

**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 especies<sup>1</sup>. La capacidad de *Staphylococcus* para producir coagulasa, una enzima capaz de coagular el plasma, fue comunicada por primera vez por Loeb en 1903<sup>2</sup>. 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 cromógenas<sup>3</sup>. La experiencia más reciente ha demostrado que la capacidad de un *staphylococci* para producir coagulasa no puede utilizarse como indicador constante fiable de su patogenia<sup>4</sup>.

**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 2-4 colonias del aislado a un tubo que contiene plasma de coagulasa rehidratado e incubación a 37 °C durante hasta cuatro horas. La formación de un coágulo indica la producción de coagulasa. La prueba en tubo es el método más usado debido a su mayor exactitud y gracias a su capacidad para detectar tanto la coagulasa unida como la libre.

La prueba en portaobjetos se realiza haciendo una suspensión pesada del aislado de prueba en una gota de solución salina en un portaobjetos de vidrio limpio y después añadiendo una gota de plasma. Luego se mezcla suavemente con un asa y se examina en busca de aglutinación. Esta prueba es menos precisa que la prueba en tubo y requiere que todas las pruebas negativas se confirmen mediante la prueba en tubo. Esta prueba solo detecta 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 producirán reacciones falsas positivas de la coagulasa por las bacterias que utilizan citrato<sup>5</sup>.

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

Código del producto	Tamaño	Volumen para reconstitución	N.º aproximado de pruebas en tubo
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. Gire el vial con suavidad hasta que el producto se haya disuelto por completo. Si el producto no se disuelve por completo o si contiene fibras o coágulos de fibrina, no utilice el producto.

**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)  
 Portaobjetos de vidrio  
 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. Deben adoptarse precauciones universales al manipular, procesar y desechar todas las muestras clínicas y reactivos.
4. El reactivo contiene material de origen animal 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. Conservar los viales sin abrir ni reconstituir a 2-8 °C.
2. Conservar los viales reconstituidos de plasma a 2-8 °C o la alícuota en volúmenes de 0,5 ml, congelar rápidamente y conservar a -20 °C. No descongelar y volver a congelar.
3. Los viales sin abrir ni reconstituir permanecerán estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto si se conservan según lo indicado.
4. El plasma reconstituido permanecerá estable durante cinco días si se conserva a 2-8 °C o durante hasta 30 días cuando se formen alícuotas y se conserve a -20 °C, sin superar la fecha de caducidad que se indica en la etiqueta.

**PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

1. Determinar que el aislado de prueba sea puro y tiene las siguientes características de *Staphylococcus aureus*:
  - morfología apropiada en el medio de aislamiento.
  - cocos grampositivos
  - catalasa positiva.
2. Usar 2-4 colonias (un asa completa) del organismo de prueba.

**PROCEDIMIENTO DEL TEST**
**A. Prueba de coagulasa en tubo**

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 un asa estéril, emulsifique 2-4 colonias del organismo de prueba en el plasma.
3. Mezclar con suavidad.
4. Incube en un baño maría a 37 °C durante 4 horas.
5. Después de 1 hora, examine si se han formado coágulos golpeando suavemente el tubo contra su lado. Si no se observa formación de coágulos, examinar cada 30 minutos hasta el límite de 4 horas.
6. Si no hay coágulos después de 4 horas de incubación, reincubar la prueba a temperatura ambiente durante el periodo de tiempo restante y examinar si hay formación de coágulos a las 24 horas. No reincubar las pruebas que ya hayan producido un coágulo a las 4 horas, ya que algunas cepas de *S. aureus* producirán una fibrinolisis que puede lisar los coágulos si se continúa la incubación.
7. Registre los resultados.

**B. Prueba de coagulasa en portaobjetos**

(Detecta la coagulasa unida o el factor de aglutinamiento)

1. Coloque una gota del plasma reconstituido y una gota de solución salina una junto a otra en un portaobjetos de vidrio limpio y seco.
2. Emulsifique un asa llena de las colonias que van a analizarse en la gota de plasma y en la solución salina.
3. Observar si hay coágulos visibles durante hasta un minuto.
4. 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	Resultado esperado de la prueba en tubo	Resultado esperado de la prueba en portaobjetos
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Formación de coágulo	Formación de aglutinamiento
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Sin formación de coágulo	Sin formación de aglutinamiento

**INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**
**A. Prueba de coagulasa en tubo**

- **Resultado positivo:** Cualquier grado de coagulación en el plasma de coagulasa observado en 24 horas.
- **Resultado negativo:** Sin coagulación en el plasma de coagulasa.

**B. Prueba de coagulasa en portaobjetos**

- **Resultado positivo:** Aglutinación macroscópica en el plasma en un minuto y sin aglutinación en la solución salina.
- **Resultado negativo:** Sin aglutinación en el plasma ni en la solución salina.
- **Resultado no interpretable:** Si se observa aglutinación en ambas pruebas, indica que el aislado se ha autoaglutinado y no es válido para la prueba de aglutinación en portaobjetos. Si se observa esto, debe probarse el aislado usando la prueba de coagulasa en tubo.

## LIMITACIONES






1. Aunque las pruebas de coagulasa en tubo y en portaobjetos tienen una concordancia excelente, pueden producirse falsos positivos en pruebas de coagulasa en portaobjetos con otras especies de estafilococos que produzcan factor de aglutinación, que incluyen cepas de *S. lugdenensis* y *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*.
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 cada 30 minutos durante las primeras cuatro horas de incubación. Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* producen fibrinolisis, que puede lisar los 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., Tenover, J.C. and Tenover, 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.**