

**VERWENDUNGSZWECK**

Bei Kaninchen-Koagulaseplasma handelt es sich um standardisiertes, lyophilisiertes Kaninchenplasma zum qualitativen Nachweis des von *Staphylococcus aureus* produzierten Koagulaseenzym.

**ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DER TESTS**

Die Differenzierung von *Staphylococcus aureus* von koagulase-negativen Arten, darunter *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus saprophyticus*, ist von zentraler Bedeutung, da es sich bei Staphylokokken um ein signifikantes Gesundheitsrisiko handelt und darüber hinaus die beiden letztgenannten Arten zunehmend mit Septikämie, bakterieller Endokarditis, Befall von Prothesen und Harnwegsinfekten in Verbindung gebracht werden. Die Identifizierung von Staphylokokken beruht auf der Morphologie der Kolonien, auf Anzuchtcharakteristika und biochemischen Eigenschaften sowie auf der mikroskopischen Untersuchung. Das am häufigsten verwendete Kriterium zur Differenzierung zwischen den Arten ist der Nachweis von Koagulase<sup>1</sup>. Die Fähigkeit von Staphylokokken zur Produktion von Koagulase, einem Enzym, das die Koagulation von Plasma auslöst, wurde 1903 erstmals von Loeb beschrieben<sup>2</sup>. Es wurde seither vielfach versucht, die Produktion von Koagulase mit der Pathogenität von Staphylokokken in Verbindung zu bringen. Chapman, Berens, Nilson und Curcio untersuchten die Produktion von Koagulase und Hämolyse bei Staphylokokken und konnten zeigen, dass koagulase-produzierende Stämme in der Regel pathogen sind, unabhängig von ihren hämolytischen und chromogenen Eigenschaften<sup>3</sup>. Aktuelle Erfahrungen haben gezeigt, dass die Fähigkeit von Staphylokokken Koagulase zu produzieren zur Bestimmung der Pathogenität nicht immer ausreicht<sup>4</sup>.

**TESTPRINZIPIEN**

Die von *Staphylococcus aureus* produzierte Koagulase liegt in ungebundener und gebundener Form vor. Ungebundene Koagulase ist ein extrazelluläres Enzym, das bei Anzucht des Organismus in Flüssigbouillon hergestellt wird. Gebundene Koagulase wird auch Koagulationsfaktor genannt und ist an die Zellwand des Organismus gebunden.

Der Röhrchentest wird durchgeführt, indem 2-4 Kolonien des Isolats in einem Röhrchen mit dem rehydrierten Koagulase-Plasma vermischt und bis zu vier Stunden bei 37 °C bebrütet werden. Gerinnung deutet auf die Produktion von Koagulase hin. Aufgrund seiner höheren Genauigkeit, die auf die Eigenschaft zurückzuführen ist, sowohl gebundene als auch freie Koagulase zu erkennen, ist der Röhrchentest das am häufigsten eingesetzte Verfahren.

Bei einem Objektträgerest wird eine schwere Suspension des Prüfisolats in einem Tropfen Salzlösung auf einem sauberen Glasobjektträger angefertigt und anschließend ein Tropfen Plasma hinzugefügt. Dies wird anschließend vorsichtig mit einer Öse gemischt und auf Gerinnung untersucht. Dieses Testverfahren ist weniger genau als der Röhrchentest und kann nur unter der Voraussetzung durchgeführt werden, dass alle negativen Testergebnisse durch einen Röhrchentest bestätigt werden. Bei diesem Prüfverfahren kann nur gebundene Koagulase erkannt werden.

**REAGENZEN**

Koagulaseplasma ist lyophilisiertes Kaninchenplasma, dem als Antikoagulant EDTA zugegeben wurde. EDTA wird von Bakterien nicht genutzt; es entstehen daher keine falsch positiven Koagulasereaktionen, wenn citrat-nutzende Bakterien getestet werden<sup>5</sup>.

Das Kaninchen-Koagulaseplasma wird in verschiedenen Größen geliefert:

Bestellnummer	Größe	Volumen für Rekonstitution	Ungefähre # von Röhrchentests
PL.850-3	10 Fläschchen / Packung	3 ml / Fläschchen	6 x 10
PL.850-5	10 Fläschchen / Packung	5 ml / Fläschchen	10 x 10
PL.850-10	Einzelfläschchen	10 ml / Fläschchen	20
PL.850-20	Einzelfläschchen	20 ml / Fläschchen	40
PL.850-30	Einzelfläschchen	30 ml / Fläschchen	60

**Rekonstitution**

Stellen Sie das Kaninchenplasma her, indem Sie die auf dem Produktetikett angegebene Menge destilliertes oder demineralisiertes, steriles Wasser in ein Röhrchen geben. Schwenken Sie das Röhrchen vorsichtig, bis sich das Produkt komplett aufgelöst hat. Falls sich das Produkt nicht vollständig auflöst oder Fibringerinnsel oder Fasern enthält, verwenden Sie es nicht weiter.

**NOTWENDIGE, NICHT MITGELIEFERTER MATERIALIEN**

Steriles destilliertes oder entionisiertes Wasser  
 Impfösen  
 Reagenzgläser (12 mm X 75 mm)  
 Sterile Pipetten (1 ml)  
 Wasserbad (37 °C)  
 Glasobjektträger  
 Positive & negative Kontrollstäme (Siehe hierzu den Abschnitt Qualitätskontrolle).

**VORSICHTSHINWEISE**

- Das Kaninchen-Koagulaseplasma ist ausschließlich für den Einsatz in der *in-vitro*-Diagnostik konzipiert.
- Verwenden Sie das Reagenz nicht nach Ablauf des Verfallsdatums auf dem Produktetikett.
- Bei Umgang, Verarbeitung und Entsorgung von klinischen Proben und Reagenzien müssen allgemeingültige Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden.
- Das Reagenz enthält tierische Stoffe und sollte als potentieller Träger und Überträger von Krankheiten behandelt werden.
- Alle in dieser Testanleitung enthaltenen Hinweise zur Testdurchführung und -aufbewahrung sowie zu Vorsichtsmaßnahmen und Verfahrenseinschränkungen müssen genau befolgt werden, um gültige Ergebnisse zu erzielen.

**STABILITÄT UND LAGERUNG**

- Lagern Sie ungeöffnete, nicht-rekonstituierte Proben bei 2 - 8 °C.
- Lagern Sie rekonstituierte Proben mit Plasma bei 2 - 8 °C oder teilen Sie sie auf Mengen von 0,5 ml auf, frieren Sie diese sofort ein und lagern Sie sie bei -20 °C. Nicht auftauen und erneut einfrieren.
- Ungeöffnete, nicht-rekonstituierte Proben bleiben bei richtiger Lagerung bis zum Ablauf des Verfallsdatums auf dem Produktetikett stabil.
- Gelagertes, rekonstituierte Plasma bleibt bei Temperaturen von 2 - 8 °C fünf Tage stabil oder bis zu 30 Tagen, wenn es aufgeteilt und bei -20 °C gelagert wird. Das Verfallsdatum auf dem Etikett darf nicht überschritten werden.

**PROBENVORBEREITUNG**

- Ermitteln Sie, ob das Prüfisolat rein ist und die folgenden Eigenschaften des *Staphylococcus aureus* aufweist:
  - Entsprechende Morphologie des Isolationsmediums
  - Grampositive-Kokken
  - Positive Katalase

- Verwenden Sie 2 - 4 Kolonien (eine Öse) des Prüforganismus.

**TESTVERFAHREN**
**A. Röhrchentest**

- Geben Sie 0,5 ml des rekonstituierten Plasmas mit einer 1 ml Pipette in ein 12 mm x 75 mm Röhrchen.
- Verwenden Sie eine sterile Öse zum emulgieren von 2 - 4 Kolonien des Prüforganismus in das Plasma.
- Vorsichtig mischen.
- Vier Stunden in einem Wasserbad bei 37 °C bebrüten.
- Untersuchen Sie die Probe nach einer Stunde auf Gerinnung, indem Sie das Röhrchen vorsichtig zur Seite kippen. Falls Sie keine Gerinnung feststellen, untersuchen Sie die Probe alle 30 Minuten bis die vier Stunden verstrichen sind.
- Falls nach vier Stunden Bebrütung noch keine Gerinnung vorliegt, führen Sie den Test bei Raumtemperatur weiter und untersuchen Sie die Probe nach 24 Stunden auf Gerinnung. Bebrüten Sie keine Probe erneut, bei der nach vier Stunden bereits eine Gerinnung aufgetreten ist, da einige Stränge des *S aureus* Fibrinolyse produzieren, welches zu einer Lyse des Gerinnsels bei weiterer Bebrütung führen kann.
- Halten Sie die Ergebnisse fest.

**B. Objektträgerest**

- (Zur Erkennung von gebundener Koagulase oder des Clumping-Faktors)
- Geben Sie je einen Tropfen rekonstituiertes Plasma und Salzlösung nebeneinander auf einen sauberen und trockenen Objektträger.
  - Emulgieren Sie eine Öse der zu testenden Kolonien mit dem Tropfen Plasma und geben Sie ihn in die Salzlösung.
  - Achten Sie bis zu einer Minute auf sichtbare Klumpenbildung.
  - Halten Sie die Ergebnisse fest.

**QUALITÄTSKONTROLLE**

Es sollten stets bekannt positive und negative Kontrollkulturen im Test mitgeführt werden, um die Validität der Testergebnisse sicher zu stellen.

Organismus	Erwartetes Ergebnis - Röhrchentest	Erwartetes Ergebnis - Objektträgerest
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gerinnung	Klumpenbildung
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Keine Gerinnung	Keine Klumpenbildung

**AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE**
**A. Röhrchentest**

- Positives Ergebnis:** Jeder Grad an beobachteter Gerinnung des Koagulaseplasmas innerhalb von 24 Stunden.
- Negatives Ergebnis:** Keine Gerinnung des Koagulaseplasmas.

**B. Objektträgerest**

- Positives Ergebnis:** Makroskopische Klumpenbildung des Plasmas innerhalb einer Minute und keine Klumpenbildung in der Salzlösung.
- Negatives Ergebnis:** Klumpenbildung weder im Plasma, noch in der Salzlösung.
- Nicht-interpretierbares Ergebnis:** Falls eine Klumpenbildung in beiden Proben stattfindet, deutet dies darauf hin, dass das Isolat bereits verklumpt ist und für den Objektträger-Koagulasetest ungeeignet ist. Wird dies beobachtet sollte das Isolat Anhand eines Röhrchen-Koagulasetests untersucht werden.



## EINSCHRÄNKUNGEN






1. Obwohl Objektträger- und Röhrchentest eine hervorragende Übereinstimmung aufweisen, können bei einem Test von anderen Staphylokokken-Spezies, die zu Klumpenbildung führen, fälschlicherweise positive Objektträgertests auftreten. Diese umfassen Stränge des *S. lugdenensis* und *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*.
2. Manche Arten oder Organismen nutzen Citrat als Stoffwechselfsubstrat, sodass es zu falsch-positiven Reaktionen in Bezug auf Koagulaseaktivität kommt. Normalerweise ergeben sich dadurch keine Probleme, da der Koagulasetest fast ausschließlich auf Staphylokokken angewandt wird. Es kann jedoch zu einer Kontamination der zu testenden Staphylokokkenkulturen mit citrat-nutzenden Bakterien kommen und diese können aufgrund der Verwertung von Citrat nach längerer Inkubation falsch positive Ergebnisse produzieren. Dieses Problem wird durch Vorhandensein von EDTA in dem Koagulaseplasma vermieden.
3. Bei der Überprüfung der Ergebnisse des Koagulasetests, sollten die Röhrchen während den ersten vier Stunden Bebrütung alle 30 Minuten untersucht werden. Einige Stränge des *Staphylococcus aureus* produzieren Fibrinolysin, das zu einer Lyse von Gerinnseln führen kann. Werden die Röhrchen vor Ablauf der 24 Stunden Bebrütung nicht untersucht, kann fälschlicherweise ein negatives Ergebnis auftreten.

## LEISTUNGSMERKMALE

Pro-Lab Kaninchen-Koagulaseplasma wurde mit 30 Stämmen von *S. aureus* und 30 Stämmen von koagulase-negativen Staphylokokken (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* und 5 *S. haemolyticus*) getestet. Die Pro-Lab Kaninchen-Koagulase identifizierte in dieser Studie alle Stämme richtig. Dies zeigt, dass das Produkt eine Empfindlichkeit von 100 % und eine Spezifität von 100 % hat.

## QUELLEN

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., Jorgensen, J.H. and Tenover, M.A. 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. Seite 484-489.

	= Hersteller
	= Autorisierter Repräsentant in der Europäischen Gemeinschaft
	= Medizinprodukt für die in vitro Diagnostik.
	= Temperaturbegrenzung
	= Beachten Sie die Gebrauchsanleitung

**Bei diesen Anleitungen handelt es sich um eine Fachübersetzung der englischen Originalversion. Bei Unklarheiten oder offensichtlichen Abweichungen wenden Sie sich bitte an Pro-Lab.**