

**BEDOELD GEBRUIK**

Konijnencoagulaseplasma is een gestandaardiseerd, gevriesdroogd konijnenplasma dat wordt gebruikt voor het kwalitatief opsporen van het coagulase-enzym geproduceerd door *Staphylococcus aureus*.

**SAMENVATTING EN VERKLARING VAN DE TESTS**

Differentiëring van *Staphylococcus aureus* van de coagulase-negatieve species, met inbegrip van *Staphylococcus epidermidis* en *Staphylococcus saprophyticus*, is niet alleen cruciaal omdat *Staphylococcus* een zeer groot risico voor de gezondheid is, maar ook omdat de laatste species in toenemende mate in verband worden gebracht met septikemie, bacteriële endocarditis, kolonisatie van prothesen en infecties van de urinewegen. Identificatie van stafylokokken is gebaseerd op koloniale morfologie, cultuur- en biochemische kenmerken en microscopisch onderzoek. De ontdekking van coagulase is echter het meest gebruikte criterium voor differentiëring tussen species<sup>1</sup>. Het vermogen van *Staphylococcus* om coagulase, een enzym dat plasma kan doen stollen, te produceren werd door Loeb in 1903<sup>2</sup> voor het eerst gemeld. Sinds die tijd hebben veel onderzoekers getracht de productie van coagulase in verband te brengen met de pathogeniciteit van stafylokokken. Chapman, Berens, Nilson en Curcio hebben in een onderzoek van coagulase- en hemolysineproductie door *Staphylococcus* aangetoond dat coagulase producerende stammen gewoonlijk pathogeen waren, ongeacht hun hemolytische of chromogene eigenschappen<sup>3</sup>. Meer recente ervaring heeft aangetoond dat men er niet altijd op kan vertrouwen dat het vermogen van stafylokokken om coagulase te produceren wijst op zijn pathogeniciteit<sup>4</sup>.

**PRINCIPE VAN DE PROCEDURE**

*Staphylococcus aureus* produceert twee types coagulase, vrij en gebonden. Vrije coagulase is een extracellulair enzym geproduceerd wanneer het organisme in vloeibaar kweekmedium wordt gekweekt. Gebonden coagulase, ook bekend als stollingsfactor, blijft gehecht aan de celwand van het organisme.

De buistest wordt uitgevoerd door het toevoegen van 2-4 koloniën van het isolaat aan een buis die het gerehydrateerde coagulaseplasma bevat en door het gedurende maximaal vier uur te incuberen bij 37 °C. De vorming van een stolsel wijst op coagulaseproductie. De buistest is de meest gebruikte methode in verband met de grotere nauwkeurigheid als gevolg van zijn vermogen om zowel gebonden als vrije coagulase te detecteren.

De objectglaasjestest wordt uitgevoerd door het maken van een zware suspensie van het testisolaat in een druppel fysiologische zoutoplossing op een schoon objectglaasje en daarna een druppel plasma toe te voegen. Dit wordt vervolgens voorzichtig vermengd met een oogje en onderzocht op klontering. Deze test is minder accuraat dan de buistest en vereist dat alle negatieve tests worden bevestigd door middel van de buistest. Deze test detecteert alleen gebonden coagulase.

**REAGENTIA**

Coagulaseplasma is gevriesdroogd konijnenplasma waaraan EDTA is toegevoegd als het anti-coagulans. EDTA wordt niet gebruikt door bacteriën, en zal daardoor geen fout-positieve coagulase-reacties door citraat gebruikende bacteriën veroorzaken<sup>5</sup>.

Het konijnencoagulaseplasma wordt geleverd in een verscheidenheid aan verpakkingsgrootten:

Productcode:	Verpakkingsgrootte	Volume voor Reconstitutie	Ongeveer # buistests
PL.850-3	10 flacons / doos	3 ml/flacon	6 x 10
PL.850-5	10 flacons / doos	5 ml/flacon	10 x 10
PL.850-10	Individuele flacon	10 ml/flacon	20
PL.850-20	Individuele flacon	20 ml/flacon	40
PL.850-30	Individuele flacon	30 ml/flacon	60

**RECONSTITUTIE**

Reconstitueer het konijnencoagulaseplasma door het toevoegen van steriel gedestilleerd of gedeioniseerd water aan de flacon tot het op het productlabel aangegeven volume. Draai de flacon voorzichtig tot het product volledig is opgelost. Het product niet gebruiken wanneer het product niet volledig oplost of fibrinestolsels of strengen bevat.

**BENODIGDE MAAR NIET GELEVERDE MATERIELEN**

Steriel gedestilleerd of gedeioniseerd water  
 Entingslussen  
 12 mm x 75 mm reageerbuisen  
 Steriele 1 ml pipetten  
 Waterbad (37° C)  
 Glazen objectglaasjes  
 Positieve & negatieve controlestammen (Raadpleeg Kwaliteitscontrole).

**VOORZORGSMAATREGELEN**

- Konijnencoagulaseplasma is uitsluitend bedoeld voor diagnostisch gebruik *in vitro*.
- Het reagens niet gebruiken na de op het productlabel vermelde uiterste gebruiksdatum.
- Er dienen universele voorzorgsmaatregelen te worden genomen bij het hanteren, verwerken en weggooien van alle klinische specimens en reagentia.
- Het reagens bevat materiaal van dierlijke oorsprong en dient behandeld te worden als mogelijke drager en overbrenger van ziekten.
- Voor het verkrijgen van geldige testresultaten dient men zich te houden aan de procedures, opslagcondities, voorzorgsmaatregelen en beperkingen gespecificeerd in deze richtlijnen.

**STABILITEIT EN OPSLAG**

- Bewaar ongeopende, niet-gereconstitueerde flacons bij 2-8 °C.
- Bewaar de gereconstitueerde flacons plasma bij 2-8 °C, of verdeel in volumes van 0,5 ml, vries onmiddellijk in en bewaar bij -20 °C. Niet laten ontdooien en opnieuw invriezen.
- Ongeopende, niet-gereconstitueerde flacons zullen, indien ze volgens instructies bewaard worden, stabiel blijven tot de uiterste gebruiksdatum op het productlabel.
- Het gereconstitueerde plasma zal gedurende vijf dagen stabiel blijven wanneer het wordt bewaard bij 2-8 °C of gedurende maximaal 30 dagen indien verdeeld en opgeslagen bij -20 °C en de op het label vermelde uiterste gebruiksdatum niet wordt overschreden.

**PREPARATIE VAN MONSTER**

- Bepaal of het testisolaat zuiver is en de volgende kenmerken heeft van *Staphylococcus aureus*:
  - passende morfologie op het isolatiemedium.
  - Gram-positieve kokken
  - katalase-positief.
- Gebruik 2-4 koloniën (één oogje vol) van het testorganisme.

**TESTPROCEDURE**
**A. Buiscoagulasetest**

- Voeg met behulp van een steriele pipet van 1 ml, 0,5 ml van het gereconstitueerde plasma toe aan een reageerbuis van 12 mm x 75 mm.
- Emulgeer met behulp van een steriel oogje 2-4 koloniën van het testorganisme in het plasma.
- Meng voorzichtig.
- Incubeer gedurende 4 uur in een waterbad bij 37 °C.
- Onderzoek na 1 uur op stolselvorming door de buis voorzichtig te kantelen. Wanneer er geen aanwijzing is van stolselvorming, tot de 4-uurslimiet elke 30 minuten controleren.
- Wanneer er na een incubatie van 4 uur geen stolsel is, de test op kamertemperatuur gedurende de resterende tijdsperiode opnieuw incuberen en na 24 uur onderzoeken op stolselvorming. Tests die na 4 uur al een stolsel hebben geproduceerd niet opnieuw incuberen daar sommige stammen van *S. aureus* een fibrinolysine zullen produceren die de stolsels na verdere incubatie kunnen lysiseren.
- Leg de resultaten vast.

**B. Coagulasetest op objectglaasje**

(Detecteert gebonden coagulase of klonteringsfactor)

- Plaats een druppel van het gereconstitueerde plasma en een druppel fysiologische zoutoplossing naast elkaar op een schoon, droog glazen objectglaasje.
- Emulgeer een oogje vol met de te testen koloniën in de druppel plasma en in de fysiologische zoutoplossing.
- Let gedurende één minuut op zichtbare klonters.
- Leg de resultaten vast.

**KWALITEITSCONTROLE**

Gebruik bekende positieve en negatieve controlekweken in parallel met de test om de validiteit van testresultaten te verifiëren.

Organisme	Verwacht resultaat buistest	Verwacht resultaat objectglaasjestest
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Stolselvorming	Klontervorming
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Geen stolselvorming	Geen klontervorming

**INTERPRETATIE VAN RESULTATEN**
**A. Buiscoagulasetest**

- **Positief resultaat:** Elke mate van stolling van het coagulaseplasma die binnen 24 uur wordt opgemerkt.
- **Negatief resultaat:** Geen stolling van het coagulaseplasma.

**B. Coagulaseobjectglaasjestest**

- **Positief resultaat:** Macroscopische klontering in het plasma binnen één minuut en geen klontering in de fysiologische zoutoplossing.
- **Negatief resultaat:** Geen klontering in zowel het plasma als de fysiologische zoutoplossing.
- **Niet te interpreteren resultaat:** Wanneer in beide tests klontering wordt opgemerkt, is het een aanwijzing dat het isolaat is autogeagglutineerd en niet geschikt is voor de agglutinatie-test op het objectglaasje. Wanneer dit wordt opgemerkt dient het isolaat te worden getest met behulp van de buiscoagulasetest.

## BEPERKINGEN






1. Hoewel de coagulasetests op buis en objectglaasje uitstekende overeenkomst hebben kunnen fout-positieve coagulasetests op objectglaasjes voorkomen bij andere stafylokokkensoorten die klonteringsfactor produceren. Deze zullen stammen van *S. lugdenensis* en *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* omvatten.
2. Sommige species of organismen gebruiken citraat in hun metabolisme en kunnen fout-positieve reacties opleveren voor coagulase-activiteit. Normaal zou dit geen problemen veroorzaken daar de coagulasetest bijna uitsluitend wordt uitgevoerd op stafylokokken. Het is echter mogelijk dat bacteriën die citraat gebruiken Staphylococcus-kweken waarop de coagulasetest wordt uitgevoerd verontreinigen en zij kunnen na langdurige incubatie, fout-positieve resultaten geven als gevolg van het gebruik van het citraat. De aanwezigheid van EDTA in het coagulaseplasma moet dit probleem verhelpen.
3. Bij het controleren van de resultaten van de coagulasetest, dienen de buizen gedurende de eerste vier incubatie-uren elke 30 minuten te worden geobserveerd. Sommige stammen van *Staphylococcus aureus* produceren fibrinolysine dat eerder gevormde stolsels kan lyseren. Wanneer de buizen pas na 24 uur incubatie worden afgelezen, kan reversie naar een fout-negatief optreden.

## PRESTATIEKENMERKEN

Pro-Lab Konijnencoagulaseplasma werd geëvalueerd met behulp van 30 stammen van *S. aureus* en 30 stammen coagulasenegatieve stafylokokken (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* en 5 *S. haemolyticus*). Het Pro-Lab Konijnencoagulase heeft alle stammen correct geïdentificeerd die aangaven dat het product een gevoeligheid had van 100% en specificiteit van 100% in het onderzoek.

## REFERENTIES

1. **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.
2. **Loeb, L.** (1903). The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. J. Med. Res. 10:407-419.
3. **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.
4. **Morton, H.E. and Cohn, J.** (1972). Coagulase and deoxyribonuclease activities of Staphylococci isolated from clinical sources. Applied Micro. 23:725-733.
5. **Baird-Parker, A.C.** (1974). Staphylococcus In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition. Edited by Williams and Wilkins. Baltimore. Page 484-489.

	= Fabrikant
	= Bevoegde vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap
	= In vitro diagnostische medische test
	= Temperatuurbepending
	= Raadpleeg de instructies voor gebruik

**Deze gebruiksaanwijzing werd professioneel vertaald op basis van de originele Engelse versie. Neem contact op met Pro-Lab als de tekst niet eenduidig is of als u discrepanties vaststelt.**