76 sierotipi, 42 vengono identificati individualmente e 34 a coppie (ad esempio, presenza dei sierotipi 7F o 7A).

Tra i sierotipi rilevati si annoverano i 23 inclusi nei diversi vaccini disponibili (7-valente, 10-valente, 13-valente e 23 -valente):

Vaccino	Sierotipi <i>S. pneumoniae</i>
PCV7	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F
PCV10	1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F
PCV13	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F
PCV23	1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F.

FONDAMENTO

Il kit S. PneumoStrip è basato sul principio dell'ibridazione inversa e permette il rilevamento e l'identificazione di 42 sierotipi di *S. pneumoniae* in campioni di DNA estratti da colture batteriche.

Le infezioni da *S. pneumoniae* rappresentano un importante problema di salute pubblica sia nei paesi industrializzati, sia in quelli meno sviluppati e sono caratterizzate da elevata morbilità e mortalità. Il batterio responsabile è infatti uno dei principali agenti eziologici di una grande varietà di quadri clinici, da infezioni benigne come otite media e sinusite acuta a infezioni gravi come setticemia, meningite e polmonite.

Una delle strutture più interessanti di questo batterio è la capsula di natura polisaccaridica complessa presente all'esterno della parete cellulare. Questa capsula protegge il batterio dalla fagocitosi ed è indispensabile per la sua virulenza. Di fatto, le varianti del batterio prive di capsula non sono generalmente virulente.

La composizione antigenica della capsula è variabile tra i diversi ceppi e permette di raggruppare gli esemplari di *S. pneumoniae* in oltre 100 differenti sierotipi capsulati e circa 45 sierogruppi. Si definiscono come appartenenti a uno stesso sierogruppo i sierotipi che presentano immunogenicità

crociata, per esempio 6A e 6B. L'identificazione di ciascun sierotipo viene eseguita utilizzando antisieri specifici, attraverso una reazione antigene-anticorpo che determina un rigonfiamento della capsula, fenomeno noto come "Quellung", termine che in tedesco significa appunto rigonfiamento.

La procedura del kit S. PneumoStrip kit prevede tre fasi: a) estrazione del DNA b) amplificazione tramite PCR e c) ibridazione/rivelazione.

a) Estrazione del DNA

Reagenti non inclusi nel kit.

È possibile adoperare qualsiasi protocollo standard di purificazione del DNA, compresa l'estrazione rapida di DNA da colonie mediante bollitura (vedere il punto "CAMPIONI").

b) Amplificazione tramite PCR

Nel kit S. PneumoStrip sono inclusi i reagenti necessari per eseguire l'amplificazione di sequenze genetiche specifiche dei sierotipi rilevabili con il kit.

Per differenziare i diversi sierotipi di *S. pneumoniae* mediante PCR viene utilizzato il locus cps, che è responsabile della sintesi del capsido del batterio. Questo locus presenta un'organizzazione genetica comune in tutti i sierotipi: fiancheggiato da due geni conservati, dex B e aliA, comprende quattro geni iniziali con funzioni di regolazione e processamento (wzg, wzh, wzd e wze), che sono altamente conservati in quasi tutti i sierotipi, e una parte centrale contenente geni specifici del sierotipo (come wzy e wzx) che codificano proteine quali la polisaccaride sintetasi, la flippasi, varie glicosiltransferasi, ecc. Sono questi geni specifici quelli che vengono utilizzati per distinguere tra loro i diversi sierotipi.

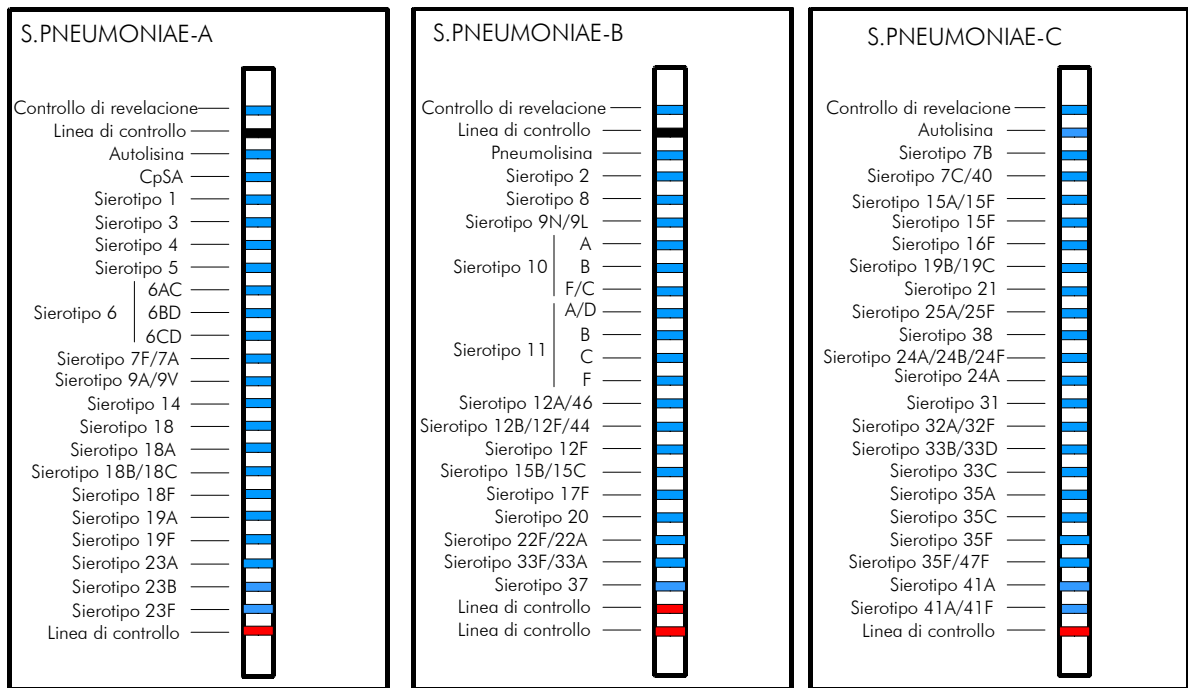
Durante la PCR avviene anche l'amplificazione di tre geni di controllo:

- La autolisina, codificata dal gene *lytA*, proteina necessaria per la patogenesi di *S. pneumoniae* e marcatore di virulenza molto ben caratterizzato, altamente conservato e che permette di distinguere il batterio da altre specie genotipicamente simili come *S. mitis* e *S. orale* (McAvin J. *et al.*, 2001).
- La pneumolisina, tossina di 53 kDa responsabile della formazione dei pori codificata dal gene *ply*, un'altra proteina fondamentale per la virulenza di *S. pneumoniae* presente in tutti i sierotipi descritti del batterio (Hirst R.A. *et al.*, 2004).
- Un gene del locus cps, CpSA, presente in tutti gli pneumococchi dotati di capsido. L'espressione di questo capsido è importante per la sopravvivenza del batterio nel sangue ed è fortemente associata con la capacità dello pneumococco di sviluppare un'infezione invasiva (Bentley S.D. *et al.*, 2006).

c) Ibridazione e rivelazione

In questa fase ha luogo il legame specifico tra i frammenti di DNA amplificati durante la PCR e una serie di sonde depositate su membrane di nylon.

Sulle membrane sono legate con legame covalente sonde specifiche per ciascun sierotipo rilevato, oltre a sonde per i geni di controllo (CpSA, *ply* e *lyt*), una sonda di controllo della rivelazione e due o tre linee, una nera e una o due rosse, per il controllo del posizionamento della striscia e come ausilio per l'interpretazione dei risultati (vedere la figura qui di seguito).



Il rilevamento dei frammenti ibridati con le diverse sonde si esegue utilizzando un coniugato (streptavidina-perossidasi) che si lega a una marcatura di biotina incorporata durante la PCR nei frammenti di DNA amplificato. Dopo l'aggiunta di un substrato della perossidasi (TMB), si genera un precipitato di colore blu nei siti in cui è avvenuta l'ibridazione. Come risultato finale del test si ottiene un pattern di bande da interpretare con l'ausilio della striscia di controllo.

MATERIALI INCLUSI NEL KIT

S. PneumoStrip		Kit 16 tests	
	Membrane	STRIPS	16 + 16 + 16 tests
	Vaschetta 8 canali	PL	6
Reagenti per PCR REAG PCR	PCR Mix	REAG PCR MIX	0,8 ml
	Primers	REAG PRIMER	0,06 + 0,06 + 0,06 ml
	Taq	REAG TAQ HS	0,030 ml
	Denaturante	SOLN DN	1 ml
	Tampone di ibridazione	BUF HYB	125 ml
	Tampone di lavaggio 1	BUF WASH 1	250 ml
	Coniugato	CONJ HRP	125 ml
	Tampone di lavaggio 2	BUF WASH 2	350 ml
	Substrato	SUBS TMB	65 ml
	Istruzioni d'uso		1
	Schema per l'interpretazione		1 + 1 + 1

MATERIALI NON INCLUSI NEL KIT

Per l'uso del kit sono necessari, inoltre, i seguenti materiali:

1. Microprovette per PCR.
2. Micropipette e punte per micropipette (sterili o irradiate con UV e, preferibilmente, con filtro).
3. Pinzette e matita (opzionale).
4. Cronometro.
5. Termometro.

APPARECCHI NECESSARI PER LO SVILUPPO DEL KIT

1. Termociclatore
Sono stati testati con successo i termociclatori qui di seguito: 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems), SimpliAmp Thermal cycler (Applied Biosystems), MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad), Mastercycler Personal (Eppendorf), S1000 Thermal Cycler (BioRad).
2. Termomixer
Il kit è stato validato con i termoagitatori: PST-60HL (Biosan S.L.), Profiblot T30 e T48 (Tecan), Autoblot 3000H (medTEC), TENDIGO (Fujirebio), Dynablot Heat (Dynex).
3. BLOTrix S1 or BLOTrix R2 scanner (BioSciTec, opzionale).

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso *in vitro*.
2. Seguire rigorosamente le istruzioni fornite. La modifica di qualsiasi **punto della procedura o temperatura** può compromettere i risultati del test.
3. È essenziale che tutti i materiali utilizzati siano liberi di DNase. Si consiglia di utilizzare puntali di pipette con filtro nella preparazione di PCR, per evitare problemi di contaminazione per formazione di aerosol. Seguire tutte le normali precauzioni necessarie per l'amplificazione del DNA. Utilizzare materiali autoclavato per il processo di ibridazione / rilevazione.
4. Conservare i componenti del kit nelle condizioni indicate.
5. Non scambiare componenti di kit con diverso numero di lotto.
6. Non utilizzare i componenti del kit dopo la data di scadenza.
7. Le strisce reattive sono monouso.
8. La vaschetta in dotazione sono monouso.
9. Ogni canale dei vassoi in dotazione è per una sola striscia.
10. In caso di rottura della confezione, è possibile utilizzare il prodotto sempreché nessuno dei componenti risulti danneggiato.
11. Il prodotto usato deve essere smaltito in conformità con la legislazione vigente.
12. I campioni dei pazienti devono sempre essere considerati come potenzialmente infettivi. Osservare tutte le norme ambientali e di sicurezza.
13. È opportuno che la striscia viene manipolato volta aver utilizzato le stesse considerazioni con il campione. Si raccomanda di gestirlo come materiale potenzialmente pericolosa.
14. La soluzione di denaturazione contiene < 2% di NaOH ed è irritante per gli occhi e per la pelle (H314 e P280, P305, P351, P338, P310).
15. Non gettare il box esterno del kit fino a quando il suo contenuto è stato completamente utilizzato. Il box esterno contiene le informazioni essenziali per la marcatura CE e per le lotti di componenti.

CONSERVAZIONE

Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C. A causa della conservazione a 2-8 °C, in alcune delle soluzioni (tampone di ibridazione, tamponi di lavaggio 1 e 2, coniugati) potrebbero formarsi dei precipitati. Tali precipitati si ridisciolgono durante il riscaldamento a temperatura ambiente (coniugato) o a 42 °C (tampone di ibridazione e tamponi di lavaggio 1 e 2).

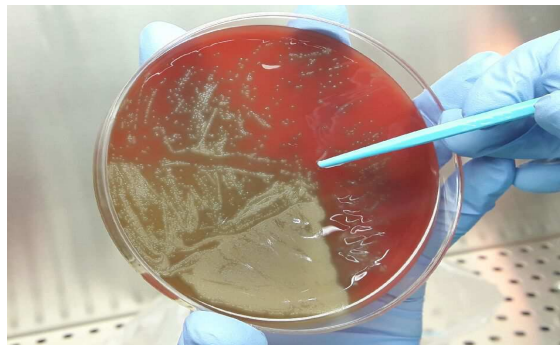
La data di scadenza di tutti i reagenti è indicata sull'etichetta.

CAMPIONI

Il test è stato progettato e collaudato per l'uso con DNA ottenuto da coltura batterica (per esempio, Agar sangue).

Di seguito sono indicate alcune delle procedure di estrazione del DNA testate con risultati soddisfacenti con il kit S. PneumoStrip:

- Estrazione del DNA mediante particelle magnetiche (NucliSENS easyMAG; BioMérieux). Diluizione di DNA a 1 ng/ μ l.
- Estrazione del DNA con resine di silice. (QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen). Diluizione di DNA a 1 ng/ μ l.
- Estrazione rapida del DNA mediante lisi in tampone TE: una colonia isolata o l'equivalente di coltura viene introdotto in una provetta con 50 μ l di tampone TE per PCR. Viene riscaldato a 100 °C durante 15 minuti e centrifugato per 2 min a 14.000 rpm. Vengono amplificati 5 μ l del surnatante.



Se i campioni di DNA verranno analizzati in breve tempo, conservarli a 2-8 °C; per una conservazione prolungata mantenerli a -20 °C.

PROCEDURA S. PNEUMOSTRIP

1.- Reazione a catena della polimerasi

Preparazione delle PCR

Importante: prima di aprire i flaconi con i reagenti PCR, centrifugare brevemente. Questo assicurerà che tutto il contenuto sarà al fondo del flacone.

- Preparare le provette per PCR necessarie in base al numero di campioni di DNA da amplificare.
- Aggiungere in ciascuna provetta per PCR: 36,5 μ l di premix di PCR + 2,5 μ l di primer A + 2,5 μ l di primer B + 2,5 μ l di primer C + 1 μ l di Taq + 5 μ l di ADN (1 ng/ μ l). Mescolare bene. Se possibile, mantenere i reagenti e le mix a 2-8 °C durante la preparazione. In caso di amplificazione di più campioni di DNA, si consiglia di preparare una mix comune contenente tutti i reagenti, in modo da aggiungere poi 45 μ l di mix + 5 μ l di DNA. Ad esempio:

N° di PCRs	Premix di PCR	Primers A	Primers B	Primers C	Taq
1	36,5 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l	1 μ l
3	146 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	4 μ l
5	219 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l	6 μ l
8	328,5 μ l	22,5 μ l	22,5 μ l	22,5 μ l	9 μ l

* Le mix contenenti tutti i reagenti per la PCR devono essere preparate sempre in eccesso, per compensare le perdite di volume che si verificano durante la pipettatura.

Secondo la buona pratica di laboratorio, l'utente deve inoltre amplificare un controllo negativo (acqua o tampone TE, per esempio) e, se necessario, un controllo positivo (non incluso nel kit).

Amplificazione

Inserire le provette nel termociclatore (se necessario, aggiungere 1 goccia di olio Nujol su ogni reazione di PCR) e amplificare il DNA con il seguente programma:

96 °C, 5 min
40 cicli di: 96 °C, 15 seg
 58 °C, 1 min
 72 °C, 30 seg
72 °C, 10 min
4 °C

Una volta terminata la PCR, continuare con lo sviluppo della striscia. Se i campioni non vengono analizzati immediatamente, conservarli a 2-8 °C per non più di 24 ore. In caso di conservazione prolungata, congelarli a -20 °C.

→ Vedere le schema di preparazione della PCR nell'allegato

2.- Sviluppo della striscia

Su richiesta, l'azienda fornirà all'utente la procedura di lavoro dependendo dello strumento che verrà utilizzato per lo sviluppo delle strisce (PST-60HL, Profiblot, Tendigo, Autoblot 3000H o Dynablot Heat). In alternativa, è possibile consultare il seguente indirizzo web:

<https://operon.es/products-protocols/>

Ogni PCR sarà analizzata con 3 strisce: striscia A, striscia B e striscia striscia C. I reagenti e procedura da seguire sono comuni. Per la procedura di denaturazione verranno utilizzati **12,5 µl di denaturante + 12,5 µl di PCR** per striscia.

Il prodotto è stato testato con diverse piattaforme di lavoro. Per vostra informazione si specificano i nomi commerciali delle piattaforme di lavoro utilizzate ma non implica l'uso esclusivo e dipendente di tali marchi commerciale. Il prodotto funziona correttamente durante l'utilizzo di una piattaforma che garantisce il programma di temperatura sollevata per il prodotto.

→ Vedere il sviluppo della striscia nell'allegato

3.- Interpretazione della striscia

Interpretazione della striscia può essere fatta visivamente, usando il schema per l'interpretazione incluso nel kit (vedere la procedure per ogni strumento) o automaticamente, utilizzando gli scanner BLOTriX R2 o BLOTriX S1 (BioSciTec).

Su richiesta, l'azienda fornirà all'utente le istruzioni per l'interpretazione automatica delle strisce con scanner (DO-09053002 "Instructions of use BLOTriX R2_S1"). In alternativa, è possibile consultare il seguente indirizzo web:

<https://operon.es/products-protocols/>

Importante: l'interpretazione automatica del risultato richiede sempre una verifica visiva delle strisce; bande molto deboli non potrebbero essere rilevate dallo strumento.

RISULTATI

Il kit S. PneumoStrip permette di rilevare ed eseguire la genotipizzazione di 76 più frequenti sierotipi di *S. pneumoniae*:

- Striscia A: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F/7A, 9A/9V, 14, 18A, 18B/18C, 18F, 19A, 19F, 23 F.

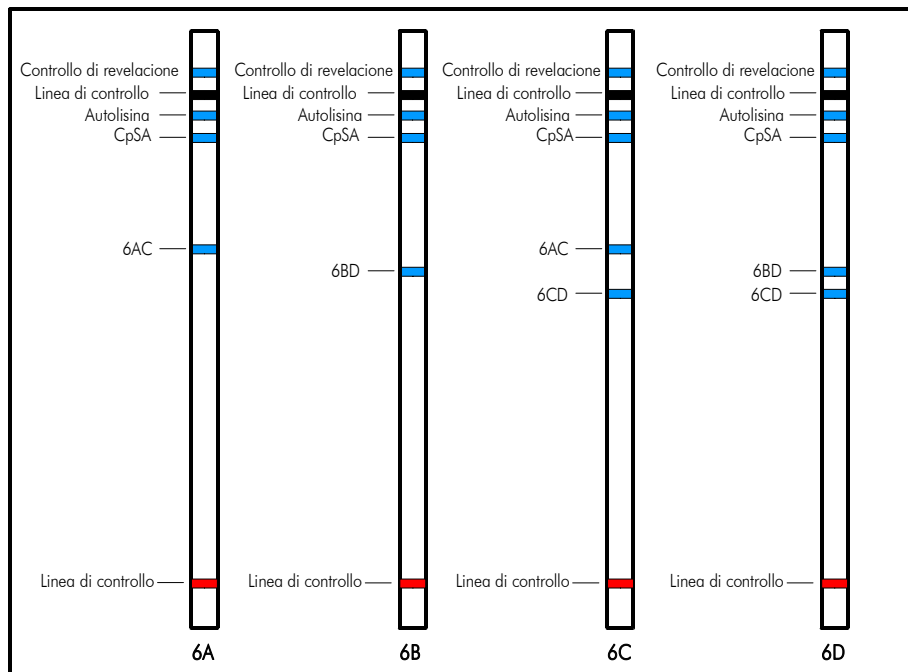
- Striscia B: 2, 8, 9N/9L, 10A, 10B, 10F/C, 11A/D, 11B, 11C, 11F, 12F, 15B/15C, 17F, 20, 22F/22A, 33F/33A.
- Striscia C: 7B, 7C/40, 15A, 15F, 16F, 19B/19C, 21, 25A/25F, 38, 24A, 24B/24F, 31, 32A/32F, 33B/33D, 33C, 35A, 35C, 35F, 47F, 41A, 41F.

Un campione di DNA potrà dare come risultato:

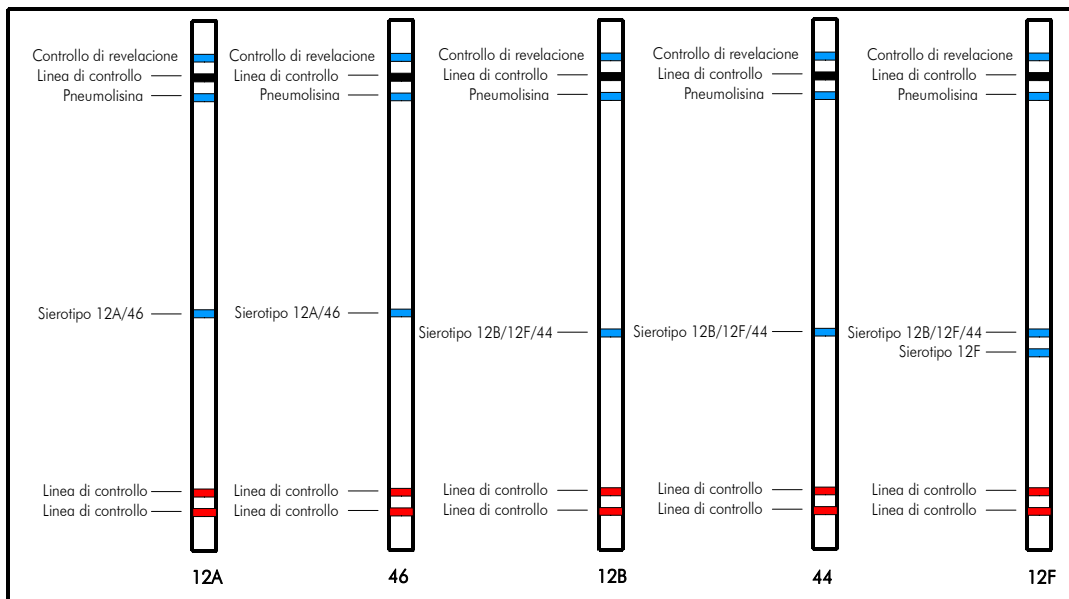
- Nessuna banda: il batterio non è identificato come *S. pneumoniae*. In questi casi è importante verificare che la PCR abbia funzionato correttamente (risultato positivo nel campione di controllo).
- Solo le bande corrispondenti ai geni di controllo: il batterio è *S. pneumoniae*, ma il sierotipo non corrisponde a nessuno di quelli rilevabili con il kit. In questi casi, saranno rilevate le bande corrispondenti ai geni *lyt* e *ply*, mentre la banda associata al gene *CpSA* potrà essere presente o meno (a seconda che si tratti di un batterio capsulato o non capsulato).
Attenzione: sierotipi 25A, 25F e 38, indipendentemente dal fatto che siano acapsulados o non sono, non mostrano la banda corrispondente al gene *CPSA* per la presenza di mutazioni e delezioni che impediscono l'amplificazione detto gene (Leung M. et al 2012.).
- La banda di controllo e una banda associata a un determinato tipo di *S. pneumoniae*: campione positivo per quel determinato. Il gene *CpSA* potrà essere presente o meno a seconda che si tratti di un campione capsulato o non capsulato.
- La banda di controllo e varie bande associate a diversi: campione positivo con multipla sierotipi.

Ciascun sierotipo viene identificato mediante una banda (oltre a quelle di controllo) ad eccezione di:

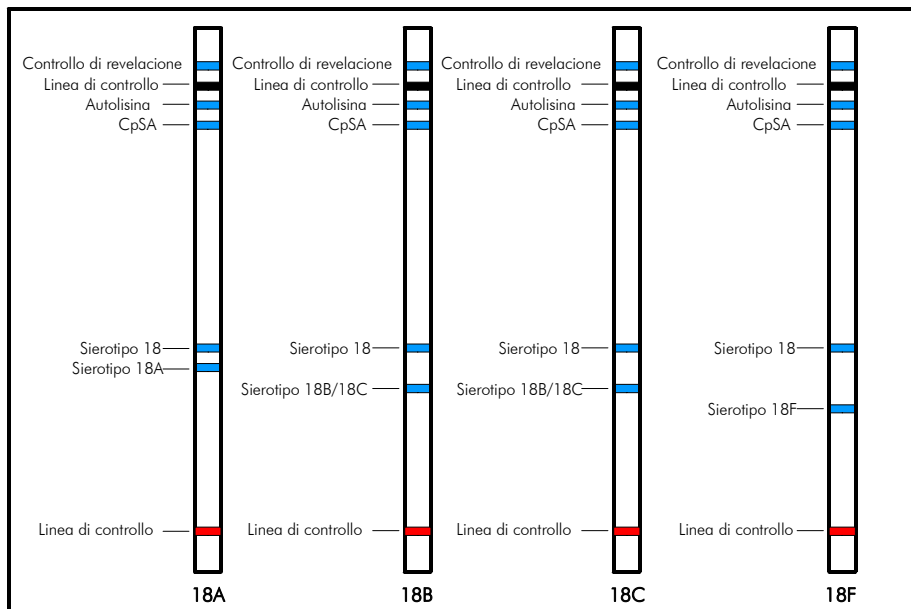
- Sierotipi del gruppo 6: l'identificazione dei sierotipi 6A, 6B, 6C e 6D avviene mediante una combinazione di tre bande (6AC, 6BD e 6CD). Se il campione corrisponde a un sierotipo 6A, comparirà la banda 6AC, se il campione corrisponde a un sierotipo 6B, comparirà la banda 6BD, se il campione corrisponde a un sierotipo 6C, compariranno le bande 6AC e 6CD, e se un campione corrisponde a un sierotipo 6D, compariranno le bande 6BD e 6CD.



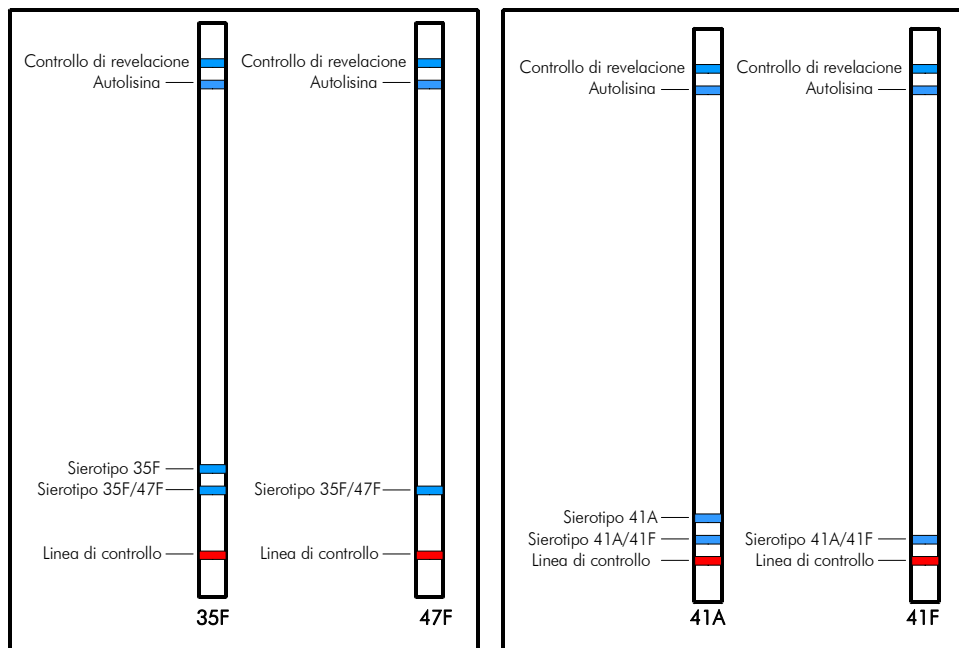
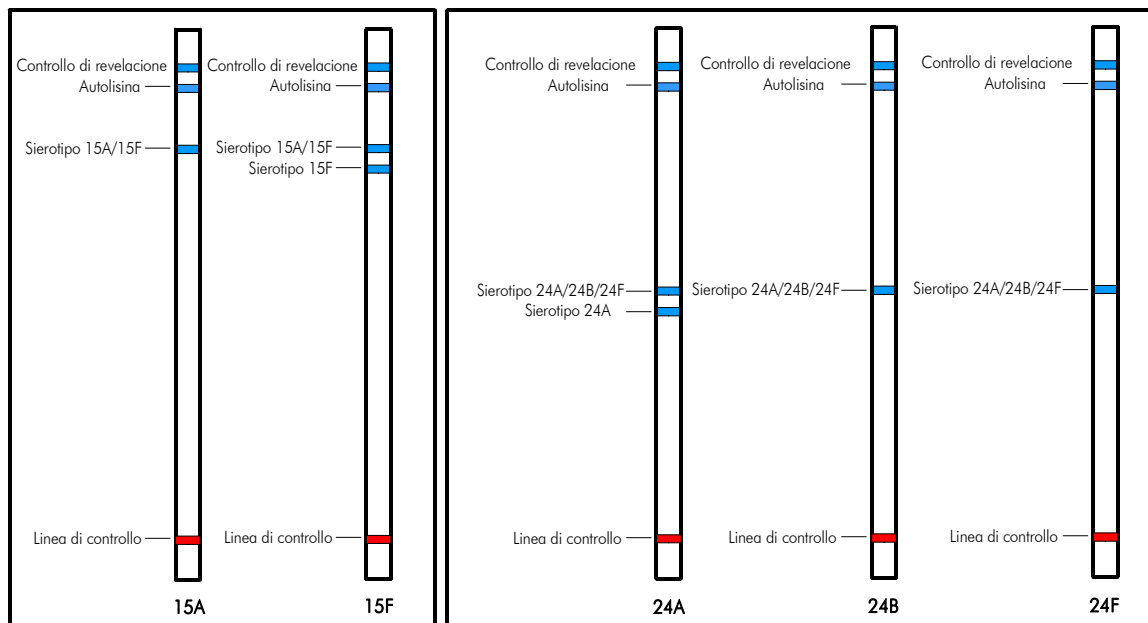
- Sierotipi del gruppo 12: l'identificazione dei sierotipi del gruppo 12 avviene mediante una combinazione di tre bande 12A/46, 12B/44 y 12F.



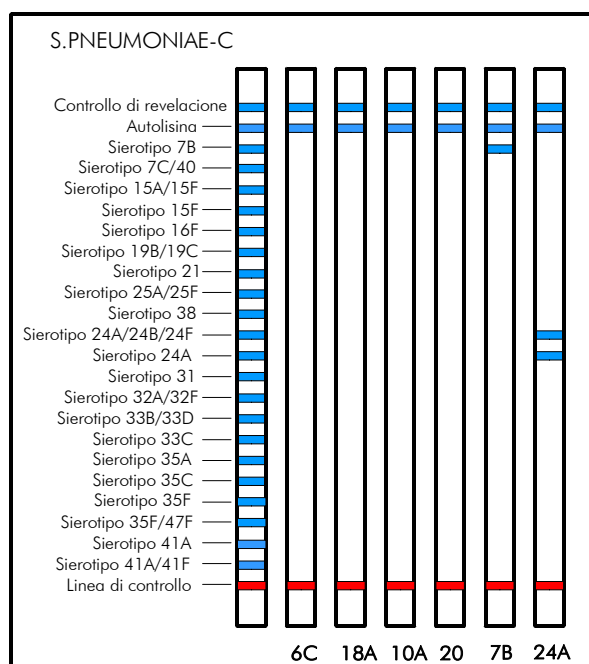
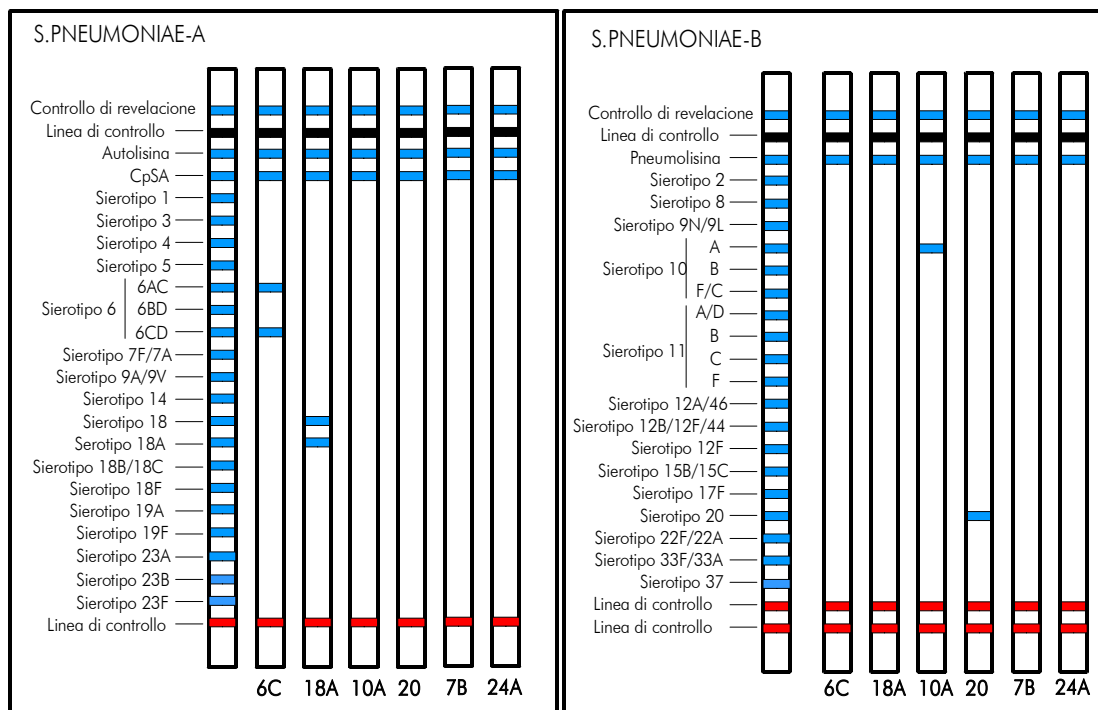
- Sierotipi del gruppo 18: l'identificazione dei sierotipi 18A, 18B/C e 18F avviene mediante una combinazione di due bande (la banda del sierotipo 18, comune a tutti i sottotipi, e la banda corrispondente a ciascun sottotipo particolare). La presenza della prima banda (sierotipo 18) senza la banda associata a un sottotipo indica la presenza di una mutazione nella zona di unione delle sonde. In questi casi, viene confermata la presenza di un sierotipo 18, ma non è possibile identificare il sottotipo a cui appartiene.



- Sierotipi 15A e 15F; 24A, 24B e 24F; 35F e 47 F, 41A e 41F: avviene mediante una combinazione di due bande, una banda comune ai due sierotipi e una banda specifica di uno dei sierotipi.



Altri esempi di sierotipizzazione utilizzando strisce di S. PneumoStrip



CONTROLLO DI QUALITÀ

La linea di controllo della rivelazione deve comparire sempre (sopra della linea nera superiore nel strisce A e B). La sua eventuale assenza indicherà un problema nella fase di ibridazione/rivelazione del prodotto.

La strisce corrispondente al controllo de amplificazione negativo mostrerà soltanto la banda di controllo di rivelazione.

La striscia corrispondente al controllo positivo dell'amplificazione presenterà le bande associate al sierotipo presente nel campione.

PRESTAZIONI / VALUTAZIONI INTERNE ED ESTERNE

Questo test deve essere utilizzato esclusivamente da professionisti qualificati e familiarizzati con i metodi di biologia molecolare.

Il funzionamento del test è stato comprovato con numerosi campioni di DNA provenienti da diverso sierotipi di *S. pneumoniae*.

• Valutazione 1

Eseguito dal Dr. José María Marimón nel Dipartimento di Microbiologia dell'Ospedale Universitario di Donostia (San Sebastián).

Sono stati analizzati 129 campioni di DNA ottenuti da:

a) 84 ceppi di riferimento: estrazione del DNA da colture su piastra utilizzando il sistema di estrazione automatico Nuclisens EasyMag (BioMerieux).

b) 45 campioni provenienti dall'attività di routine del laboratorio di microbiologia dell'Ospedale Universitario di Donostia. Estrazione del DNA da colture su piastra mediante bollitura.

Come test di riferimento sono state utilizzate l'analisi di frammenti e la tecnica di Quellung, seguendo la procedura descritta di seguito:

a) Tutti i campioni vengono analizzati con il kit S. PneumoStrip e con il metodo di sierotipizzazione mediante analisi di frammenti utilizzato dal gruppo del Dr. Marimón nella routine diagnostica dell'Ospedale Universitario di Donostia. Questo metodo è basato sull'analisi di ampliconi ottenuti in una PCR multiplex mediante elettroforesi capillare, come descritto in Muñoz-Almagro C. *et al.*, 2014.

b) I sierotipi ottenuti con i metodi di PCR multiplex e le strisce S. PneumoStrip vengono verificati mediante la tecnica di Quellung.

La concordanza globale ottenuta tra i tre metodi di sierotipizzazione è stata del 99,2% (128/129 campioni). La concordanza di sierotipizzazione con i ceppi di riferimento è stata del 100% e la concordanza di sierotipizzazione con i campioni provenienti dall'attività di routine è stata del 97,8%, con il rilevamento del 93,3% dei sierotipi presenti in tale gruppo di campioni (che riflettono la prevalenza nella zona di provenienza).

• Valutazione 2

Eseguito presso Operon S.A. (Saragozza, Spagna).

È stato valutato un totale di 113 campioni di DNA, previamente caratterizzati mediante analisi di frammenti (PCR multiplex + analisi di frammenti in sequenziatore) e Quellung. Per lo studio sono stati utilizzati sia ceppi di riferimento (CDC e SSI), sia ceppi da campioni diagnostici (ottenuti da campioni provenienti dalla routine diagnostica dell'Ospedale Universitario di Donostia).

I ceppi di riferimento sono stati sottoposti a sierotipizzazione mediante la tecnica di Quellung e il sistema di PCR multiplex utilizzato routinariamente nel Dipartimento di Microbiologia dell'ospedale.

I ceppi da campioni diagnostici sono stati sottoposti a sierotipizzazione mediante la tecnica di Quellung (gruppi 11, 10, 18) e/o il sistema di PCR multiplex dell'ospedale.

La percentuale di concordanza tra i metodi è stata del 100%.

POSSIBILI PROBLEMI

1. Sulla striscia non compare alcuna banda, nemmeno quella di controllo.

- Non si è atteso che il coniugato e/o il rivelatore raggiungessero la temperatura ambiente.
- Il coniugato e/o il rivelatore non sono stati aggiunti o sono stati aggiunti in quantità insufficiente.

2. Compare solo la linea della sonda di controllo.

- Errore di amplificazione nella PCR (eseguire un controllo su gel di agarosio).
- Durante la fase di ibridazione il prodotto di PCR non è stato aggiunto o è stato aggiunto in quantità insufficiente.
- Temperatura non corretta del tampone di ibridazione/lavaggio 1 (superiore a quella indicata).
- Temperatura non corretta dell'incubatore (superiore a quella indicata).

3. Forte colore di fondo sulla striscia dopo la fase di rivelazione.

- La procedura di lavaggio non è stata eseguita correttamente (durata troppo breve, quantità di tampone insufficiente, tamponi freddi).

4. Colorazione non omogenea della striscia

- Agitazione inadeguata (controllare la programmazione del termomixer per piastre).
- Le strisce non sono rimaste completamente sommerse durante le incubazioni.

5. Risultati inattesi

- Temperatura di incubazione e/o dei tamponi/reagenti non corretta
- Contaminazione nelle PCR (verificare con un controllo negativo).
- Contaminazione di canali adiacenti dovuta al passaggio di liquido da un canale all'altro durante l'aggiunta del tampone di ibridazione.

È stato valutato l'intervallo di temperatura operativa durante il processo di ibridazione con due termomixer (PST 60HL e Profiblot).

Nel caso del Profiblot, l'intervallo ottimale di temperatura operativa corrisponde a 42-43 °C.

L'intervallo ottimale di temperatura operativa con il PST 60 HL è di 42-44 °C.

La sonda più sensibile alle variazioni di temperatura è la sonda 6AC; una riduzione della temperatura operativa potrebbe influire sulla sua specificità. L'uso di temperature superiori a quelle indicate potrebbe influire sulla sensibilità del kit.

SENSIBILITÀ

Si definisce **limite di rilevamento** del kit la quantità minima di DNA/RNA rilevabile con il test.

Entrambi i limiti sono stati determinati per ciascuno dei sierotipi rilevabili con il kit S. PneumoStrip. A tal fine, sono state analizzate diluizioni seriali 1/10 del DNA di ciascuno di essi con tre lotti diversi del prodotto.

I risultati di sensibilità ottenuti sono riportati nella tabella seguente:

Sierotipo	Limite di rivelabilità (ng/μl)	Sierotipo	Limite di rivelabilità (ng/μl)	Sierotipo	Limite di rivelabilità (ng/μl)
1	0,0001	2	0,001	7B	0,0001
3	0,000001	8	0,0001	7C/40	0,0001
4	0,0001	9N/9L	0,00001	15A	0,00001
5	0,0001	10A	0,0001	15F	0,001
6A	0,0001	10B	0,0001	16F	0,0001
6B	0,0001	10F/C	0,0001	19B/19C	0,0001
6C	0,0001	11A/D	0,00001	21	0,0001
6D	0,0001	11B	0,0001	25A/25F	0,0001
7F/7A	0,0001	11C	0,0001	38	0,0001
9V/9A	0,0001	11F	0,00001	24A	0,00001

Sierotipo	Limite di rivelabilità (ng/μl)	Sierotipo	Limite di rivelabilità (ng/μl)	Sierotipo	Limite di rivelabilità (ng/μl)
14	0,00001	12A/46	0,0001	24B/24F	0,0001
18A	0,0001	12B/12F/44	0,00001	31	0,0001
18B/18C	0,0001	12F	0,00001	32A/32F	0,0001
18F	0,00001	15B/15C	0,0001	33B/33D	0,0001
19A	0,0001	17F	0,00001	33C	0,0001
19F	0,00001	20	0,0001	35A	0,0001
23A	0,00001	22F/22A	0,00001	35C	0,0001
23B	0,0001	33F/33A	0,00001	35F	0,00001
23F	0,00001	37	0,00001	47F	0,00001
				41A	0,00001
				41F	0,00001

SPECIFICITÀ

È stato provato che non esiste reazione crociata con i patogeni riportati nella tabella seguente: *S. pseudoneumoniae*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *E. coli ST131*, *E. coli O6*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catharralis*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus* (*mec A + e mec A -*).

EFFETTO HOOK

Il funzionamento del kit *S. PneumoStrip* è stato comprovato in presenza di quantità crescenti di DNA plasmidico (fino a 100 ng). Non sono stati osservati effetti di inibizione della PCR, né di riduzione dell'intensità delle bande ottenute, né comparsa di problemi di reazioni crociate. Non si verifica, pertanto, alcun effetto Hook.

PRECISIONE INTRASAGGIO

La precisione intrasaggio di *S. PneumoStrip* è stata studiata mediante l'analisi di, da un lato, 5 curve di sensibilità (diluizioni 1/4 di un DNA di controllo composto da una miscela di DNA di sierotipi rilevabili con il kit) e, dall'altro, cinque replicati di 8 campioni di DNA positivi per diversi sierotipi.

In generale, il kit *S. PneumoStrip* ha dimostrato una buona precisione intrasaggio, ottenendo lo stesso siero tipizzazione dei campioni e una sensibilità simile.

PRECISIONE INTERGIORNALIERA

La precisione intergiornaliera di *S. PneumoStrip* è stata studiata mediante l'analisi, da un lato, di un curve di sensibilità (diluizioni 1/4 di un DNA di controllo composto da una miscela di DNA di sierotipi rilevabili con il kit) e, dall'altro, di 8 campioni di DNA positivi per diversi sierotipi. Ogni curva di sensibilità è stata eseguita da una stessa persona, utilizzando lo stesso lotto di prodotto e in cinque giorni consecutivi.

In generale, il kit *S. PneumoStrip* ha dimostrato una buona precisione intergiornaliera, ottenendo lo stesso siero tipizzazione dei campioni e una sensibilità simile.

PRECISIONE INTERLABORATORIO

La precisione interlaboratorio è stata studiata mediante l'analisi di, da un lato, un curve di sensibilità (diluizioni 1/4 di un DNA di controllo composto da una miscela di DNA di sierotipi rilevabili con il kit) e, dall'altro, di 8 campioni di DNA positivi per diversi sierotipi. Ogni curva è stata realizzata da una persona diversa, nello stesso giorno e utilizzando lo stesso lotto di prodotto. Per variare la maggior parte delle condizioni di utilizzo del kit, ciascun operatore utilizzato un ciclatore termico e diverso termostatico.

In generale, il kit S. PneumoStrip ha dimostrato una buona precisione interlaboratorio, ottenendo lo stesso siero tipizzazione dei campioni e una sensibilità simile.

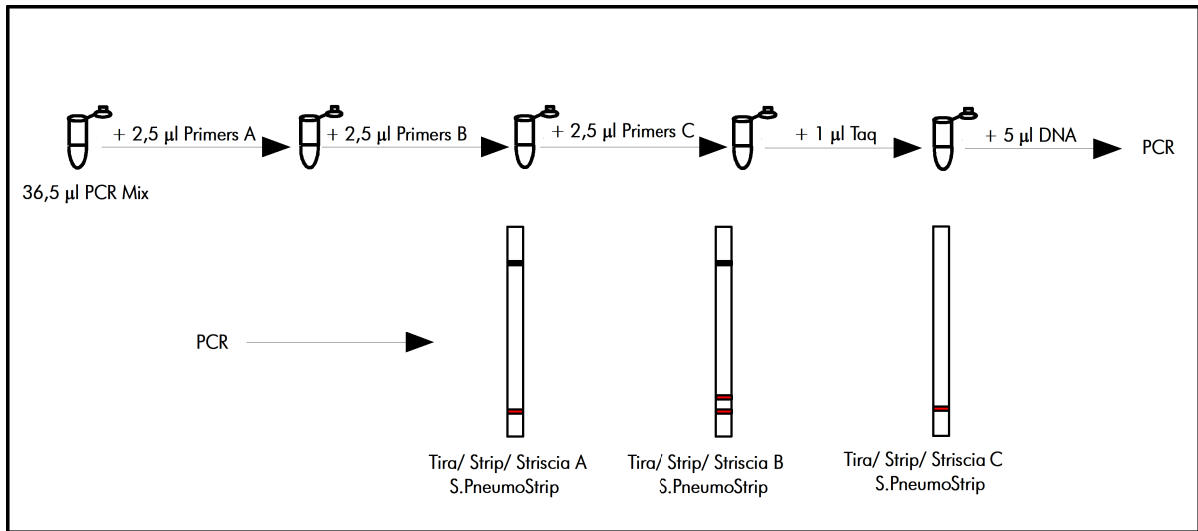
PRECISIONE INTERLOTTO

La precisione interlotto del kit S. PneumoStrip è stata studiata mediante l'analisi di, da un lato, un curve di sensibilità (diluizioni 1/4 di un DNA di controllo composto da una mistura di DNA di sierotipi rilevabili con il kit) e, dall'altro, di 25 campioni di DNA positivi per diversi sierotipi.

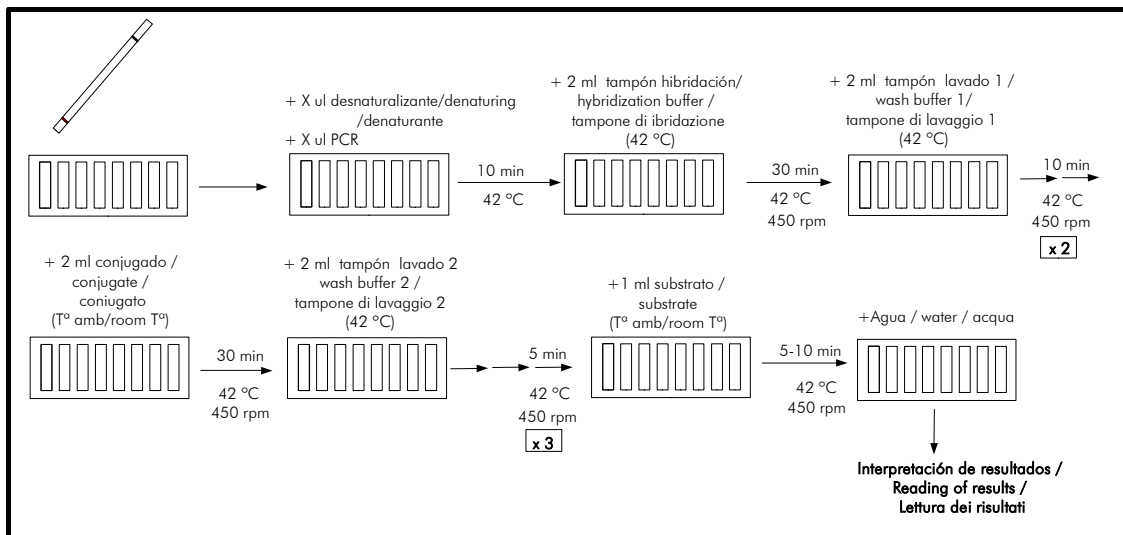
In generale, il kit S. PneumoStrip ha dimostrato una buona precisione interlotto, ottenendo lo stesso siero tipizzazione dei campioni e una sensibilità simile.

ANEXO / ANNEX / ALLEGATO

Esquema de preparación de PCR / PCR preparation diagram / Schema di preparazione della PCR



Desarrollo de la tira / Strip developing diagram / Sviluppo della striscia



BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY/ BIBLIOGRAFIA

1. Bentley S.D. et al. "Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes". PLOS Genetics (2006). Vol 2 (3): 262-269.
2. Hirst R.A. et al. "The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis". Clin. Exp. Immunol. (2004). Vol 138: 195-201.
3. Huo Z, Spencer O, Miles J, Johnson J, Holliman R, Sheldon J, et al. Antibody response to pneumolysin and to pneumococcal capsular polysaccharide in healthy individuals and *Streptococcus pneumoniae* infected patients. Vaccine. 2004; 22:1157-61.
4. Leung M, Bryson K, Freystatter K, Pichon B, Edwards G, Charalambous B, Gillespie S. "Sequotyping: Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by a single sequencing strategy". J.Clin.Microbiol (2012). Vol 50, N° 7: 2419-2427.
5. McAvin J. et al. "Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real time PCR". J.Clin.Microbiol (2001). Vol 39, N° 10: 3446-3451.
6. Muñoz-Almagro C. et al. "Direct identification of *Streptococcus pneumoniae* capsular types in pleural fluids by using multiplex PCR combined with automated fluorescence-based capillary electrophoresis". Journal of Clinical Microbiology (2014), vol 52, n° 7, pags. 2736-2737.
7. Wasserman RL, Sorensen R. Evaluating children with respiratory tract infections: the role of immunization with bacterial polysaccharide vaccine. Pediatr Infect Dis J. 1999; 18:157-163.



Fecha de caducidad / Expiration date / Data di scadenza



Número de lote / Lot number / Numero di lotto



Uso diagnóstico in vitro / For in vitro diagnostic use / Per uso diagnostico in vitro

Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/EC sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical device / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE relativa a dispositivi medico-diagnostici in vitro.



Número de catálogo / Catalogue number / Numero di catalogo



Leer instrucciones de uso / Please read pack inserts / Leggere le istruzioni d'uso



Fabricado por / Manufactured by / Prodotto da



Contenido suficiente para <n> ensayos / Contents sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per <n> saggi



Conservar a / Store at / Conservare a




Precaución / Caution / Precauzione



Reactivo corrosivo / Corrosive reagent / Reagente corrosivo



DO-09051026 Rev. 5- 25-10-2018

 OPERON, S.A. - Camino del Plano, 19 - E-50410 Cuarte de Huerva - (Zaragoza) – SPAIN
+ 34 976 503597
