

USO PREVISTO

El plasma de coagulasa de conejo es un plasma de conejo estandarizado, liofilizado, empleado para la detección cualitativa de la enzima coagulasa producida por *Staphylococcus aureus*.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LAS PRUEBAS

La diferenciación entre *Staphylococcus aureus* y las especies coagulasa negativas, incluidos *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*, es fundamental no sólo porque *Staphylococcus* supone un riesgo sanitario de la máxima importancia, sino también porque la última especie se asocia cada vez más a septicemia, endocarditis bacteriana, colonización de prótesis e infecciones de las vías urinarias. La identificación de los *Staphylococci* se basa en la morfología de las colonias, las características en cultivo y bioquímicas y el examen microscópico. Sin embargo, la detección de la coagulasa es el criterio más usado para la diferenciación entre las especies¹. La capacidad de *Staphylococcus* para producir coagulasa, una enzima capaz de coagular el plasma, fue comunicada por primera vez por Loeb en 1903². Desde entonces, muchos investigadores han intentado correlacionar la producción de coagulasa con la patogenia de los *Staphylococci*. Chapman, Berens, Nilson y Curcio, en un estudio de la producción de coagulasa y hemolisina por los *Staphylococcus*, demostraron que las cepas que producían coagulasa habitualmente eran patógenas, independientemente de sus propiedades hemolíticas o cromógenas³. La experiencia más reciente ha demostrado que la capacidad de un *staphylococci* para producir coagulasa no puede utilizarse como indicador constante fiable de su patogenia⁴.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El *Staphylococcus aureus* produce dos tipos de coagulasa, libre y unida. La coagulasa libre es una enzima extracelular producida cuando se cultiva el organismo en caldo. La coagulasa unida, conocida también como factor de aglutinación, permanece fijada a la pared celular del organismo.

La prueba en tubo consiste en la adición de *S. aureus* de un cultivo en caldo realizado durante una noche o de una placa de agar no inhibidora a un tubo de plasma de coagulasa rehidratado e incubación a 37°C. La formación de un coágulo en el plasma indica la producción de coagulasa. La prueba en tubo es el método más usado debido a su mayor exactitud y a su capacidad para detectar tanto la coagulasa unida como la libre. La prueba en portaobjetos se realiza haciendo una suspensión pesada del organismo a prueba en una gota de solución salina en un portaobjetos de vidrio limpio, luego se añade una gota de plasma y se observa si hay un coágulo. Esta prueba es menos exacta y está sometida a resultados falsos negativos relacionados con el tiempo y exige que los resultados negativos se confirmen con la prueba en tubo. La prueba de portaobjetos sólo es capaz de detectar la coagulasa unida.

REACTIVOS

El plasma coagulasa es plasma liofilizado de conejo al que se añade EDTA como anticoagulante. Las bacterias no utilizan el EDTA, por lo que no producirá reacciones falsas positivas de la coagulasa por las bacterias que utilizan citrato⁵.

El plasma de coagulasa de conejo se suministra en diversos tamaños:

Código del producto	Tamaño	Volumen para reconstitución	Número aproximado de pruebas
PL.850-3	10 viales/caja	3 ml/vial	6 x 10
PL.850-5	10 viales/caja	5 ml /vial	10 x 10
PL.850-10	Vial individual	10 ml/vial	20
PL.850-20	Vial individual	20 ml/vial	40
PL.850-30	Vial individual	30 ml/vial	60

RECONSTITUCIÓN

Reconstituya el plasma de coagulasa de conejo añadiendo agua estéril destilada o desionizada al vial en el volumen indicado en la etiqueta del producto. Mezcle por rotación suave del vial asegurando una disolución completa. Si, tras la reconstitución, el plasma no está en solución completa o si la fibrina se coagula o se forman hilos evidentes, deseche el plasma y estudie el pH del agua. Un pH ácido del agua podría producir un reactivo insatisfactorio.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Agua estéril destilada o desionizada
Asas de inoculación
Tubos de ensayo de 12 mm x 75 mm
Pipetas estériles de 1 ml
Baño maría (37°C)
Cepas de control positivas y negativas (véase Control de Calidad)

PRECAUCIONES

1. El plasma de coagulasa de conejo está pensado exclusivamente para uso diagnóstico in vitro.
2. No utilizar el reactivo después de la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta del producto.
3. Se deben tomar medidas de seguridad como si un organismo patógeno estuviera presente, cuando se manipulen, procesen y eliminen todas las muestras clínicas.
4. El dispositivo contiene material de origen humano y debe manejarse como potencial portador y transmisor de enfermedades.
5. Para obtener resultados válidos deben seguirse los procedimientos, condiciones de conservación, precauciones y limitaciones especificadas en estas instrucciones de uso.

ESTABILIDAD Y CONSERVACIÓN

1. Conserve los viales sin abrir a 2-8°C.
2. Conserve el plasma reconstituido a 2-8°C o la alícuota en volúmenes de 0,5 ml, congele rápidamente y conserve a -20°C. No lo descongele y lo vuelva a congelar.
3. Los viales de plasma de coagulasa no abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto cuando se conservan como se indica.
4. El plasma coagulasa reconstituido, si se mantiene sin contaminar, conservará la actividad durante cinco días cuando se conserve a 2-8°C o durante hasta 30 días cuando se formen alícuotas y se conserva a -20°C, no superando la fecha de caducidad de la etiqueta.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Determine que el cultivo de prueba es puro y tiene las siguientes características de *Staphylococcus aureus*.
 - a. Morfología (dependiente del medio)
 - Base de agar sangre con sangre de caballo del 5% - Opaca, amarilla a naranja, con hemólisis.
 - Agar coagulasa manitol – Opaca con zonas amarillas a naranja.
 - Agar de prueba de ADNasa con verde metilo – Eliminación de la tinción verde.
 - Agar manitol sal – Amarillo a naranja rodeada de zonas amarillas.
 - Medio 110 de *Staphylococcus* – Amarillo a naranja.
 - Agar telurita glicina – Negra.
 - Agar VJ – Negro, rodeado por zonas amarillas.
 - Agar Baird Parker – colonias brillantes de gris a negro, rodeadas por zonas de eliminación.
 - b. Tinción de Gram - Cocos grampositivos que aparecen en grupos en forma de racimos u, ocasionalmente, en cadenas.
 - c. Prueba de catalasa – positiva.
 - d. Fermentación del manitol – positiva.
2. Usando un asa bacteriológica estéril, transfiera una colonia bien aislada de cultivo puro a un tubo de Infusión Cerebro Corazón estéril. Incube a 37°C durante 18-24 horas o hasta que se observe un crecimiento denso. De forma alternativa, tome 2-4 colonias (un asa llena) directamente de un cultivo puro o de agar no inhibidor como inóculo en lugar del cultivo de caldo.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA DE COAGULASA

1. Usando una pipeta estéril de 1 ml, añada 0,5 ml del plasma reconstituido a un tubo de ensayo de 12 x 75 mm.
2. Usando una pipeta estéril de 1 ml, añada dos gotas del cultivo de caldo durante la noche del organismo de prueba al tubo o, usando un asa bacteriológica estéril, emulsifique cuidadosamente 2-4 colonias (un asa llena) de una placa de agar no inhibidora, en el tubo de plasma.
3. Mezcle suavemente.
4. Incube en un baño maría a 37°C durante 4-24 horas. Si es necesario usar un incubador, debe ser sin una atmósfera de CO₂ porque la presencia de CO₂ puede producir resultados falsos positivos.
5. Examine periódicamente si hay coagulación golpeando suavemente el tubo después de la primera hora y una vez cada hora en adelante hasta que hayan pasado cuatro horas. Si es necesario, reincube y examine después de 24 horas. Evite agitar el tubo durante la lectura. Pueden producirse resultados dudosos o falsos negativos debido a la desintegración del coágulo.
6. Registre los resultados.

CONTROL DE CALIDAD

Use los cultivos control positivos y negativos en paralelo con la prueba para valorar la validez de los resultados de la prueba.

Organismo

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228

Resultado esperado

Formación de coágulo

Sin formación de coágulo

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Resultados positivos: Cualquier grado de coagulación observado en el plasma de coagulasa en 24 horas.

Resultados negativos: Sin coagulación en el plasma de coagulasa.

LIMITACIONES

- 1. Cuando se usa el método de aglutinación en portaobjetos para determinar la actividad de la coagulasa en los Staphylococci, pueden producirse reacciones falsas positivas con algunas cepas cuando se usan plasmas de animal. Además, puede producirse aglutinación espontánea cuando se usan cultivos rugosos. Cuando se emplea el método de portaobjetos, todas las reacciones negativas deben confirmarse con la prueba en tubo.
- 2. Algunas especies u organismos utilizan citrato en su metabolismo y pueden dar reacciones falsas positivas para la actividad de la coagulasa. Normalmente, esto no produciría problemas porque la prueba de la coagulasa se realiza casi exclusivamente sobre Staphylococci. Sin embargo, es posible que bacterias que utilizan citrato contaminen los cultivos de Staphylococcus en los que se realiza la prueba de la coagulasa y pueden, con su incubación prolongada, dar resultados falsos positivos debido a la utilización del citrato. La presencia de EDTA en el plasma coagulasa debe superar este problema.
- 3. Cuando se comprueban los resultados en la prueba de coagulasa, deben observarse los tubos de forma horaria durante las primeras cuatro horas de la incubación. Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* producen fibrinolisisina que puede lisar coágulos formados antes. Si los tubos no se leen hasta 24 horas de incubación, puede producirse la reversión a un falso negativo.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

El plasma de coagulasa de conejo Pro-Lab se evaluó utilizando 30 cepas de *S. aureus* y 30 cepas de Staphylococci coagulasa negativos (2 *S. epidermidis*, 4 *S. warneri*, 2 *S. simulans*, 2 *S. hominus*, 2 *S. capitis*, 2 *S. cohnii*, 2 *S. auricularis*, 2 *S. xyloso*, 2 *S. sciuri*, 1 *S. oxford*, 3 *S. saprophyticus*, 1 *S. avium* y 5 *S. haemolyticus*). El Kit de coagulasa de conejo Pro-Lab identificó correctamente todas las cepas, lo que indica que el producto tuvo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 100% en el estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bannerman, T.L. and Peacock, S.J. (2007). Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci, In Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition. Editado por Murray, P.R., Baron, E.J., Landry, M.L., Jorgensen, J.H. and Pfaller, M.A. American Society for Microbiology, Washington, D.C. páginas 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. y 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. Editado por Williams and Wilkins. Baltimore. Páginas 484-489.

 = Fabricante

 = Representante Autorizado en la Comunidad Europea

 = Dispositivo para diagnóstico médico In vitro

 = Limite de temperatura

 = Consultar las instrucciones de uso

Las instrucciones de uso se tradujeron de manera profesional del inglés. En caso de ambigüedad o discrepancia evidente, por favor, dirijase al servicio de atención al cliente de Pro-Lab.