

Finalidade:

Diferenciação bioquímica do *Staphylococcus aureus* através da prova de coagulase.

Registro ANVISA:

10097010135

Apresentação:

570204 - COAGUPLASMA ESTAFILOCOCOS 3mL CX 5FR

LB 170727
Rev. 14 – 08/2024

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos gram-positivos, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (acnes, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, seps e outras).

As toxinas são proteínas produzidas e secretadas ou expostas à superfície pela bactéria cuja atividade é destrutiva para as células humanas.

Outras toxinas que o *S. aureus* possui em comum com outros estafilococos:

- Cápsula: Dificultam a fagocitose
- Proteína A: presente na parede celular do *S. aureus*. Ela prende anticorpos circulantes da classe IgG, pela sua região constante Fc, neutralizando a sua função. Impedindo a adesão de imunoglobulinas, não deixando assim à ativação do complemento.
- Toxina alfa: forma poros na membrana das células destruindo-as. É frequente atacar as células de músculo liso vasculares, mas ataca qualquer tipo de célula, como eritrócitos.
- Toxina beta ou esfingomielase C: hidrolisa (degrada) determinados lipídios, como esfingomielina e lisofosfatidilcolina da membrana celular. Desta forma, destrói muitos tipos de células.
- Toxinas esfoliativas: presentes nas estirpes (5-10%) que causam síndromes esfoliativas da pele. Há duas formas ETA e ETB (toxinas esfoliativas A e B). São proteases de serina que destroem os desmossomas que unem as células da pele umas às outras, resultando em perda da camada superior da pele (esfoliação).
- Enterotoxinas: resistentes aos sucos agressivos gastrointestinais, são produzidas por 30-50% das estirpes de *S. aureus*. Provocam ativação imprópria do sistema imune, levando à produção de citocinas, causando danos aos tecidos. A gastroenterite é causada pelo consumo de alimentos contaminados por *S. aureus*.
- Toxina da síndrome de choque: é um superantígeno, ou seja, ativa de forma não específica os linfócitos, gerando reações imunitárias desproporcionadas e danosas para o indivíduo.

Doenças causadas pelo *S.aureus*

- Síndrome de choque tóxico: devido à produção de toxinas de choque tóxico. Ocorre especialmente em mulheres que usam tampões que utilizam fibras sintéticas e produtos químicos que aumentam a absorção durante a menstruação. Esta doença potencialmente mortal (5% dos casos resultam em morte), inicia-se abruptamente, com hipotensão, febre e eritemas difusos. Pode haver choque séptico e perda de consciência, seguida de insuficiência de múltiplos órgãos. O tratamento com antibiótico é a única cura e deve ser administrado de emergência.
- Gastroenterite estafilocócica: devido à presença de enterotoxinas na comida ingerida, e não a uma infecção. Comum em presunto e outras carnes com sal, que não apresentam nenhum sinal ou gosto diferente. Caracteriza-se por aparecimento súbito (após 4h) de vômitos, diarreia aquosa e dores abdominais.
- Síndrome de pele escaldada estafilocócica: devido a *S.aureus* produtor da toxina esfoliativa. Caracteriza-se por aparecimento súbito de eritemas (zonas vermelhas dolorosas) que começam em redor da boca e se espalham para o resto do corpo. Formam-se bolhas de líquido claro, e pequenos toques chegam para remover a

pele. As zonas esfoliadas (sem pele) podem dar oportunidade a outros invasores. Se não houver complicações desse tipo, resolve-se em uma semana.

- Impetigo: é uma infecção da pele, que toma a forma de uma mácula (pequena mancha vermelha) e progride para pústula cheia de pus. Esta pode romper, e espalhar-se para outras regiões.
- Folliculite: é uma infecção com pus de um folículo piloso. Pode progredir para furúnculo com nódulo grande e vermelho e depois para carbúnculo e estender-se para o tecido cutâneo. Em feridas, pode causar infecções se houver material estranho onde esteja em reserva alimentando-se do sangue da hemorragia.
- Endocardite: infecção no coração após circulação pelo sangue (bacteremia). Mortalidade de 50%. Febre e dores no tórax.
- Osteomielite: infecção da matriz interna óssea.
- Pneumonia: pode ocorrer por aspiração de comida semi-digerida (vômito, por exemplo).

Resistência

A resistência à penicilina foi detectada logo após o início de seu uso na década de 40. Essa resistência era mediada pela aquisição de genes que codificavam enzimas, inicialmente conhecidas como penicilinasas, e agora chamadas β-lactamases. Na década de 1950, a produção de penicilinasas pelos *S. aureus* passou a predominar nas cepas isoladas de pacientes hospitalizados.

Em 1960, a meticilina foi lançada no mercado como alternativa terapêutica para cepas produtoras de penicilinase, uma vez que essa droga não sofre ação dessa enzima. Porém, já em 1961, relatos de cepas também resistentes à meticilina passaram a ser descritos e foram identificados os denominados *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA).

2. COMPOSIÇÃO**Formulação**

Plasma de coelho liofilizado com EDTA

A fórmula pode ser ajustada e/ou suplementada, conforme necessário, para cumprir os critérios de desempenho.

3. AMOSTRAS**a- Tipos de amostras**

- A amostra consiste em colônias recentes de estafilococos (obtidas em 24h de incubação a 35±2°C em meios apropriados como Chapman, Manitol Salt Ágar, etc).
- O laboratório deve estabelecer critérios de coleta, rejeição e conservação das amostras, conforme sua política da qualidade.
- Sempre considerar as necessidades específicas dos microrganismos alvos das análises, microrganismos com necessidades especiais (suplementos específicos ou ambiente controlados) podem não apresentar crescimento adequado se semeados em meio de cultura que não apresente os requisitos mínimos.

b- Critérios de rejeição

Amostras providas de culturas velhas ou obtidas com meios cujo teor de sal seja insuficiente para estimular a bactéria a produzir coagulase intrínseca devem ser rejeitadas.

4. INFORMAÇÕES GERAIS DO PRODUTO

a- Princípio

O material de cultura a ser testado é incubado no plasma de coelho a 35±2°C por até 24h. A coagulação do plasma é sinal de positividade.

b- Armazenamento e estabilidade

Para fins de transporte, o produto pode permanecer em temperatura ambiente por até 72h. No laboratório os frascos devem ser armazenados em temperatura de 2 a 12°C, condições em que se mantém estáveis até a data de vencimento expressa em rótulo, desde que isento de contaminação de qualquer natureza. O uso de refrigerador tipo *frost-free* não é recomendado para meios de cultura devido ao efeito desidratante deste tipo de equipamento.

Conforme descrito em literatura, o laboratório deve retirar da refrigeração apenas a quantidade de produto que deverá ser utilizada em sua rotina e deixar estabilizar a temperatura ambiente.

c- Precauções e cuidados especiais

- O produto é destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;
- Uso restrito por profissionais;
- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;
- Não inalar ou ingerir;
- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para "Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A" para o manuseio seguro;
- Para acondicionamento e descarte do material usado, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Recomendamos o uso dos sacos Detrilab;
- Os procedimentos de manuseio referentes ao processamento e manuseio para o descarte deverá estar de acordo com a RDC 222, de 28 DE MARÇO DE 2018 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.
- Outras espécies de Estafilococos que podem ser coagulase positiva (*S. intermedius*, *S. hycus* e *S. delphini*) são consideradas como sendo de baixa incidência na clínica, por esta razão um resultado positivo para a coagulase é considerado presuntivamente como sendo *S. aureus*;
- Nos casos duvidosos recomenda-se o uso de outras provas diagnósticas, como as provas em látex;
- O uso de plasma humano não é recomendado (93% dos casos apresentam resistência à coagulase).

5. MATERIAIS NECESSÁRIOS (porém não fornecido)

- Banho-maria termostatizado ou estufa bacteriológica;
- Tubos de ensaio estéreis;
- Alça bacteriológica;
- Pipeta;
- Solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%).

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

6.1 Preparo do produto:

Usando uma pipeta estéril, adicionar 3mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%), aguardar alguns instantes e homogeneizar suavemente até a completa dissolução do produto.

OBS: Após reconstituído o coaguloplasma tem validade de uma semana refrigerado. Também pode ser fracionado em porções de 0,5 mL e congelado por um mês.

6.2 Diretamente a partir da cultura

- a- Colocar 0,5 mL de coaguloplasma em um tubo estéril;
- b- Com auxílio de uma alça bacteriológica, coletar uma alçada da colônia a ser analisada;
- c- Homogeneizar com a própria alça (atritando a ponta da alça nas paredes do tubo), não agitar;
- d- Incubar a 35±2°C por 4 horas.

OBS: Não agitar o tubo. Apenas incliná-lo suavemente para verificar a formação do coágulo.

6.3 Repicagem em caldo

- a- Incubar de 4 a 8 horas em caldo simples, as colônias a serem analisadas (obtidas a partir de meio seletivo);
- b- Após obter boa turvação, acrescentar 0,2 mL do caldo com crescimento a 0,5 mL de coaguloplasma;
- c- Misturar suavemente o tubo. Não agitar;
- d- Incubar conforme descrito no procedimento anterior;
- e- Após o início da incubação, observar o tubo inclinándolo para os lados suavemente a cada 30 minutos durante 4h (ou até um máximo de 24h) procurando a formação de um coágulo, que caracteriza a positividade da prova.

7. RESULTADOS

- Negativo: não há formação de coágulo (a solução fica líquida).
- Positivo: Qualquer presença de coágulo (total ou parcial). Não confundir com o crescimento bacteriano. Se não houver formação de coágulo em 4 horas, incubar por 24 horas.

8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 830/2023)

Os resultados falsamente aumentados ou diminuídos, riscos associados à instabilidade, que poderiam levar a resultados errôneos, danos relacionados ao usuário, podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Após abertos, os componentes tornam-se suscetíveis a contaminações químicas ou microbianas que podem inviabilizar sua utilização.
- Os reagentes se destinam ao uso diagnóstico *in vitro*, não devendo ser ingeridos ou entrar em contato com a pele e mucosas;
- Utilização de reagente vencido, contaminado ou em condições inadequadas.
- Não aguardar para que os reagentes atinjam a temperatura ambiente no momento do uso.
- Erro na conservação dos reagentes.
- Deve-se evitar o uso de materiais que possam contaminar os reagentes, tais como ponteiros plásticos de micropipetador reaproveitados ou tubos para a reação.
- Interpretação equivocada de resultados.
- Tempo excessivo ou insuficiente de incubação das reações. Tempo excessivo de incubação fornece resultados falsamente aumentados e tempo insuficiente fornece resultados falsamente diminuídos.
- Incubação em temperatura inadequada.
- Armazenamento ou transporte de amostra inadequado.
- Não utilizar a proporção amostra reagente sugerida na técnica.
- Todas as amostras devem ser manipuladas com extrema cautela, pois podem veicular diversas doenças infecto-contagiosas (hepatite, SIDA etc.).

9. CONTROLE DE QUALIDADE

- Materiais necessários

Cepas padrão: ATCC® (*American Type Culture Collection*) ou derivadas).

- Controle de qualidade recomendado:

Parâmetro	Resultado esperado
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Positivo (formação de coágulo)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 12228	Negativo (sem formação de coágulo)
Meio não inoculado	Liofilizado: pastilha seca de coloração creme. Após reconstituído: líquido opaco de coloração creme à levemente rosa, livre de partículas macroscópicas.

- Periodicidade

Testar a cada novo lote recebido ou em periodicidade estabelecida pelo próprio laboratório.

- Análise dos resultados

As cepas inoculadas no material devem apresentar características de crescimento esperados. Caso se constate algum problema ou diferença, os resultados de amostras clínicas não devem ser liberados até que as causas tenham sido apuradas devidamente e os problemas constatados sanados.

10. GARANTIA DA QUALIDADE

A Laborclin obedece ao disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário que:

- O usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;

- Os materiais estejam sendo armazenados em condições adequadas;

- Os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.

Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos junto ao site www.laborclin.com.br. Em caso de dúvidas ou outras informações, contatar o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027 ou pelo e-mail sac@laborclin.com.br. Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bannerman, T.L. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C, 2003.
2. Branson, D. Identification of micrococcaceae in clinical bacteriology. *Apl. , microbiol.*, 16:906-911, 1963.

3. Cadness-Graves, B.; Willians, R.; Harper, G.J. And Milles, A.A. Slide test for coagulase - positive staphylococci: *Lancet*, 1:736-738, 1943.
4. Chapin, K.C., and T.-L. Lauderdale. Reagents, stains, and media: bacteriology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C, 2003.
5. Graber, C.D.; Bolties, B.H. And Morilo, M. Comparison of slide and coagulase - mannitol agar methods for adducing staphylocoagulase. *Am. J. Med. Technol.*, 34, 211, 214, 1968.
6. Grummit, J.R. A plate test for staphylococcal coagulase. *J. Med. Lab. Techn.* 26:227-230, 1969.
7. MacFaddin, J.F. 1985. Media for the isolation – cultivation – maintenance of medical bacteria. Volume 1. Williams and Wilkins, Baltimore, London, 1985.
8. Murray, P.R. *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 7th ed, American Society for Microbiology 1999.
9. Silv- Koneman, Elmer; *et al.* Diagnostic Microbiology. Lippincott, USA, 5 ed., 1997.
10. Tager, M. Y Hales, H.B. Differences in the resistance of humans plasma to staphylocoagulase. *Yale J. Biol. Med.* 21:91-97, 1948.



Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda

CNPJ 76.619.113/0001-31
Insc. Estadual 1370012926
Rua Casimiro de Abreu, 521
Pinhais/PR CEP 83.321-210
Telefone 041 36619000

www.laborclin.com.br

Responsável Técnico:

Maire Wakamori – CRF/PR-20176
Serviço de Assessoria ao Cliente
SAC 0800-0410027
sac@laborclin.com.br

ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

	Código do produto		Número de lote
	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)		Produto para saúde para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Representante autorizado na Comunidade Européia
	Quantidade suficiente para <n> ensaios		Frágil, manusear com cuidado
	Esterilizado utilizando técnicas assépticas de processamento		Esterilização utilizando óxido de etileno
	Esterilização utilizando irradiação		Esterilizado utilizando vapor ou calor seco.
	Risco biológico		Cuidado. Importante consultar instruções de uso.
	Controle		Controle Negativo
	Controle Positivo		Manter seco
	Manter afastado da luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho
	Não utilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Terceira edição (24.08.2024)