بهارافشان

Coagulase Test

پلاسمای استریل خرگوش

(حاوی ضد انعقاد EDTA)

(جهت انجام آزمایش کوآگولاز)

هدف آزمایش:

آزمایش کوآگولاز جهت تعیین آنزیم ***کوآگولاز آزاد*** (free coagulase) یـا ***متصـل*** (bound coagulase) و افتراق اسـتافیلوکوک‌های تولیدکننده کوآگولاز از سایر گونه‌های استافیلوکوک به کار می‌رود.

اساس آزمایش:

کوآگولاز پروتئینی است که فعالیتی شبیه به پروترومبین داشته، فیبرینوژن را به فیبرین تبدیل کرده، در نتیجه لخته قابل رؤیتی ایجاد می‌کند. کوآگولاز به دو شکل متصل به سلول و آزاد وجود دارد که هر کدام خصوصیات متفاوتی داشته و برای تشخیص به روش آزمون جداگانه‌ای نیاز دارد.

کوآگولاز متصـل (روش لام): کوآگولاز متصل که کلامپینگ فاکتور *(Clumping factor)* نیز نامیده می‌شود، به دیواره سلولی باکتری متصل است و در محیط ترشح نمی‌شود، و مستقیما با فیبرینوژن واکنش می‌دهد و تولید رشته‌های فیبرین کرده که باعث لخته شدن و تجمع سلول‌های میکروبی می‌گردد.

کوآگـولاز آزاد (روش لوله): کوآگولاز آزاد ماده‌ای شـبیه ترومبین اسـت. وقتی سوسپانسیونی از ارگانیسم تولیدکننده کوآگولاز در پلاسما در لوله آزمایش تهیه می‌شود، CRF (Coagulase-Reacting Factor) موجود در پلاسما با کوآگولاز آزاد واکنش داده، فیبرینوژن را به فیبرین تبدیل کرده و ایجاد لخته می‌نماید.

www.bird-bahar.com
E-mail:bahar@bird-bahar.com

Coagulase-Positive Staphylococcus Species

Organism	Coagulase		Heat-Stable-Endonuclease
	Slide	Tube	
S. aureus subsp. anaeroius	-	+[a]	+
S. aureus subsp.aureus	+	+	+
S. lugdunenis[b.c]	+	-	-
S. schleiferi subsp.Coaqulans	+	-	+
S. schleiferi subsp. Schleiferi[b]	+	-	+
S. hyicus[d]	-	V[a]	+
S. intermedius[d]	V	+[a]	+
S. delphini[d]	-	+[a]	-

[a]Strains deficient in clumping factor (slide negative) will usually produce free coagulase (tube positive).
[b]Human isolates; human plasma is recommended for testing.
cLatex agglutination is less reliable for detection of clumping factor or fibrinogen.
[d]Animal isolates. S. intermedius and s. hyicus are rarely isolated from humans. Separation:

مراجع:

1. MacFaddin, J.F., Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 2000, 3Rd edition, Lippincott Williams and Wilkins.
2. Murray, P.R., Manual of Clinical Microbiology, 2003, 8th edition, Washington D.C.
3. Forbes, B.A. and et al. Baily and Scott's Diagnostic Microbiology, 1998, 11th edition, Mosby.
4. Koneman, E.W. and et al. Color Atlas and Textbook Clinical Microbiology, 1997, 5edition, Lippincott.

تهران، خیابان کارگر شمالی، نرسیده به پمپ‌بنزین، ساختمان آزمایشگاه بهار
شماره ۱۶۲۷، صندوق پستی: ۷۶۸-۱۴۱۸۵
تلفن: ۸۸۹۶۶۲۴۶-۸۸۹۶۹۵۴۵ ، نمابر: ۸۸۹۶۰۴۴۵

آماده‌سازی و نگهداری معرف:

۱- معرف مورد استفاده، پلاسمای استریل خرگوش به صورت لیوفیلیزه می‌باشد. ویال‌های لیوفیلیزه را تا زمان قید شده بر روی برچسب می‌توانید در یخچال ۸°C-۲ درجه نگهداری نمایید.
۲- برای استفاده از معرف، ویال را از یخچال خارج نموده و اجازه دهید تا دمای آن به دمای اتاق برسد. تحت شرایط استریل ۲ml آب مقطر استریل به آن اضافه کرده، ویال را تکان دهید تا محتویات آن کاملا حل شود.
۳- محلول معرف را به میزان ۰/۵ml در لوله‌های استریل توزیع نمایید.
۴- لوله‌ها را تا ۵ روز در ۸°C-۲ و یک ماه در ۲۰°C- می‌توان نگهداری و استفاده نمود.
۵- از منجمد و ذوب کردن مکرر معرف خودداری کنید.

روش انجام آزمایش:

بهتر است از کشت تازه ۲۴-۱۸ ساعته باکتری استفاده کنید.

الف) روش آزمایش بر روی لام:

۱- یک قطره آب مقطر استریل را روی یک لام شیشه‌ای تمیز قرار دهید.
۲- از کشت ۲۴-۱۸ ساعته باکتری مورد نظر سوسپانسیون غلیظ شیری و یکنواختی تهیه کنید.
۳- سوسپانسیون باید بدون آگلوتیناسیون باشد.
۴- یک قطره معرف پلاسمای خرگوش را به سوسپانسیون اضافه کرده، با لوپ یا اپلیکاتور چوبی آن را به خوبی مخلوط نمایید.

تفسیر آزمایش:

واکنش مثبت: مشاهده ذرات درشت و سفیدرنگ آگلوتیناسیون ۱۰-۵ ثانیه بعد از مخلوط کردن پلاسما با سوسپانسیون و عدم وجود ذرات آگلوتیناسیون در مرحله دوم.

توجه: وجود ذرات آگلوتیناسیون در مرحله دوم بیانگر این است که ارگانیسم اتوآگلوتیناسیون داشته و آزمایش باید بروش لوله انجام شود.

واکنش منفی: عدم وجود ذرات آگلوتیناسیون.

توجه: برای همه نتایج منفی یا مثبت تأخیری (بیشتر از ۱۰ ثانیه) باید آزمایش به‌روش لوله انجام شود.

www.bird-bahar.com
E-mail:bahar@bird-bahar.com

تهران، خیابان کارگر شمالی، نرسیده به پمپ‌بنزین، ساختمان آزمایشگاه بهار
شماره ۱۶۲۷، صندوق پستی: ۷۶۸-۱۴۱۸۵
تلفن: ۸۸۹۶۶۲۴۶-۸۸۹۶۹۵۴۵، نمابر: ۸۸۹۶۰۴۴۵

ب) روش آزمایش لوله‌ای:

۱- مقداری از کلنی مورد نظر را در ۰/۵ml پلاسمای خرگوش در لوله استریل حل کنید تا سوسپانسیون شیری‌رنگ به‌دست آید.
۲- لوله را به مدت ۴ ساعت در ۳۵°C انکوبه نمایید.
۳- تا ۴ ساعت لوله را از نظر تشکیل لخته بررسی نمایید. برای این‌کار لوله را به آرامی کج کنید.
۴- اگر لخته‌ای تشکیل نشد لوله را برای یک شب در حرارت اتاق قرار داده و دوباره آن را بررسی نمایید.

تفسیر آزمایش:

واکنش مثبت: ایجاد لخته به هر اندازه بعد از ۲۴-۱ ساعت.
واکنش منفی: عدم ایجاد لخته تا ۲۴ ساعت.

محدودیت‌ها:

۱- بعضی از گونه‌های استافیلوکوک غیر از S.aureus (مثل S.intermedius) واکنش کوآگولاز مثبت ایجاد می‌کنند. (به جدول مراجعه شود.)
۲- استاف‌ارئوس‌های مقاوم‌به‌متی‌سیلین (MRSA) ممکن‌است کوآگولاز متصل نداشته باشند و نتیجه آزمایش کوآگولاز به روش لام آن‌ها منفی شود.
۳- برای انجام این آزمایش نباید سوش مورد نظر را از محیط‌هایی که دارای غلظت زیاد نمک می‌باشند (مثل مانیتول سالت آگار) برداریم، زیرا غلظت بالای نمک باعث می‌شود که بعضی از سویه‌ها اتوآگلوتیناسیون ایجاد کنند.
۴- برای انجام آزمایش کوآگولاز لوله‌ای، سوسپانسیون نباید بیش از ۴ ساعت در انکوباتور بماند، زیرا بعضی از سویه‌ها بعد از ۴ ساعت فیبرینولیزین تولید کرده، فیبرینولیزین لخته را حل می‌کند و نتیجه منفی کاذب به‌دست می‌آید.
۵- در این آزمایش برای بررسی نتیجه، لوله را باید به آرامی کج کنیم و نباید آن را به شدت تکان دهیم. چون ممکن است لخته تکه‌تکه و حل شود و نتیجه منفی کاذب به‌دست آید.
۶- پلاسمای مورد استفاده باید پلاسمای استریل (حاوی ضدانعقاد EDTA) خرگوش باشد، از پلاسمای سیتراته نباید استفاده شود. زیرا ارگانیسم‌هایی که سیترات را متابولیزه می‌کنند (مثل انتروکوک‌ها)، نتیجه مثبت کاذب می‌دهند. البته برای جلوگیری از چنین خطایی باید ابتدا آزمون کاتالاز انجام شود.