

شرکت زیست فناوری سینووه نمایندگی محصولات Innotraining

تست کواگولاز چیست؟

آزمایش کواگولاز یک آزمایش بیوشیمیایی است که برای افتراق استافیلوکوکوس اورئوس از سایر گونه های استافیلوکوک مانند S. saprophyticus و اپیدرمیدیس و بر اساس توانایی تولید آنزیم کواگولاز استفاده می شود.

تست کواگولاز یک آزمایش مهم است که گونه های جنس استافیلوکوک را به دو گروه متمایز می کند. استافیلوکوک کواگولاز مثبت و استافیلوکوک کواگولاز منفی. آنزیم کواگولاز در برخی از ارگانیسم ها به عنوان یک عامل حدت بیماری عمل می کند زیرا با فیبرینوژن موجود در سطح سلول میزبان تعامل دارد.

ارگانیسم های دارای کواگولاز معمولاً دارای یک سد محافظ در اطراف خود هستند که باعث افزایش بیماری زایی و مقاومت آنها در برابر سیستم ایمنی می شود.

کواگولاز دو نوع است. کواگولاز آزاد (free) و کواگولاز محدود (bound) که هر کدام با روش های مختلفی شناسایی می شوند.

کواگولاز bound را فاکتور کلمپینگ می نامند و به سرعت با تست اسلاید تشخیص داده می شود. کواگولاز آزاد نیز به نوبه خود در نتیجه تشکیل لخته در لوله آزمایش شناسایی می شود.

اصول تست

استافیلوکوکوس اورئوس دو نوع کواگولاز آزاد و محدود تولید می کند.

کواگولاز آزاد یک آنزیم خارج سلولی است که هنگام کشت ارگانیسم در آبگوشت تولید می شود.

کواگولاز محدود، به عنوان عامل کلمپینگ شناخته می شود و متصل به دیواره سلولی ارگانیسم باقی می ماند.

آزمایش لوله با افزودن ۲-۴ کلنی از ایزوله به یک لوله حاوی پلاسمای کواگولاز rehydrated و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت حداکثر چهار ساعت انجام می شود.

تشکیل لخته نشان دهنده تولید کواگولاز است.

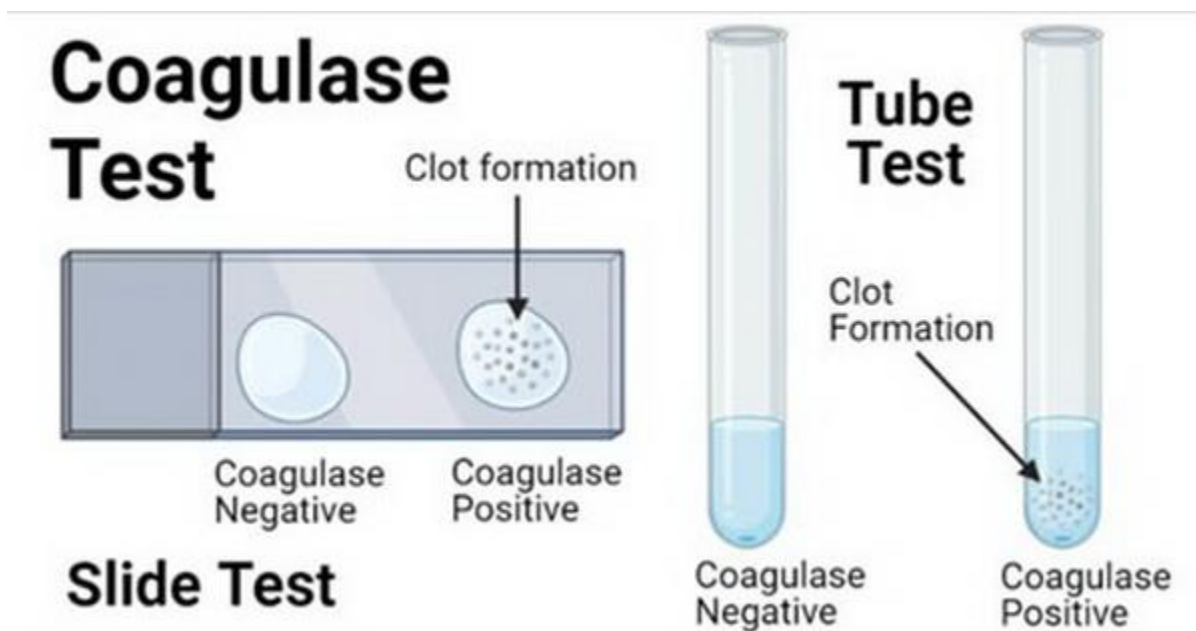
آزمایش لوله ای به دلیل دقت بیشتر به دلیل توانایی آن در تشخیص کواگولاز آزاد و متصل، متداول ترین روش مورد استفاده است.

آزمایش لام با ساختن سوسپانسیون سنگین از ایزوله آزمایش در یک قطره نمک بر روی یک لام شیشه ای تمیز و سپس اضافه کردن یک قطره پلاسما انجام می شود.

سپس به آرامی با یک حلقه مخلوط می شود و از نظر توده ای یا تشکیل کلمپ بررسی می شود. این آزمایش دقت کمتری نسبت به آزمایش لوله دارد و نیاز دارد که تمام آزمایشات منفی توسط آزمایش لوله تأیید شود.

این آزمایش فقط کواگولاز متصل را تشخیص می دهد.

تست کواگولاز به روش های اسلاید و لوله



اهداف آزمایش کواگولاز:

- برای شناسایی کواگولاز آزاد و کواگولاز محدود تولید شده توسط موجودات مختلف.
- برای افتراق استافیلوکوک کواگولاز مثبت از استافیلوکوک کواگولاز منفی.
- شناسایی و افتراق استافیلوکوکوس اورئوس از سایر گونه های استافیلوکوک.

کواگولاز محدود (Bound coagulase)

فاکتور کلمپینگ که کواگولاز باند نامیده می شود، می تواند به سرعت در تست اسلاید تشخیص داده شود، اما این آزمایش به چندین کلونی نیاز دارد و حساسیت ندارد.

استافیلوکوکوس اورئوس ماده دیگری را در دیواره سلولی خود تولید می کند، پروتئین A، که به قسمت FC ایمونوگلوبولین G انسانی (IgG) متصل می شود و بنابراین به عنوان یک فاکتور واکنش دهنده کواگولاز عمل می کند.

هنگامی که ذرات لاتکس یا گلبول قرمز با IgG و با فیبرینوژن انسانی پوشانده می شوند، اگر فاکتور کلمپینگ یا پروتئین A در دیواره سلولی باکتری وجود داشته باشد، استافیلوکوک آگلوتینه می شود.

وجود فاکتور کلمپینگ با توانایی ارگانیسم به منظور تاثیر مستقیم بر فیبرینوژن موجود در پلاسما برای جمع کردن آن در یک اسلاید قابل ارزیابی نشان داده می شود.

آزمایش فاکتور کلمپینگ سریع است اما به چندین کلنی نیاز دارد و همچنین این فاکتور ممکن است در همه موجودات استافیلوکوکوس اورئوس وجود نداشته باشد.

کواگولاز آزاد (free coagulase)

نوع دیگری از کواگولاز که توسط ارگانیسم آزاد می شود کواگولاز آزاد است.

کواگولاز آزاد با کواگولاز متصل متفاوت است زیرا مکانیسم انعقاد کواگولاز آزاد نیازمند فعال شدن یک فاکتور واکنش دهنده کواگولاز پلاسما (CRF) است که یک مولکول ترومبین اصلاح شده یا مشتق شده است تا یک کمپلکس کواگولاز CRF-را تشکیل دهد.

پلاسمای اضافه شده به لوله ترجیحاً پلاسمای خرگوش است که به عنوان یک عامل اتصال عمل می کند.

سپس این کمپلکس با فیبرینوژن واکنش می دهد تا لخته فیبرین را در یک لوله آزمایش تشکیل دهد.

روش های تست کواگولاز

کواگولاز را می توان با دو روش مختلف تشخیص داد. تست لوله و تست اسلاید.

آزمایش با اسلاید

الف. یک قطره پراکسید هیدروژن ۳٪ را روی یک لام میکروسکوپی بمالید.

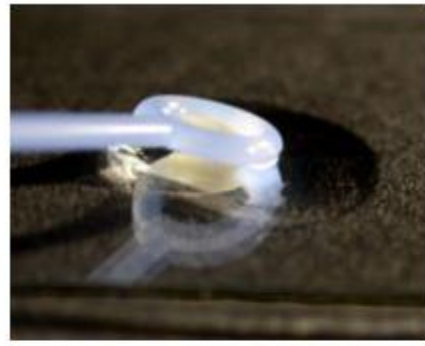
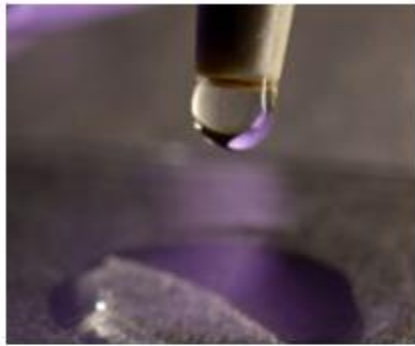
ب- باکتری ها را با یک حلقه پلاستیکی به محلول H₂O₂ منتقل کنید.

ج) باکتری کاتالاز مثبت گاز (O₂) را به شکل حباب av تولید می کند که نشان می دهد باکتری دارای کاتالاز است.

د- باکتری کاتالاز منفی کاتالاز ندارد و در نتیجه اکسیژن تشکیل نمی شود. به تکه های کلنی های باکتری توجه کنید، اما هیچ حبابی در محلول ها وجود ندارد.

یک قطره از پلاسمای انعقادی خرگوش یا انسان به اسلاید اضافه می شود و کلوخه شدن بلافاصله مشاهده می شود، بیش از ۱۰ ثانیه نیست.

مراحل تست کواگولاز توسط اسلاید



آزمایش با لوله

پلازما با سالین فیزیولوژیکی رقیق می شود. (۰,۲ میلی لیتر پلازما را به ۱,۸ میلی لیتر سالین اضافه کنید) سپس ۵ میلی لیتر از پلاسمای رقیق شده به یک لوله آزمایش اضافه می شود. حدود ۵ قطره از کشت ارگانیسم آزمایش به لوله آزمایش اضافه می شود.

لوله آزمایش مخلوط شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت انکوبه می شود.

لوله در نهایت برای تشکیل لخته مشاهده می شود. در صورت عدم لخته شدن، لوله باید در فواصل ۳۰ دقیقه ای تا ۶ ساعت بررسی شود.

آزمایش کواگولاز با لوله

پلازما با سالیन فیزیولوژیکی رقیق می شود

ریختن ۵ میلی لیتر از پلاسمای رقیق شده به یک لوله
آزمایش اضافه می شود

حدود ۵ قطره از کشت ارگانیسم آزمایش به لوله
آزمایش اضافه می شود

لوله آزمایش مخلوط شده و در دمای ۳۷ درجه
سانتیگراد به مدت یک ساعت انکوبه می شود

لوله در نهایت برای تشکیل لخته مشاهده می شود



توضیح تصویر: آزمایش کواگولاز لوله برای کواگولاز آزاد. لوله بالا مثبت است و لخته را نشان می دهد. لوله پایین منفی است.

آماده سازی

پلاسمای انعقادی خرگوش (COAGULASE Test) را با اضافه کردن آب مقطر یا دیونیزه استریل به ویال در حجم مشخص شده روی برچسب محصول، آماده سازی کنید.

ویال را به آرامی بچرخانید تا محصول کاملاً حل شود. اگر محصول به طور کامل حل نمی شود یا حاوی لخته یا رشته های فیبرین است، از محصول استفاده نکنید.

آماده سازی نمونه

۱. مشخص کنید که ایزوله آزمایش خالص است و دارای ویژگی های زیر استافیلوکوکوس اورئوس است:

• مورفولوژی مناسب بر روی محیط جداسازی.

• کوکسی گرم مثبت

• کاتالاز مثبت.

۲. از ۲-۴ کلنی (یک حلقه پر) از ارگانیسم مورد آزمایش استفاده کنید.

تفسیر نتایج آزمایش کواگولاز

B-آزمایش کواگولاز لوله برای کواگولاز آزاد. لوله سمت چپ مثبت است و لخته را نشان می دهد. لوله سمت راست منفی است. بالا: تست کواگولاز منفی در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (سمت چپ) و تست کواگولاز مثبت در استافیلوکوکوس اورئوس (مرکز و راست)

نتیجه تست اسلاید

- یک آزمایش مثبت، نشان دادن آگلوتیناسیون سلول های باکتریایی پس از اضافه شدن پلاسما است.
- آزمایش منفی با عدم آگلوتیناسیون نشان داده می شود.

نتیجه تست لوله

آزمایش مثبت یکی از معیارهای زیر را دارد:

- تشکیل لخته کامل یا هر درجه ای از تشکیل لخته قبل از ۲۴ ساعت.
- پس از افزودن ۱ یا ۲ قطره کلسیم ۵٪ به لوله بدون لخته در ۲۴ ساعت، لخته ایجاد نمی شود.

تست منفی یکی از معیارهای زیر را دارد:

- عدم تشکیل لخته در ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد.
- پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد لخته ایجاد نمی شود، اما پس از افزودن ۱ یا ۲ قطره ۵٪ CaCl_2 به لوله، لخته ایجاد می شود.

ارگانیزم های کواگولاز مثبت:

استافیلوکوکوس اورئوس و سایر باکتری های میزبان حیوانی مانند *S. pseudintermedius*، *S. hyicus*، *S. lutrae*، *S. delphini*، *S. Schleiferi*، *intermedius*

ارگانیزم های کواگولاز منفی:

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، *S. saprophyticus*، *S. warneri*، *S. hominis*، *S. caprae* و غیره.



تست کواگولاز منفی در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (سمت چپ) و تست کواگولاز مثبت در استافیلوکوکوس اورئوس (مرکز و راست)

موارد احتیاط

۱. پلاسمای انعقادی خرگوش (COAGULASE Test) فقط برای استفاده تشخیصی آزمایشگاهی در نظر گرفته شده است.
۲. از معرف پس از تاریخ انقضای نشان داده شده بر روی برچسب محصول استفاده نکنید.
۳. اقدامات احتیاطی همگانی باید در جابجایی، پردازش و دور انداختن تمام نمونه های بالینی و معرف ها انجام شود.
۴. معرف حاوی موادی با منشأ حیوانی است و باید به عنوان یک ناقل و ناقل بیماری بالقوه استفاده شود.
۵. روش ها، شرایط نگهداری، اقدامات احتیاطی و محدودیت های مشخص شده در این دستورالعمل ها باید رعایت شود تا نتایج آزمایش معتبر به دست آید.

پایداری و ذخیره سازی

۱. ویال های باز نشده و آماده سازی نشده را در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید.
۲. ویال های پلاسمای انعقادی خرگوش (COAGULASE Test) را در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد یا مقدار کمی در حجم ۰.۵ میلی لیتر نگهداری کنید، فوراً منجمد کنید و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری کنید. (از ذوب شدن و منجمد شدن مجدد خودداری کنید).
۳. در صورتی که طبق دستورالعمل نگهداری شود، ویال های باز نشده و بازسازی نشده تا تاریخ انقضا روی برچسب محصول ثابت می مانند.
۴. پلاسمای پلاسمای انعقادی خرگوش پس از آماده سازی، در صورت نگهداری در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد به مدت ۵ روز یا در صورت نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا ۳۰ روز پایدار می ماند.

محدودیت ها

۱. اگرچه آزمایش های کواگولاز لوله و اسلاید مطابقت عالی دارند، آزمایش های کواگولاز اسلاید مثبت ممکن است با سایر گونه های استافیلوکوکی که فاکتور کلمپینگ تولید می کنند رخ دهد. که شامل سویه های S *lugdenensis* *schleiferi* subsp *schleiferi* خواهد بود.
۲. برخی از گونه ها یا موجودات از سیترات در متابولیسم خود استفاده می کنند و ممکن است واکنش های مثبت کاذب برای فعالیت کواگولاز ایجاد کنند.
۳. معمولاً این مساله مشکلی ایجاد نمی کند زیرا آزمایش کواگولاز تقریباً به طور انحصاری بر روی استافیلوکوک ها انجام می شود.
۴. با این حال، ممکن است باکتری هایی که از سیترات استفاده می کنند، کشت های استافیلوکوک را که آزمایش کواگولاز روی آنها انجام می شود، آلوده کنند و ممکن است پس از انکوباسیون طولانی مدت، به دلیل استفاده از سیترات، نتایج مثبت کاذب بدهند.
۵. هنگام بررسی نتایج آزمایش کواگولاز، لوله ها باید هر ۳۰ دقیقه در چهار ساعت اول انکوباسیون بررسی شوند. برخی از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس فیبرینولیزین تولید می کنند که ممکن است لخته هایی که زودتر تشکیل شده اند را لیز کند.
۶. اگر لوله ها طی ۲۴ ساعت انکوباسیون بررسی نشوند، ممکن است منفی کاذب رخ دهد.