

Instrucciones para uso de Staph-zym™

Revisión: DBV0014G
Fecha de publicación: 20.04.2007
Idioma: Español

Staph-zym™ Kit para identificación de estafilococos

Fabricante

ROSCO Diagnostica A/S, Taastrupgaardsvej 30, DK-2630 Taastrup, Dinamarca, www.rosco.dk

Uso previsto

Identificación *in vitro* de las especies del género *Staphylococcus*.

Fundamento

Staph-zym es un sistema de identificación combinada enzimático-antimicrobiana para el género *Staphylococcus*.

- El kit Staph-zym combina un total de 10 tests enzimáticos que utilizan unos comprimidos con sustratos convencionales modificados y cromogénicos contenidos en 11 minitubos contiguos dispuestos en un panel (el tubo No. 11 no contiene tableta, pero puede ser utilizado para hacer un test suplementario. Las enzimas preformadas contenidas en la suspensión bacteriana permiten la reacción de los sustratos contenidos en los comprimidos y, después de una incubación durante toda una noche a 35-37°C, se puede leer los resultados de las pruebas, como reacciones de color (ya sea por adición de reactivos, o sin ellos).¹
- Para la identificación de las especies del género *Staphylococcus*, son útiles los patrones de sensibilidad natural. Tras incubar durante toda la noche, se examinan las placas y se mide el diámetro de las zonas de inhibición alrededor de los comprimidos para interpretarlo de acuerdo con la tabla de interpretación de zonas (sensibles/resistentes) de cada comprimido. Para las pruebas de sensibilidad en agar de Mueller-Hinton, se utiliza Deferoxamine 250 µg (Diatabs), Novobiocin 5 µg, y Polymyxins 150 µg, (Neo-Sensitabs, en ambos casos).^{2,3}

Instrucciones de conservación

- 1) En el momento de la recepción, almacene el envase externo en un frigorífico a 2-8°C.
- 2) Es recomendable almacenar a temperatura ambiente los cartuchos con Novobiocin 5 µg y Polymyxins 150 µg, así como el vial con Deferoxamine 250 µg una vez estrenados. Si se encuentran a 2-8°C, deje que alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlos (½ hora- 1 hora). La fecha de caducidad y los códigos REF y LOT están marcados de forma individual, en cada artículo.

La fecha de caducidad de los paneles/cartuchos/viales es válida sólo en los paneles/cartuchos/viales con tapa y almacenados a la temperatura prescrita.

Reactivos

El kit Staph-zym comprende un panel Staph-zym con diez diferentes comprimidos de 6 mm incluidos en minitubos, destinados a la detección de actividad enzimática; además, para las pruebas de sensibilidad en agar, vienen tres comprimidos de 9 mm marcados con un código de cinco cifras.

Precauciones

Respete las instrucciones de uso. La eficacia del kit Staph-zym depende de la adecuada elección del inóculo y del tiempo de incubación, así como de la correcta interpretación del color y del diámetro de la zona después de la incubación. Al manipular los comprimidos de 9 mm, utilice pinzas. Los productos deberán ser manejados exclusivamente por técnicos que dispongan de la formación adecuada. Como precaución frente a los riesgos microbiológicos, se deberá esterilizar adecuadamente las muestras, los recipientes, los medios y los paneles después de su uso. A la hora de eliminar los paneles y las placas de agar con posibles patógenos, se los considera como residuos microbiológicos.

Muestras

Para distinguir los estafilococos de los micrococos (resistentes estos a la furazolidona), se utiliza Furazolidone 50 µg Neo-Sensitabs. Los análisis posteriores tendrán lugar sólo con las cepas sensibles a la furazolidona (estafilococos). La toma de muestras y la manipulación de las mismas deben ser conformes con las directrices recomendadas. La muestra debe ser un cultivo puro, totalmente típico de la especie cuya identificación deseamos.

Procedimiento

Materiales suministrados: 20 paneles de Staph-zym, 1 cartucho de Novobiocin 5 µg Neo-Sensitabs, 1 cartucho de Polymyxins 150 µg Neo-Sensitabs, y 1 vial de Deferoxamine 250 µg Diatabs. Una "Ficha de registro de Staph-zym" y un "Índice de Staph-zym".

Materiales necesarios pero no suministrados: Medio de cultivo, Aminopeptidase reagent (Rosco, nº 92231), N,N-dimetil- α -naftilamina, solución de ácido sulfanílico, Furazolidone 50 µg (Rosco, nº 74412), microorganismos para control de calidad y equipo de laboratorio necesario para efectuar la identificación, p. ej.: asas para inoculación, torundas, pipetas y recipientes colectores.

I. Instrucciones para uso

I.1. Instrucciones para uso en las pruebas de sensibilidad

I.1.1. Preparación del inóculo

Suspenda en 4-5 ml de solución de NaCl al 0,9 % varias colonias morfológicamente similares, obtenidas por cultivo (no selectivo) en una placa de agar durante 18-24 h, hasta obtener una turbidez similar a la del patrón McFarland 0,5. Si se prefiere un crecimiento semiconfluyente, diluya el patrón McFarland 0,5 en la proporción 1/100. No utilice agar-sangre con la Deferoxamine; emplee, en su lugar, el agar de Mueller-Hinton. Efectúe una prueba de sensibilidad normalizada.^{2,3}

I.2. Instrucciones para uso del panel

I.2.1. Preparación del inóculo

- escoja colonias bien aisladas y morfológicamente idénticas de la placa primaria (TSA + sangre) y prepare una suspensión en 3 ml de suero fisiológico (NaCl al 0,9%) hasta conseguir una turbidez que sea igual (como menos) a la del patrón nº 2 de McFarland.
- Utilice solamente cultivos recientes (18-24 horas).
- Efectúe un ensayo de pureza sembrando sobre una placa de agar no selectivo.

I.2.2. Inoculación e incubación

- Abra el panel y reparta la suspensión bacteriana en alícuotas de 0,25 ml entre los 10 tubos.
- Añada tres gotas de aceite de parafina estéril al tubo nº 7 (ADH) y cierre el panel presionando firmemente la tapa sobre todos los tubos (las dos asas mirando hacia direcciones opuestas).
- Incube a 35-37°C durante la noche (18-24 horas), p. ej. utilizando una bandeja para kits.

I.2.3. Lectura

Se efectúa la interpretación de las reacciones (positiva/negativa) por comparación del color, con la “Ficha de registro de Staph-zym” incluida en la caja.

- Abrir la mitad de la tapa flexible. Vierta tres gotas del Aminopeptidase reagent al nº 9 (PYR) (debe esperar cinco minutos antes de efectuar la lectura), así como una gota de la solución de N,N-dimetil- α -naftilamina y una gota de la solución de ácido sulfanílico al nº 8 (NO₃); por último, cierre el panel.
- Lea todas las reacciones: 1-10.
- El tubo ALK P (Nº 10) deberá tener color amarillo intenso para considerar que el resultado es positivo.
- La interpretación de las reacciones (positivo/negativo) está descrita con mayor detalle en la correspondiente tabla.

II. Resultados

- Las 10 pruebas están agrupadas de tres grupos de tres pruebas y 1 grupo de 1 prueba.. Los resultados negativos quedan registrados como “0”; los positivos quedan como “1” en la primera prueba de cada grupo (β -GLU, TRE, ADH y ALK P), como “2” en la segunda (ONPG, MAL y NO₃) y como “4” en la tercera (PGUA, URE y PYR) (véase la tabla de interpretación).
- Sumando los valores obtenidos en las pruebas (tres o una) de cada uno de los cuatro grupos, se obtiene un número de cuatro cifras.
- Se añade una quinta cifra, que corresponde al resultado de sensibilidad o resistencia a Novobiocin 5 μ g (NOVO-5), Polymyxins y Deferoxamine. Los resultados que expresan resistencia quedan registrados como negativos (“0”), mientras que aquellos que expresan sensibilidad aparecen como positivos (con la siguiente puntuación: “1” para NOVO-5; “2” para Polymyxins y “4” para Deferoxamine). Este número de cinco cifras constituye el denominado *perfil numérico del microorganismo desconocido*.
- Registre y calcule el *perfil numérico del microorganismo desconocido* utilizando la “Ficha de registro de Staph-zym”.

Ejemplo:

FICHA DE REGISTRO DE STAPH-ZYM

Prueba	β -GLU	ONPG	PGUA	TRE	MAL	UR	ADH	NO ₃	PYR	ALK P
Valores de los positivos	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1
Resultados	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+
SUMA de positivos	3			6			3			1
Sensible	NOVO-5		POLYMYXINS			DEFEROXAMINE		Código numérico: 3631-7		
	1		2			4				
Resistente	0		0			0		Identificación:		
SUMA	1= S(+)		2= S(+)			4= S(+)				

Compare el perfil numérico resultante con los perfiles facilitados en el Índice Staph-zym incluido en la caja.

Código numérico/Perfil numérico: 36317 **Identificación:** *Staphylococcus epidermidis*.

Resultados inesperados o no concluyentes:

Se recomienda repetir el ensayo, así como efectuar una prueba con cepas de CC. En algunos casos, puede ser útil recurrir a pruebas suplementarias o a una nueva muestra. Como alternativa, se puede enviar la cepa a un laboratorio de referencia para una identificación complementaria.

CONTROL INTERNO DE CALIDAD

Para supervisar los resultados de Roscozym, se deberá aplicar un procedimiento de control de calidad con cepas ATCC u otras cepas positivas o negativas conocidas. Se deberá realizar el control de calidad de acuerdo con procedimientos de control de calidad de laboratorio reconocidos. Más abajo, figuran los resultados positivos/negativos correspondientes a cepas ATCC. Un código numérico correcto para las respectivas cepas ATCC confirma la conformidad en las características de todo el procedimiento.

Tabla de control de calidad de Staph-zym

Valores de positivo	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	1	2	4	Código
Cepa ATCC	β-GLU	ONPG	PGUA	TRE	MAL	UR	ADH	NO ₃	PYR	ALK P	NOVO	POLY	DEF	
<i>S. aureus</i> , ATCC 25923	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	S	R	R	1371-1
<i>S. epidermidis</i> , ATCC 12228	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	S	S	S	3631-7
<i>S. haemolyticus</i> , ATCC 29970	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	S	S	R	5370-3

Las cepas ATCC citadas en la tabla de interpretación de Staph-zym deben ser utilizadas como cepas de control de calidad al efectuar las pruebas de sensibilidad.

Si se observa algún resultado aberrante en el control de calidad, se renunciará a notificar los resultados clínicos.

LIMITACIONES DEL MÉTODO

- El método Staph-zym deberá ser empleado sólo para diferenciar los distintos estafilococos.
- Se deberá utilizar cultivos de microorganismos que sean puros, ya que una población microbiana mixta daría lugar a resultados aberrantes.
- En unos pocos casos, serán necesarias otras pruebas adicionales para completar la identificación (véase el Índice de Staph-zym).
- El uso de Staph-zym para la identificación de estafilococos y la interpretación de los resultados requiere la presencia de un técnico experto en métodos microbiológicos generales y que sepa manejar de forma razonable conocimientos, experiencias, información sobre muestras, así como otros procedimientos pertinentes antes de dictaminar la identidad del microorganismo aislado.
- Los resultados de ensayos adicionales pueden afectar al resultado de la identificación final.

BIBLIOGRAFÍA

1. Instrucciones de uso de Neo-Sensitabs. www.rosco.dk
2. Guía del usuario de Neo-Sensitabs. www.rosco.dk
3. Guía del usuario de Diatabs. www.rosco.dk
4. Casals J.B., Pringler N. Staph-zym, a rapid identification system for staphylococci. Third European Congress of Clinical Microbiology, The Hague, May 1987.
5. Casals J.B., Pringler N. The Value of 3 Tests in the Identification of Staphylococci: Pyrrolidonyl Aminopeptidase (PYR) and Susceptibility towards Polymyxins and Furazolidone, Staphylococci Symposium, Society for Applied Bacteriology, Edinburgh, Scotland, July 1989.
6. De Paulis A et al. Five test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol., **41**, 1219-1224, 2003.
7. Heltberg O., Bruun B. Polymyxin susceptibility in Staphylococci differentiating coagulase-positive and coagulase-negative strains. Acta path. microbiol. immunol. Scand., sect B., **91**, 157-161, 1983.
8. Ieven M., Verhoeven J., Pattyn S.R., Goossens H. Rapid and Economical Method for Species Identification of Clinically Significant Coagulase-Negative Staphylococci. J. Clin. Microbiol., **33**, 1060-1063, 1995.
9. Kloos W.E., Schleifer K.H. Simplified scheme for routine identification of human staphylococcus species. J. Clin. Microbiol., **1**, 82-88, 1975.
10. Lämmler C. Evaluation of the Staph-Zym-System for Identification of *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus intermedius*. J. Vet. Med. B, **36**, 180-184, 1989.
11. Leung M. J et al. Case of *Staphylococcus schleiferi* Endocarditis and a Simple Scheme To Identify Clumping Factor-Positive Staphylococci. J. Clin. Microbiol., **37**, 3353-3356, 1999.
12. Refsahl K., Andersen B.M.. Coagulase-negative staphylococci. Identification and antibacterial resistance. Nord. Med., **106**, 228-231, 1991. Norwegian (abstract in English).
13. Renneberg J., Rieneck K., Gutschik E. Evaluation of Staph ID 32 System and Staph-Zym System for Identification of Coagulase-Negative Staphylococci. J. Clin. Microbiol., **33**, 1150-1153, 1995.
14. Watts J.L., Washburn P.J. Evaluation of the Staph-Zym System with Staphylococci Isolated from Bovine Intramammary Infections. J. Clin. Microbiol., **29**, 59-61, 1991.

Tabla de interpretación de Staph-zym

Nº de prueba	Componente del reactivo (principios activos, en cada comprimido)	Código marcado en el panel	Reactivo	Valor	Reacción positiva	Reacción negativa
1	Beta-Glucosidase (p-Nitrofenil-β-D-Glucopiranosido, 0,3 mg)	β-GLU	-	1	Amarillo	Incoloro
2	Beta-Galactosidase (o-Nitrofenil-β-D-Galactopiranosido, 0,4 mg)	ONPG	-	2	Amarillo	Incoloro
3	Beta-Glucuronidase (ácido p-Nitrofenil- β -D glucurónico, 0,3 mg)	PGUA	-	4	Amarillo	Incoloro
4	Trehalose (D-Trehalosa –dihidrato–, 2 mg)	TRE	-	1	Amarillo (naranja amarillento)	Rojo (rojo anaranjado)
5	Maltose (Maltosa –monohidrato–, 3 mg)	MAL	-	2	Amarillo (naranja amarillento)	Rojo (rojo anaranjado)
6	Urease (Urea, 8 mg)	UR	-	4	Rojo / violeta	Amarillo / naranja
7	Arginine Dihydrolyase (L-Arginina HCl, 3 mg)	ADH	Aceite	1	Rojo / violeta	Amarillo / naranja
8	Nitrate Reduction (Molibdato sódico, 40 µg; nitrato potásico, 4 mg)	NO ₃	I	2	Rojo / rosa	Incoloro (rosa claro)
9	Pyrrolidonyl Aminopeptidase (L-Pirrolidonil-β-naftilamida, 0,2 mg)	PYR	II	4	Rojo	Amarillo / verde
10	Alkaline Phosphatase (p-Nitrofenil-fosfato, 0,1 mg)	ALK P	-	1	Amarillo intenso	Incoloro (amarillo claro)

Nº de prueba	Principio activo, dosis	Código*	Valor	Diámetro de zona		Diámetro de zona		Zonas de CC	
				McFarland 0,5		Semiconfluente		<i>S. aureus</i> ATCC 25923 McFarland 0,5	<i>E. coli</i> ATCC 25922 McFarland 0,5
				S	R	S	R		
11	Novobiocin 5 µg	NOVO5	1	≥ 14 mm	≤ 13 mm	≥ 16 mm	≤ 15 mm	18-25	
12	Polymyxins 150 µg (Colistina)	CO150	2	≥ 14 mm	≤ 13 mm	≥ 16 mm	≤ 15 mm		19-24
13	Deferoxamine 250 µg (mesilato de deferoxamina)	DEFRX	4	> 9 mm ^a (cualquier zona)	9 mm (ninguna zona)	> 9 mm ^a (cualquier zona)	9 mm (ninguna zona)		

*) Código en los comprimidos.

Reactivo a añadir antes de la incubación

Aceite: Añada tres gotas de aceite de parafina estéril al tubo y cierre el panel.

Reactivos a añadir tras la incubación:

- I. Añada 1 gota de N,N-dimetil-α-naftilamina y 1 gota de solución sulfanilica. Efectúe la lectura en un plazo de 2 minutos.
- II. Añada 3 gotas del Aminopeptidase reagent (Rosco, nº 92231) y lea la reacción de color en un plazo de 5 minutos.

Comentarios

- a) En el caso de muchas cepas sensibles a la Deferoxamine, existe un desarrollo de pequeñas colonias dentro de la zona. Se debe medir la zona hasta las colonias de tamaño normal, sin tener en cuenta las menores.