

IMPIEGO PREVISTO

Il plasma per coagulasi di coniglio è un plasma standardizzato, liofilizzato di coniglio usato per il rilevamento qualitativo dell'enzima della coagulasi prodotto dallo *Staphylococcus aureus*.

INTRODUZIONE E OBIETTIVO DEL TEST

La differenziazione dello *Staphylococcus aureus* dalle specie coagulasi-negative, tra cui lo *Staphylococcus epidermidis* o *Staphylococcus saprophyticus*, è di importanza fondamentale non solo perché lo *Staphylococcus* costituisce un rischio per la salute di primaria importanza, ma anche perché queste ultime specie sono sempre più associate a setticemia, endocardite batterica, colonizzazione di protesi ed infezioni del tratto urinario. L'identificazione degli Stafilococchi si basa sulla morfologia delle colonie, sulle caratteristiche colturali e biochimiche e sull'esame microscopico. Tuttavia, rilevare la coagulasi è il criterio più ampiamente utilizzato per la differenziazione delle specie¹. La capacità dello *Staphylococcus* di produrre coagulasi, un enzima capace di coagulare il plasma, fu riferita per la prima volta da Loeb nel 1903². Da allora, molti ricercatori hanno cercato di correlare la produzione di coagulasi con la patogenicità degli Stafilococchi. Chapman, Berens, Nilson e Curcio, in uno studio sulla produzione della coagulasi e dell'emolisina da parte dello Stafilococco, dimostrarono che i ceppi che producevano la coagulasi in genere erano patogeni, indipendentemente dalle loro proprietà emolitiche o cromogene³. Studi più recenti hanno dimostrato che non è possibile affidare sulla capacità di uno stafilococco di produrre coagulasi per avere un'indicazione certa della sua patogenicità⁴.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Lo *Staphylococcus aureus* produce due tipi di coagulasi, libera e legata. La coagulasi libera è un enzima extracellulare prodotto quando l'organismo è cresciuto in brodocoltura. La coagulasi legata, nota anche come clumping factor, rimane attaccata alla parete cellulare dell'organismo.

Il test in provetta si esegue aggiungendo 2 - 4 colonie di isolato in una provetta contenente il plasma per coagulasi reidratato e incubando a 37°C per max. quattro ore. La formazione di un coagulo indica la produzione di coagulasi. Il test in provetta è il metodo usato più di frequente per la sua maggiore accuratezza dovuta alla sua capacità di rilevare sia la coagulasi libera che quella legata.

Il test su vetrino si esegue preparando una sospensione pesante dell'isolato in una goccia di soluzione salina su un vetrino di vetro pulito aggiungendo quindi una goccia di plasma. Miscelare delicatamente con un tampone e verificare la formazione di aggregati. Questo test è meno preciso di quello in provetta e richiede la conferma di tutti i test negativi con il test in provetta. Questo test rileva solo la coagulasi legata.

REAGENTI

Il plasma per coagulasi è plasma liofilizzato di coniglio al quale viene aggiunto EDTA come anti-coagulante. L'EDTA non è utilizzato dai batteri, pertanto non determinerà reazioni della coagulasi falso-positive con i batteri che utilizzano citrato⁵.

Il plasma per coagulasi di coniglio è disponibile in diversi formati:

Codice prodotto	Formato	Volume per ricostituzione	N. indicativo di test in provetta
PL.850-3	10 fiale / confezione	3 ml / fiala	6 x 10
PL.850-5	10 fiale / confezione	5 ml / fiala	10 x 10
PL.850-10	Fiala singola	10 ml / fiala	20
PL.850-20	Fiala singola	20 ml / fiala	40
PL.850-30	Fiala singola	30 ml / fiala	60

RICOSTITUZIONE

Ricostituire il plasma per coagulasi di coniglio aggiungendo nella fiala acqua sterile distillata o deionizzata nel volume indicato sull'etichetta del prodotto. Capovolgere delicatamente la fiala fin quando il prodotto non si sarà completamente disciolto. Se il prodotto non si scioglie completamente o se contiene coaguli o filamenti di fibrina non utilizzarlo.

MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

Acqua sterile distillata o deionizzata
 Anse per inoculazione
 Provette da 12 mm x 75 mm
 Pipette sterili da 1 ml
 Acqua per bagnomaria (37°C)
 Vetrini
 Ceppi di controllo positivi e negativi (fare riferimento a Controllo di qualità).

AVVERTENZE

1. Il plasma per coagulasi di coniglio è destinato esclusivamente ad uso diagnostico *in vitro*;
2. Non usare il reagente oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.
3. Al momento della manipolazione, elaborazione e smaltimento di tutti i campioni e reagenti clinici è necessario adottare precauzioni universali.
4. Il reagente contiene materiale di origine animale e deve pertanto essere manipolato come potenziale portatore e trasmettitore di malattie.
5. Per ottenere risultati attendibili, è necessario seguire scrupolosamente le procedure, condizioni di conservazione, precauzioni e limitazioni specificate nelle presenti istruzioni.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

1. Conservare le fiale chiuse non ricostituite a 2 - 8°C.
2. Conservare le fiale di plasma ricostituito a 2 - 8°C, o aliquotare in volumi da 0,5 ml, congelare prontamente e conservare a -20°C. Non scongelare e ricongelare.
3. Le fiale non aperte e non ricostituite resteranno stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta del prodotto a condizione che siano state conservate come indicato nelle istruzioni.
4. Il plasma ricostituito resterà stabile per cinque giorni se conservato a 2 - 8°C oppure per max. 30 giorni se aliquotato e conservato a -20°C, senza superare la data di scadenza indicata sull'etichetta.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

1. Verificare che l'isolato del test sia puro e che possieda le caratteristiche dello *Staphylococcus aureus* indicate di seguito:
 - adeguata morfologia sul mezzo di isolamento.
 - Cocchi gram positivi
 - Positivi alla catalasi.
2. Utilizzare 2 - 4 colonie (un tampone intero) dell'organismo da testare.

PROTOCOLLO DEL TEST
A. Test in provetta della coagulasi

1. Con l'impiego di una pipetta sterile da 1 ml, aggiungere 0,5 ml di plasma ricostituito ad una provetta da 12 mm x 75 mm.
2. Utilizzando un tampone sterile emulsionare 2 - 4 colonie dell'organismo da testare nel plasma.
3. Miscelare delicatamente.
4. Incubare a bagnomaria a 37°C per quattro ore.
5. Dopo 1 ora verificare l'eventuale formazione di coaguli inclinando delicatamente la provetta di lato. In assenza di evidente formazione di

coaguli controllare ogni 30 minuti fino ad un limite massimo di 4 ore.

6. In assenza di coaguli dopo 4 ore di incubazione, reincubare il test a temperatura ambiente per il periodo di tempo rimanente e verificare la formazione di coaguli dopo 24 ore. Non reincubare test che hanno già prodotto un coagulo dopo 4 ore poiché alcuni ceppi di *S. aureus* producono una fibrinolisinasi che potrebbe lisare i coaguli dopo un'ulteriore incubazione.
7. Registrare i risultati.

B. Test su vetrino della coagulasi

(Rileva la coagulasi legata o clumping factor)

1. Posizionare una di fianco all'altra una goccia di plasma ricostituito e una goccia di soluzione salina su un vetrino pulito.
2. Emulsionare un'ansa delle colonie da testare nella goccia di plasma e in quella di soluzione salina.
3. Osservare la presenza di aggregati per max. un minuto.
4. Registrare i risultati.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Per confermare la validità dei risultati del test usare parallelamente al test colture di controllo negative e positive.

Organismo	Risultato previsto Test in provetta	Risultato previsto Test su vetrino
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Formazione di coaguli	Formazione di aggregati
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Nessuna formazione di coaguli	Nessuna formazione di aggregati

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI
A. Test in provetta della coagulasi

- **Risultato positivo:** Coagulazione di qualsiasi grado del plasma per coagulasi osservata entro 24 ore.
- **Risultato negativo:** Nessuna coagulazione del plasma per coagulasi.

B. Test su vetrino della coagulasi

- **Risultato positivo:** Formazione macroscopica di aggregati nel plasma entro un minuto e nessun aggregato nella soluzione salina.
- **Risultato negativo:** Nessuna formazione di aggregati né nel plasma né nella soluzione salina.
- **Risultato non interpretabile:** In presenza di aggregati in entrambi i test, significa che l'isolato si è autoagglutinato e non è adatto al test di agglutinazione su vetrino. In questo caso è necessario testare l'isolato utilizzando il test in provetta della coagulasi.

LIMITI

1. Sebbene i test per la coagulasi in provetta e su vetrino presentino un'eccellente concordanza i test per la coagulasi su vetrino possono dare falsi negativi con altre specie stafilococche che producono il clumping factor. Queste comprendono ceppi di *S. lugdenensis* e di *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*.
2. Alcune specie o organismi utilizzano citrato per il loro metabolismo e possono produrre reazioni falso-positive per l'attività della coagulasi. Normalmente ciò non dovrebbe causare problemi, poiché il test della coagulasi viene eseguito quasi esclusivamente su Stafilococchi. Tuttavia, è possibile che i batteri che fanno uso di citrato contaminino le colture di *Staphylococcus* sulle quali è in corso il test della coagulasi e, dopo incubazione prolungata, potrebbero produrre risultati falso-positivi deri-



vanti dall'utilizzo del citrato. La presenza di EDTA nel plasma per coagulasi dovrebbe superare questo problema.






- Quando si controllano i risultati del test della coagulasi, le provette dovrebbero essere osservate ogni 30 minuti durante le prime quattro ore di incubazione. Alcuni ceppi di *Staphylococcus aureus* producono fibrinolisin che potrebbe lisare i coaguli formati in precedenza. Se le provette non vengono lette entro le 24 ore di incubazione, potrebbe verificarsi una reversione a risultati falso-negativi.

SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DEL KIT

Il plasma per coagulasi di coniglio Pro-Lab è stato analizzato utilizzando 30 ceppi di *S. aureus* e 30 ceppi di Stafilococchi coagulasi-negativi (2 *S. epidermidis*, 4 *S. warneri*, 2 *S. simulans*, 2 *S. hominus*, 2 *S. capitis*, 2 *S. cohnii*, 2 *S. auricularis*, 2 *S. xylosum*, 2 *S. sciuri*, 1 *S. oxford*, 3 *S. saprophyticus*, 1 *S. avium* e 5 *S. haemolyticus*). Il plasma per coagulasi di coniglio Pro-Lab ha identificato correttamente tutti i ceppi, a dimostrazione che il prodotto era caratterizzato da una sensibilità del 100% e una specificità del 100% nello studio.

BIBLIOGRAFIA

- Bannerman, T.L. and Peacock, S.J.** (2007). *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci*, In Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition. Edited by Murray, P.R., Baron, E.J., Landry, M.L., Tenover, J.C. and Tenover, J.C. American Society for Microbiology, Washington, D.C. page 390-411.
- Loeb, L. (1903)**. The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. J. Med. Res. 10:407-419.
- Chapman, G.H., Berens, C., Nilson, E.L. and Curcio, L.G.** (1938). The differentiation of pathogenic Staphylococci from non-pathogenic types. J. Bact. 35:311-333.
- Morton, H.E. and Cohn, J.** (1972). Coagulase and deoxyribonuclease activities of Staphylococci isolated from clinical sources. Applied Micro. 23-725-733.
- Baird-Parker, A.C.** (1974). *Staphylococcus* In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition. Edited by Williams and Wilkins. Baltimore. Page 484-489.

	= Produttore
	= Mandatario nella Comunità Europea
	= Dispositivo medico diagnostico in vitro
	= Limiti di temperatura
	= Per l'uso consultare le istruzioni

Le presenti istruzioni per l'uso sono state accuratamente tradotte dalla versione originale in lingua inglese. In caso di ambiguità o apparente discrepanza rivolgersi al servizio assistenza Pro-Lab.