

PL

Instrukcja używania



LIOFILIZOWANE OSOCZE KRÓLICZE DO WYKRYWANIA KOAGULAZY

Zastosowanie

Liofilizowane osocze królicze do wykrywania koagulazy jest wyrobem medycznym do diagnostyki *in vitro* służącym do identyfikacji gronkowców koagulazo-dodatnich (w tym *Staphylococcus aureus*).

Jest to test jakościowy do oznaczania koagulazy wolnej oraz koagulazy związanej (clumping factor) wytwarzanej przez *Staphylococcus aureus*.

Opis

Produkt przeznaczony jest wyłącznie do profesjonalnego zastosowania laboratoryjnego przez przeszkolony personel z zachowaniem podstawowych zasad antyseptyki i aseptyki.

Osocze znajduje się w szklanej fiolce z korkiem oraz kapsłem. Jedna fiolka zawiera 2 ml liofilizowanego osocza króliczego. Produkt przed użyciem należy uwodnić zgodnie z instrukcją.

Skład

Osocze królicze do identyfikacji gronkowców koagulazo-dodatnich jest wykonane z krwi króliczej pobranej na antykoagulant CPDA, a następnie kontrolowane z zestawem szczepów wzorcowych i terenowych gronkowców koagulazo-dodatnich oraz koagulazo-ujemnych. Taki proces kontroli pozwala na uzyskanie rzetelnych wyników badań. Następnie osocze jest liofilizowane. Produkt jest jałowy.

Właściwości

Koagulaza jest enzymem produkowanym przez niektóre szczepy gronkowców - tzw. gronkowce koagulazo-dodatnie (w tym *Staphylococcus aureus*). Koagulaza u gronkowców występuje w dwóch postaciach - wolnej (uwalnianej do środowiska) oraz związanej ze ścianą komórkową bakterii.

Koagulazę wolną oznacza się w teście metodą probówkową, mieszając w próbówce uwodnione osocze z 24-godziną hodowlą bakteryjną. Po odpowiednim czasie inkubacji odczytuje się wynik. Pojawienie się w próbówce skrzepu świadczy o wyniku dodatnim. W teście probówkowym, białko koagulaza jest uwalniane do otoczenia przez bakterie koagulazo-dodatnie, które przekształca zawarty w osoczu fibrynogen w fibrynę, co jest obserwowane w formie skrzepu.

Natomiast koagulazę związaną (clumping factor, czynnik skupiania) oznacza się w teście metodą szkiełkową. W kropli soli fizjologicznej, znajdującej się na szkiełku podstawowym, zawieszają się świeżą hodowlę bakteryjną pobraną z nieselektywnego podłoża agarowego, a następnie dodaje esz osocze królicze. Pojawienie się charakterystycznych kłaczków w kropli z osoczem króliczym świadczy o wyniku dodatnim. Clumping factor jest receptorem fibrynogenu na powierzchni komórek bakterii koagulazododatnich. Fibrynogen, przekształcając się w fibrynę, tworzy nici między komórkami, łącząc je w agregaty obserwowane gołym okiem.

Sposób użycia

Przygotowanie próbek

Próbki należy pobrać do sterylnych pojemników, przetransportować do laboratorium oraz przetwarzać zgodnie z wytycznymi dla danego rodzaju próbek. Należy wybierać wyraźnie odgraniczone, typowe kolonie. Do testów należy używać niezanieczyszczonych hodowli bakteryjnych.

Przygotowanie hodowli bakteryjnej

Do badania koagulazy wolnej metodą probówkową należy przesiać badany szczep na podłoże płynne, namnażające np. bulion wzbogacony i inkubować przez 24 ± 2 godziny w temp. 37 ± 1°C.

Do badania koagulazy związanej metodą szkiełkową należy przesiać badany szczep na podłoże stałe namnażające (agarowe) i inkubować przez 24h w temp. +37 ± 1°C.

Przygotowanie osocza

Osocze przed użyciem należy uwodnić dodając jałowo, do fiolki z osoczem 2ml jałowej dejonizowanej wody. Następnie osocze należy delikatnie wymieszać, aż do jego całkowitego rozpuszczenia.

W celu zachowania jałowości produktu (której brak może uniemożliwić wykonanie oznaczenia lub właściwą interpretację wyników), przygotowanie osocza i wykonanie testu powinno odbywać się w warunkach uniemożliwiających kontaminację lub skażenie produktu.

Procedura oznaczania koagulazy wolnej metodą probówkową

- Do jałowej próbki należy dodać 500 µl uwodnionego osocza. Następnie dodać 500 µl szczepu z hodowli bulionowej.
- Próbki inkubować 24 ± 2 godziny w temp. +37 ± 1°C.

Odczyt i interpretacja wyników

Wynik należy odczytywać po 2 godz., 4 godz., 6 godz. oraz 24 ± 2 godz. od rozpoczęcia inkubacji.

! Nie wstrząsać i nie mieszać zawartości próbki (może to doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych wskutek mechanicznego rozpadu skrzepu). Pojawienie się w próbówce skrzepu świadczy o wyniku dodatnim reakcji. Brak skrzepu w próbówce oznacza wynik ujemny.

Odczytu wyniku należy dokonać wg następującej skali:



- ujemny: brak skrzepu
- 1+ dodatni: słaby niezwały skrzep
- 2+ dodatni: słabo zwarty skrzep
- 3+ dodatni: silnie zwarty skrzep
- 4+ dodatni: skrzep zajmuje całą objętość próbki i nie przemieszcza się po odwróceniu próbki

UWAGA: Niektóre szczepy *Staphylococcus aureus* wytwarzają fibrylizynę - enzym, który rozkłada skrzep. Może to spowodować powstawanie wyników fałszywie ujemnych po 24 godz., dlatego też próbki należy obserwować nie tylko po 24 ± 2 godz., ale także po 2, 4, 6 godz. od rozpoczęcia inkubacji. Szczepy *Staphylococcus aureus* powodują koagulację osocza króliczego w czasie od pół godziny do 24 godz. ± 2h. Zwykle osocze jest całkowicie skrzepnięte (postać stała w próbówce), ale jakiegokolwiek stopień krzepnięcia plazmy należy uznać za wynik dodatni.

Na naszej stronie <http://immunolab.com.pl/film> zamieszczono film instruktażowy zawierający instrukcję wykonania badania metodą probówkową i interpretacji wyników.

Procedura oznaczania koagulazy związanej (clumping factor) metodą szkiełkową

- Na szkiełko podstawowe należy nakropić obok siebie dwie krople roztworu soli fizjologicznej.
- W obu kroplach zawiesić tę samą hodowlę bakteryjną pobraną z nieselektywnego podłoża agarowego. Zawiesina powinna być gęsta i jednorodna.
- Do jednej z kropli dodać esz z oczkiem o pojemności 10 µl osocze królicze i delikatnie wymieszać.
- Kołysać lekko szkiełkiem ruchem kołystym. Obserwować wynik reakcji.

Interpretacja wyników:

Jeżeli w czasie 60 sekund od dodania osocza króliczego pojawią się charakterystyczne kłaczkowate wytrącenia, to wynik należy uznać za dodatni.

UWAGA: Kontrola negatywna (zawiesina bakterii bez dodatku osocza) powinna pozostać jednorodna. W przeciwnym przypadku badany szczep wykazuje autoaglutynację, co oznacza, że nie można oznaczyć clumping factor.

Reakcja jest lepiej widoczna, jeśli wynik reakcji obserwuje się nad ciemnym tłem.

Na naszej stronie <http://immunolab.com.pl/film> zamieszczono film instruktażowy zawierający instrukcję wykonania badania metodą szkiełkową i interpretacji wyników.

Kontrola jakości przez użytkownika

W trakcie stosowania osocza zaleca się testowanie kontrolne z użyciem wzorcowych szczepów zarówno koagulazo-dodatnich, jak i koagulazo-ujemnych w celu zweryfikowania poprawności wykonania metody i działania osocza, postępując analogicznie jak w przypadku szczepów badanych.

Ograniczenia metody

Oprócz *Staphylococcus aureus*, do bakterii koagulazo-dodatnich, które mogłyby wejść w reakcję z osoczem króliczym, można zaliczyć inne bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, takie jak *S. anaerobius*, *S. delphini*, *S. hycicus*, *S. intermedius*, *S. lutrae* i *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. Są to jednak bakterie znacznie rzadziej spotykane niż *Staphylococcus aureus* - głównie odpowiedzialne za infekcje u zwierząt.

Należy pamiętać, że nie wszystkie szczepy *S. aureus* produkują enzym koagulazę - określa się je jako atypowe. Oznacza to, że niektóre szczepy (zwłaszcza izolaty kliniczne bądź wykazujące oporność na metycylinę) mogą dawać ujemny wynik w teście na obecność koagulazy wolnej bądź związanej.

Do analiz należy wykorzystywać wyłącznie czyste hodowle bakteryjne gronkowców. Obecność cytrynianu może powodować fałszywie dodatnie reakcje z innymi mikroorganizmami (np. *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, bakterie z rodzaju *Pseudomonas* i *Streptococcus*).

Materiały potrzebne do pracy niewchodzące w skład zestawu

Ciemne tło, sól fizjologiczna, jałowa woda dejonizowana, esy, próbki, płytki Petriego, szkiełka podstawowe, jałowe końcówki do pipet, pojemnik na skażone materiały, filmy instruktażowe (dostępne na stronie <http://immunolab.com.pl/film>).

Weryfikacja i walidacja metody

| | |
|---------------|---|
| czułość | koagulaza wolna: 100% (50/50) clumping factor: 100% (65/65) (ilość wyników prawdziwie dodatnich/ suma ilości wyników prawdziwie dodatnich i fałszywie ujemnych) |
| swoistość | koagulaza wolna: 100% (23/23) clumping factor: 100% (32/32) (ilość wyników prawdziwie ujemnych/ suma ilości wyników prawdziwie ujemnych i fałszywie dodatnich) |
| powtarzalność | koagulaza wolna: 100% (156/156) clumping factor: 100% (147/147) (ilość powtórzonych zgodnych wyników reakcji/całkowita liczba wyników) |
| odtwarzalność | koagulaza wolna: 100% (149/149) clumping factor: 100% (141/141) (ilość odtworzonych zgodnych wyników reakcji/całkowita ilość wyników) |

Warunki przechowywania

- Liofilizowane osocze należy przechowywać w temperaturze od +2 do +8°C.
- Transport do 3 dni w temperaturach dodatnich nieprzekraczających +15 do +25°C nie zmienia właściwości produktu.
- Nie stosować po upływie terminu ważności zamieszczonego na opakowaniu.
- Data ważności dotyczy produktu w nienaruszonym opakowaniu przechowywanego zgodnie z instrukcją.
- Osocze jest produktem wielokrotnego użytku.
- Uwodnione osocze należy przechowywać w temperaturze od +2 do +8°C nie dłużej niż 14 dni od daty uwodnienia lub w temperaturze -20°C nie dłużej niż 30 dni.
- Chronić od światła.
- Nie używać osocza w przypadku zmętnienia lub pojawienia się skrzepu. Jeżeli osocze jest trudno rozpuszczalne, nie należy go używać.
- Nie stosować osocza o zmienionych cechach fizykochemicznych wskazujących na zanieczyszczenie mikrobiologiczne. Nie sterylizować osocza do użycia.

Środki ostrożności

- Produkt nie stanowi zagrożenia dla środowiska i zdrowia człowieka, jeśli jest użytkowany zgodnie z instrukcją.
- Należy przestrzegać aseptycznej techniki pracy i stosować środki ostrożności w kwestii zagrożenia mikrobiologicznego podczas wykonywania wszystkich procedur.
- Należy ściśle przestrzegać instrukcji użycia.
- Każdy poważny incydent związany z wyrobem należy zgłosić producentowi i właściwemu organowi państwa członkowskiego, w którym użytkownik ma miejsce zamieszkania lub siedzibę.

Środki ostrożności przy pracy z materiałem zakaźnym:

- Osocze królicze zawiera materiał pochodzenia zwierzęcego. W związku z tym należy je traktować jako materiał potencjalnie zakaźny i odpowiednio się z nim obchodzić.
- Wykonanie testu może wiązać się z pracą z bakteriami chorobotwórczymi. W związku z tym należy przestrzegać wszystkich niezbędnych zasad obowiązujących przy pracy z zakaźnym materiałem mikrobiologicznym: stosować odzież ochronną i rękawice ochronne. Pobrany materiał do badań oraz materiał na szkiełku i w probówce zabezpieczyć przed dostępem osób trzecich, z uwagi na możliwość zakażenia osób trzecich. Zużyte szkiełka i probówki oraz inne materiały skażone należy poddać sterylizacji w autoklawie lub postępować zgodnie z obowiązującymi zasadami w laboratorium.

Zawartość jednostkowego opakowania

1 fiołka zawiera 2ml liofilizowanego osocza.

Po uwodnieniu umożliwia to przeprowadzenie ok. 4 testów oznaczania koagulazy wolnej lub ok. 200 testów oznaczania koagulazy związanej.

Producent

Zakład Badawczo-Wdrożeniowy Ośrodka Salmonella „IMMUNOLAB” Sp. z o.o.
Adres: ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk, Polska
Tel./Fax: 58 781-44-91
E-mail: info@immunolab.com.pl
www.immunolab.com.pl

Wyjaśnienie użytych symboli:



Producent



Data ważności: XXX-YY-Z (rok-miesiąc-dzień)

LOT

Numer partii



Zapoznaj się z instrukcją użycia

REF

Numer katalogowy



Zakres temperatury przechowywania

IVD

Wyrob medyczny do diagnostyki *in vitro*



Zakres temperatury transportu w czasie do 3 dni

EN



Instruction for Use

RABBIT COAGULASE PLASMA (LYOPHILIZED)

Intended use

The rabbit coagulase plasma (lyophilized) is an *in vitro* diagnostic medical device used to identify coagulase-positive staphylococci (including *Staphylococcus aureus*). It is a qualitative test used to determine free and bound coagulase (clumping factor) produced by *Staphylococcus aureus*.

Description

Product for professional laboratory application only that should be used by qualified personnel following basic aseptic and antiseptic principles. The plasma is in a glass vial with a stopper and a flip-off cap. One vial contains 2 ml of lyophilized rabbit plasma. The product must be rehydrated before use according to the instructions.

Composition

The rabbit plasma for identifying coagulase-positive staphylococci is made from rabbit blood collected with an CPDA anticoagulant, and then controlled with a set of reference and field strains of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci. Such a control process allows obtaining reliable results. The plasma is then lyophilized. The product is sterile.

Properties

Coagulase is an enzyme produced by some strains of staphylococci - so-called coagulase-positive staphylococci (including *Staphylococcus aureus*). Coagulase in staphylococci occurs in two forms - free (released into the environment) and bound with the bacterial cell wall.

Free coagulase is detected in the tube test method by mixing rehydrated plasma in a tube with a 24-hour bacterial culture. The result is checked after the appropriate incubation time. The appearance of a clot in the tube indicates a positive result. In the tube test, coagulase protein is released into the suspension by coagulase-positive bacteria. Coagulase converts the fibrinogen present in the plasma into fibrin, which is then observed in the form of a clot.

On the other hand, bound coagulase (also known as clumping factor) is determined by the slide test. The slide test is performed in the following manner: a fresh bacterial culture taken from a non-selective agar medium is suspended in a drop of saline on a glass slide, and then with the use of a sterile loop rehydrated plasma is added to the mixture. The appearance of characteristic flocs after adding the rabbit plasma drop indicates a positive result. Clumping factor is a fibrinogen receptor on the surface of coagulase-positive bacterial cells. Fibrinogen, by converting to fibrin, forms threads between cells linking them in aggregates visible to the naked eye.

Method

Preparation of samples

Samples should be collected to sterile containers, transported to the laboratory and processed according to guidelines for the specific type of sample. Clearly defined, typical colonies should be selected. Uncontaminated bacterial cultures should be used for testing.

Preparation of bacterial culture

To test for free coagulase using the tube method, the selected strain should be inoculated to a liquid, growth-promoting medium such as enriched broth and incubated for 24 ± 2 hours at 37°C.

To test for bound coagulase using the slide method, the selected strain should be streaked on the appropriate solid (containing agar), growth-promoting medium and incubated for 24 hours at 37°C.

Plasma preparation

Before use, the rabbit plasma should be rehydrated by adding 2 ml of sterile deionized water to the vial. Thereafter, the plasma should be gently mixed until it is completely dissolved.

In order to maintain the aseptic nature of the product (lack of which can prevent the test from being performed or the results from being properly interpreted), the preparation of the plasma and the performance of the test should take place in conditions that prevent contamination or pollution of the product.

Procedure for determining free coagulase using the tube method

1. Add 500 µl of rehydrated plasma to a sterile test tube. Add 500 µl of the strain from the broth culture.
2. Incubate test tubes for 24 ± 2 hours at 37 ± 1 °C.

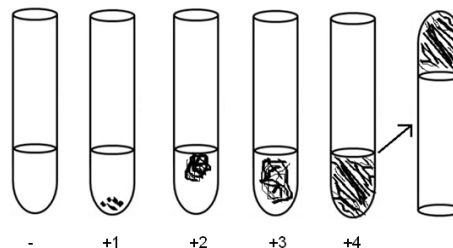
Reading and interpreting the results

The results should be checked after 2, 4, 6 and 24 ± 2 hours from the start of incubation.

The appearance of a clot in the tube indicates a positive test result. The absence of a clot in the tube indicates a negative result.

! Do not shake or mix the contents of the tube (this may lead to the obtaining of false-negative results due to the mechanical breakdown of the clot).

Interpretation of the test results should be made according to the following scale:



- negative: no clot
- + positive: weak uncompact clot
- 2+** positive: weak compact clot
- 3+** positive: strong compact clot
- 4+** positive: the clot occupies the whole volume of the tube and does not move when the tube is inverted.

NOTE: Some strains of *Staphylococcus aureus* produce fibrinolysin - an enzyme that breaks down clots. This may cause false-negative results after 24 ± 2 hours, therefore the tubes should be observed not only after 24 ± 2 hours, but also after 2, 4, 6 hours from the start of incubation.

Staphylococcus aureus strains cause coagulation of rabbit plasma within half an hour to 24 hours. Usually the plasma is completely clotted (solid form in the tube) but any degree of clotting should be considered as a positive result.

An instructional video with detailed information on how to perform the tube method test and how to interpret the obtained results is available on our website: <http://immunolab.com.pl/film>.

Procedure for determining bound coagulase (clumping factor) using glass slide method

1. Place two drops of physiological saline solution next to each other on a clean, dry glass slide.
2. In both drops suspend the same bacterial culture taken from a non-selective agar medium. The suspensions should be dense and homogeneous.
3. Add 10 µl of rabbit plasma to one of the drops with a sterile bacteriological loop and mix gently.
4. Gently rock the slide in a circular motion. Observe the result of the reaction.

Interpretation of the test results

If characteristic clumps (precipitates) appear within **60 seconds** of adding rabbit plasma, then the result should be considered positive.

NOTE: The negative control (bacterial suspension without the addition of rabbit plasma) should remain homogeneous. Otherwise, the tested strain shows autoagglutination, which means that the clumping factor cannot be determined.

The reaction is more visible if it is observed over a dark background.

An instructional video with detailed information on how to perform the glass slide method test and how to interpret the obtained results is available on our website: <http://immunolab.com.pl/film>.

Quality control performed by user

During the application of plasma it is recommended to perform control tests using standard coagulase-positive and coagulase-negative strains in order to verify the correct performance of the method and the effectiveness of plasma, proceeding similarly as in the case of tested strains.

Limitations of the method

Besides *Staphylococcus aureus*, coagulase-positive bacteria that could react with rabbit plasma include other bacteria of the *Staphylococcus* genus, such as *S. anaerobius*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. lutrae* and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. However, these bacteria are less common than *Staphylococcus aureus* and are mainly responsible for infections in animals.

It should be noted that **not all** strains of *S. aureus* produce the coagulase enzyme and those are considered atypical. This means that some strains (especially clinical isolates or those showing methicillin resistance) may give a negative result in the test for the presence of free or bound coagulase.

For analysis, only pure bacterial cultures of staphylococci should be used. The presence of citrate may cause false positive reactions with other microorganisms (e.g. *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, bacteria belonging to the *Pseudomonas* and *Streptococcus* genre).

Materials required to perform the assay not included in the kit

Dark background, physiological saline, sterile deionized water, droppers, test tubes, Petri dishes, glass slides, sterile pipette tips, container for contaminated materials, an instructional video (available on our website: <http://immunolab.com.pl/film>).

Validation and verification of the method

| | |
|------------------------|---|
| sensitivity | free coagulase: 100% (38/38) clumping factor: 100% (35/35) (number of true positive results/ sum of true positive and false negative results) |
| specificity | free coagulase: 100% (14/14) clumping factor: 100% (16/16) (number of true negative results/ sum of true negative and false negative results) |
| repeatability | free coagulase: 100% (156/156) clumping factor: 100% (147/147) (number of repeated compatible results/total number of results) |
| reproducibility | free coagulase: 100% (149/149) clumping factor: 100% (141/141) (number of reproduced compatible results/ total number of results) |

Storage conditions

- The lyophilized plasma should be stored at a temperature of **+2 to +8°C**.
- Transport for up to 3 days at temperatures not exceeding +15 to +25°C does not change the properties of the product.
- Do not use after the expiration date on the packaging.
- The expiration date applies to the product in intact packaging, stored in accordance with the instructions.

- The plasma is a reusable product.
- **Reconstituted plasma** should be stored at a temperature of **+2 to +8°C** no longer than **14 days** from the date of rehydration or at a temperature of **-20°C** no longer than **30 days**.
- Protect from light.
- Do not use plasma if it is cloudy or has clotted. If the plasma is difficult to dissolve, do not use it.
- Do not use plasma with altered physico-chemical properties indicating microbiological contamination. Do not sterilize plasma prior to use.

Precautions

- The product does not pose a threat to the environment or human health if used in accordance with the instructions.
- Aseptic working conditions must be observed and precautions against microbiological hazards should be taken during all procedures.
- The instructions for use must be strictly followed.
- Any serious incident involving the device should be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user resides or has his place of business.

Precautions when working with infectious material:

- Rabbit plasma contains animal-derived material so should be treated as potentially infectious material and handled accordingly.
- The test may involve working with pathogenic bacteria so all necessary precautions for working with infectious microbiological material should be observed. Wear protective clothing and gloves. Collected material for testing and material on slides and in tubes should be protected from access by third parties due to the possibility of infection. Used slides, test tubes and other contaminated materials, should be sterilized in an autoclave or disposed of in accordance with the laboratory's standard procedures.

Contents of a single package

1 vial contains 2ml of lyophilized plasma.

When rehydrated it allows approximately 4 tests for determining free coagulase or approximately 200 tests for determining bound coagulase.



Manufacturer

Research and Development Department of Salmonella Center "IMMUNOLAB" Ltd.

Address: ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk, Poland

Phone/Fax: 0048 58 781-44-91

E-mail: info@immunolab.com.pl

www.immunolab.com.pl

Explanation of the symbols used



Manufacturer



Expiration date : YYYY-XX-Z (year-month-day)



Batch code (Lot)



Consult instructions for use



Catalogue number



Storage temperature limit



In vitro diagnostic medical device



Transport temperature limit up to 3 days