



## STAPHYTECT PLUS

### ZATOSOWANIE

Staphytest Plus jest lateksowym testem aglutynacyjnym do różnicowania *Staphylococcus aureus* za pomocą wykrywania koagulazy związanej, białka A oraz otoczki polisacharydowej występującej u metycylinoopornych *Staphylococcus aureus* (MRSA) od innych gronkowców, które nie posiadają tych cech.

### ZASADA DZIAŁANIA

Tradycyjnie różnicowanie między koagulazo-dodatnimi oraz koagulazo-ujemnymi gronkowcami jest wykonywane zarówno za pomocą testu probówkowego, który wykrywa stafylokoagulazę wolną jak i testem szkiełkowym, który wykrywa koagulazę związaną (clumping factor) obecną na powierzchni komórek bakteryjnych. Dostępnych jest również szereg innych testów, w tym test na hemaglutynację bierną (Oxoid Staphylase – DR0595) oraz DNase test.

Doniesienia mówią, że około 97% szczepów ludzkich *Staphylococcus aureus* posiada obie koagulazy – wolną i związaną. Białko A wykrywane jest w około 95% ścian komórkowych tych szczepów i ma zdolność do wiązania frakcji Fc immunoglobuliny G (IgG)<sup>2</sup>. Obserwuje się, że większość szczepów metycylinoopornych *Staphylococcus aureus* (MRSA) może wytwarzać clumping factor i białko A na niewykrywalnym poziomie<sup>3,4,5</sup>. Jednakże, wszystkie te szczepy posiadają otoczkę polisacharydową<sup>6</sup>. Otoczka może maskować zarówno białko A jak i clumping factor, co uniemożliwia aglutynację. W teście Staphytest Plus zastosowano barwione na niebiesko cząsteczki lateksu opłaszczone fibrynogenem krwi ludzkiej oraz immunoglobuliną króliczą IgG, łącznie ze specyficznymi poliklonalnymi przeciwciałami wobec otoczek polisacharydowych *Staphylococcus aureus*<sup>7,8</sup>. Podczas mieszania na kartoniku testowym odczynnika lateksowego z koloniami *Staphylococcus aureus*, zachodzi szybka aglutynacja w wyniku reakcji między (i) fibrynogenem i clumping factor, (ii) frakcją Fc IgG i białkiem A, (iii) specyficznym IgG i otoczką polisacharydową. Aglutynacja może być widoczna również z innymi szczepami, które posiadają clumping factor lub białko A, takimi jak *Staphylococcus hyicus* i *Staphylococcus intermedius*. W przypadku, gdy zarówno clumping factor, białko A jak i specyficzna otoczka polisacharydowa jest nieobecna, aglutynacja nie zachodzi i wynik jest ujemny. Często spotykanymi izolatami gronkowców koagulazoujemnych nie mających białka A są szczepy *Staphylococcus epidermidis*.

### SKŁADNIKI TESTU DR0850M

#### DR0851M Staphytest Plus Test Reagent (5.6 ml)

Cząsteczki lateksu barwione na niebiesko, opłaszczone świńskim fibrynogenem i króliczym IgG razem ze specyficznymi poliklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciw otoczce polisacharydowej *S. aureus*.

Każda butelka zawiera odczynnik wystarczający na przeprowadzenie 100 testów.

#### DR0852M Staphytest Plus Control Reagent (5.6 ml)

Niebieskie, obojętne cząsteczki lateksu.

Każda butelka zawiera odczynnik wystarczający na przeprowadzenie 100 testów.

#### DR0500G kartoniki testowe

35 kartoników testowych

Instrukcja.

### MATERIAŁY WYMAGANE NIE BĘDĄCE W ZESTAWIE

Minutnik

Eza mikrobiologiczna

Dezynfektant

Kontrola dodatnia: szczep *Staphylococcus aureus* taki jak ATCC® 25923

Kontrola ujemna: szczep *Staphylococcus epidermidis* taki jak ATCC® 12228.

### OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Produkt przeznaczony tylko do diagnostyki in vitro.

Nie zamrażać.

Odczynniki zawierają jako konserwant 0.095% azydku sodu. Azydek sodu jest toksyczny i może reagować z ołowiem lub miedzią z rur kanalizacyjnych, wytwarzając azydki metali, które są wybuchowe. Dlatego, aby zapobiec gromadzeniu się azydków w rurach kanalizacyjnych, natychmiast po usunięciu odpadów spłukać je dużą ilością wody. Próbkę mogą zawierać organizmy patogenne i należy postępować z nimi zgodnie z odpowiednimi procedurami.

## PRZECHOWYWANIE

Test przechowywać w temperaturze 2–8°C z dala od światła słonecznego i bezpośredniego źródła ciepła. Nie zamrażać. Tak przechowywane odczynniki zachowają aktywność do daty ważności umieszczonej na opakowaniu testu.

## PROCEDURA KONTROLNA

Przy każdym użyciu testu należy przeprowadzić następującą procedurę kontrolną;

1. Kontrola dodatnia: Użyć znany szczep *Staphylococcus aureus*, taki jak ATCC®25923 . Postępować zgodnie z procedurą podaną w PROCEDURZE TESTU. Upewnić się, że aglutynacja pojawia się w ciągu 20 sekund.

2. Kontrola ujemna: Użyć znanego szczepu *Staphylococcus epidermidis*, taki jak ATCC®12228 . Postępować zgodnie z procedurą podaną w PROCEDURZE TESTU. Upewnić się, że odczynnik pozostaje gładki i bez aglutynacji w ciągu 20 sekund.

**Nie używać testu jeżeli reakcje ze szczepami są nieprawidłowe.**

## UWAGI

Nie zanieczyścić odczynnika lateksowego przez dotknięcie zakraplacza buteleczki do próbki naniesionej na kartonik testowy. Upewnić się po każdym użyciu, czy zakrętki są dobrze zamknięte, co zabezpiecza przed zanieczyszczeniem i wyschnięciem odczynnika.

Po użyciu wstawić zestaw ponownie do lodówki, upewniając się, czy buteleczki stoją w prawidłowej pozycji.

Upewnić się, czy pobrano wystarczającą ilość materiału z pożywki; niewystarczająca ilość materiału może dać fałszywie ujemne reakcje.

## POBIERANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

Pobieranie, przechowywanie i transport próbek powinien odbywać się zgodnie ze standardowymi procedurami<sup>9</sup>. Gram-dodatnie, katalazododatnie kolonie mogą być pobierane do badania z następujących pożywek:

Agar Krwawy

Nutrient Agar

Tryptone Soya Agar

Tryptone Soya Agar z 5% krwi

Mannitol Salt Agar

Columbia Blood Agar

Columbia CNA Agar

Mueller-Hinton Agar z 5% krwi

Baird-Parker Agar

CLED Medium

Iso.Sensitest Agar

Iso.Sensitest Agar z 5% krwi

Oxacillin Resistance Screening Agar (ORSA).

Poleca się używanie świeżych, całonocnych hodowli (18-36 godzinna inkubacja). Skłonność kolonii do autoaglutynacji wzrasta po przekroczeniu czasu inkubacji powyżej rekomendowanych 36 godzin.

## METODA STANDARDOWA

1. Doprowadzić odczynnik lateksowy do temperatury pokojowej. Upewnić się, że odczynnik lateksowy jest dobrze wymieszany przez energiczne wytrząsanie i usunięcie cząsteczek lateksu z zakraplacza.

2. Nanieść 1 kroplę odczynnika lateksowego na oznaczone pole na kartoniku testowym oraz 1 kroplę odczynnika kontrolnego na drugie pole.

3. Pobrać za pomocą sterylnej ezy 5 przeciętnej wielkości kolonii podejrzanych gronkowców (odpowiednio 2-3mm średnicy) i przenieść na pole kartonika z naniesionym odczynnikiem kontrolnym. Pokryć równomiernie całe pole uzyskaną zawiesiną. Usunąć eżę.

4. Za pomocą nowej ezy, postępując podobnie nanieść kolonie na pole z odczynnikiem testowym Test Latex.

5. Obserwować aglutynację poruszając kartonik testowy ruchem okrężnym przez co najmniej 20 sekund. Nie stosować szkła powiększającego.

6. Po zakończonym teście umieścić kartonik w płynie dezynfekcyjnym.

## Metoda dla Oxacillin Resistance Screening Agar

1. Jak w metodzie standardowej.
2. Pobrać za pomocą sterylnej czy 5 przeciętnej wielkości kolonii podejrzanych gronkowców (odpowiednio 2-3mm średnicy) i przenieść na pole kartonika. Za pomocą czy rozprowadzić pobrany materiał w cienkiej warstwie po polu testowym
3. **Nanieść 1 kroplę** Control Reagent bezpośrednio na rozprowadzoną warstwę materiału i **natychmiast** wymieszać.
- 4-6. Jak w metodzie standardowej.

## ODCZYT I INTERPRETACJA WYNIKÓW

### Wynik Dodatni

Wynik jest dodatni, jeżeli aglutynacja niebieskich cząsteczek lateksu pojawi się w ciągu 20 sekund. Taki wynik wstępnie kwalifikuje szczep do *Staphylococcus aureus*.

### Wynik Ujemny

Wynik jest ujemny, jeżeli nie pojawi się aglutynacja, a niebieska zawiesina pozostaje gładka w ciągu 20 sekund. To wstępnie identyfikuje szczep jako nie należący do gatunku *Staphylococcus aureus*.

### Wynik Niejednoznaczny

Słabe ziarnienie odczynnika lateksowego przy braku zmian w próbie z odczynnikiem kontrolnym powinno być interpretowane jako wynik niejednoznaczny. Szczepy powinny być zbadane ponownie po przesianiu na pożywki nieselektywne.

### Wynik nie do interpretacji

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

### Ziarniste lub Włókniste Reakcje

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

**Wynik jest dodatni** w przypadku gdy tło w teście z odczynnikiem testowym Latex Reagent, jest bardziej przejaśnione niż w reakcji z odczynnikiem kontrolnym Control Reagent.

Wynik jest **ujemny** kiedy nie ma różnicy między przejaśnieniem tła w reakcji z odczynnikiem lateksowym Latex Reagent a tłem w reakcji z odczynnikiem kontrolnym Control Reagent.

Zmiany pojawiające się po 20 sekundach nie należy brać pod uwagę.

## OGRANICZENIA

1. Tendencja do autoaglutynacji kolonii wzrasta po przekroczeniu rekomendowanych 36 godzin inkubacji hodowli.
2. Przeciwciała zastosowane w Staphytest Plus są specjalnie dobierane pod kątem uniknięcia potencjalnych reakcji krzyżowych z antygenami koagulazoujemnych gronkowców. Zauważono spadek czułości testu w stosunku do 18 szczepów MRSA<sup>10</sup>.
3. Niektóre szczepy gronkowców inne niż *Staphylococcus aureus*, szczególnie *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus schleiferi* oraz *Staphylococcus haemolyticus*<sup>11,12,13,14</sup> mogą dawać wynik dodatni w teście na koagulazę i/lub w szybkich procedurach lateksowych. Jeżeli jest to niezbędne, szczepy te mogą być poddane identyfikacji biochemicznej np. poprzez określenie aktywności PYRazy (Oxoid O.B.I.S. PYR ID0580). *Staphylococcus aureus* oraz *Staphylococcus hyicus* będzie PYRazo-ujemny, a wszystkie pozostałe szczepy, wymienione powyżej PYRazo-dodatnie<sup>15,16,17</sup>. *Staphylococcus hyicus* oraz *Staphylococcus intermedius* rzadko odnotowywane są w laboratoriach klinicznych.

4. Gronkowce izolowane z próbek moczu dające słabe reakcje dodatnie<sup>18</sup> z Staphytest Plus mogą należeć do *Staphylococcus saprophyticus*. Dalsza identyfikacja takich izolatów musi obejmować testy biochemiczne oraz określenie czułości na nowobiocynę (*Staphylococcus saprophyticus* jest oporny na nowobiocynę).
5. Niektóre streptokoki i prawdopodobnie inne organizmy posiadające czynniki wiążące immunoglobulinę lub plazmę, mogą reagować z odczynnikiem lateksowym, a także niektóre gatunki takie jak *Escherichia coli* zdolne są do niespecyficznego aglutynacji cząsteczek lateksu<sup>19,20</sup>. Aby uniknąć niespecyficznego reakcji, należy wykonać barwienie Grama tak, aby badać tylko typowe *Staphylococci*.

## CHARAKTERYSTYKA TESTU

Określenie charakterystycznych parametrów testu Oxoid Staphytest Plus było wykonane z zastosowaniem danych uzyskanych z badań podanych poniżej. Należy zauważyć, że znana jest cecha zmienności antygenowej u *Staphylococcus aureus* w zależności od położenia geograficznego miejsc, z których pochodzą izolaty.

### Badania kliniczne

Oxoid Staphytest Plus był sprawdzany w dużym szpitalu we Francji. Wszystkie 299 izolaty były badane przy użyciu testu próbówkowego jako metody odniesienia. Przy opracowywaniu wyników pominięto wyniki ze szczepów, o których wiadomo, że dają reakcje krzyżowe<sup>11, 12, 13, 14</sup> oraz wyniki szczepów autoaglutynujących (n=283). Czułość względna wyniosła 96,5%, a specyficzność względna 97,6%.

### Badania w przemyśle

Oxoid Staphytest Plus był sprawdzany w laboratoriach badania żywności w wielu miejscach w Wielkiej Brytanii. Przebadano razem 621 próbek kolonii pobranych z pożywki Baird-Parker Agar, która była posiana materiałem pochodzącym z żywności i środowiska. Jako metodę odniesienia uznano metodę próbówkową. Przy opracowywaniu wyników pominięto wyniki ze szczepów o których wiadomo, że dają reakcje krzyżowe<sup>11, 12, 13, 14</sup> oraz wyniki szczepów autoaglutynujących (n=604). Czułość względna wyniosła 97,6%, a specyficzność względna 97,1%.

**UWAGA: Ten produkt zawiera azydek sodu. Szkodliwy przy połknięciu.**

### Literatura:

1. Essers, L. and Radebold, K. (1980). "Rapid and Reliable Identification of *Staphylococcus aureus* by a Latex Agglutination Test". *J.Clin.Microbiol.* 12: 641-643.
2. Taussig, M.J. (1984). *Processes in Pathology and Microbiology 2nd Ed.* 520-530. Blackwell, Oxford.
3. Ruane, P.J., Morgan, M.A., Citron, D.M. and Mulligan, M.E. (1986). "Failure of Rapid Agglutination Methods to Detect Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus*". *J.Clin.Microbiol.* 24: 490-492.
4. Roberts, J.I.S. and Gaston, M.A. (1987). "Protein A and coagulase expression in epidemic and non-epidemic *Staphylococcus aureus*". *J.Clin.Pathol.* 40: 837-840.
5. Wanger, A.R., Morris, S.L. Ericsson, C., Singh, K.V. and LaRocco, M.T. (1992). "Latex Agglutination-Negative Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Recovered from Neonates: Epidemiologic Features and Comparison of Typing Methods". *J.Clin. Microbiol.* 30: 2583-2587.
6. Fournier, J.M., Boutonnier, A. and Bouvet, A. (1989). "*Staphylococcus aureus* Strains Which Are Not Identified by Rapid Agglutination Methods Are of Capsular Serotype 5". *J.Clin.Microbiol.* 27: 1372-1374.
7. Fournier, J.M., Bouvet, A., Boutonnier, A., Audurier, A., Goldstein, F., Pierre, J., Bure, A., Lebrun, and L., Hochkeppel, H.K. (1987). Predominance of Capsular Polysaccharide Type 5 among Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus*". *J.Clin.Microbiol.* 25: 1932-1933.
8. Karakawa, W.W., Fournier, J.M., Vann, W.F., Arbeit, R., Schneerson, R.S., and Robbins, J.B. (1985). "Method for the Serological Typing of the Capsular Polysaccharides of *Staphylococcus aureus*". *J.Clin.Microbiol.* 22: 445-447.
9. Kloos, W.E., Jorgensen J.H. (1988). *Staphylococci*. pp.143-153. In *Manual of Clinical Microbiology*. 4th Edn. (Eds) Lennette, E.H., Balows, A., Hausser W.J., and Shadomy, H.J. Assoc.Amer.Microbiol. Washington.
10. Data on file at Oxoid Ltd.

11. Jean-Pierre, H., Darbas, H., Jean-Roussenq, A. & Boyer, G.(1989). "Pathogenicity in Two Cases of *Staphylococcus schleiferi*, a Recently Described Species". *J.Clin.Microbiol.*27: 2110-2111.
12. Frenney, J., Brun, Y., Bes, M., Meugnier H., Grimont, F., Grimont, P.A.D.,Nervie, C., & Fleurette, J. (1988). "*Staphylococcus schleiferi* sp. nov. Two species from Human Clinical Specimens". *Int.J.Sup Bacteriol.* 38: 168-172.
13. Phillips, W.E., and Kloos, W.E. (1981). "Identification of Coagulase-Positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus*. subsp. *hyicus* Isolates from Veterinary Clinical Specimens". *Clin.Microbiol.*14: 671-673.
14. van Griethuysen, A., Bes, M., Etienne, J., Zbinden, R. and Kluytmans, J. (2000). "An International Multicenter Evaluation of a new Latex Agglutination Test for Identification of *Staphylococcus aureus*". *Clin Microbiol. and Infect.* 6 sup 1: 163.
15. Schnitzler, N., Rainer, M., Conrads, G., Frank, D. and Haase, G. (1988). " *Staphylococcus lugdunensis*: Report of a case of Peritonitis and an Easy-To-Perform Screening Strategy". *J. Clin.Microbiol.* 26: 1939–1949.
16. Ann-Herbert, A., Crowder, C. G., Hancock, G. A., Jarvis, W. R. and Thornsberry, C. (1998). "Characteristics of Coagulase-Negative-Staphylococci That Help Differentiate These Species of the Family Micrococcaceae". *J. Clin.Microbiol.* 36: 812–813.
17. Gregson, D. B., Low, D. E., Skulnick, M.and Simor, A. E. (1988). "Problems with Rapid Agglutination Methods for Identification of *Staphylococcus aureus*When *Staphylococcus saprophyticus* Is Being Tested". *J. Clin. Microbiol.* 26:1398–1399.
18. Myhre, E. B. and Kuusela, P. (1983). " Binding of Human Fibronectin to Group A, C and G Streptococci".*Infect. Immun.* 40: 29–34.
19. Runeheggen, A., Schonbeck, C., Hedneru, Hessel, B. and Kronvall, G.(1981). "Binding of Fibrinogen Degradation Products to *S. aureus* and to  $\beta$ -Hemolytic Streptococci Group A, C and G". *Acta. path. microbiol. Scand., Sect B.* 89: 49–55.



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