

MASTALEX™ MRSA

RST501. Rychlý latexový test na slidech pro detekci proteinu 2' vázícího penicilin a pro konfirmaci Methicilin rezistentního zlatého stafylokoka (*Staphylococcus aureus*).

Použití pouze pro *in vitro* diagnostiku

OBSAH

MASTALEX™ - MRSA obsahuje následující komponenty:

1. Extrakční Reagencie 1 (zelené víčko). Připravena k použití. 1 x 10 ml 0,1M hydroxidu sodného.
2. Extrakční Reagencie 2 (žluté víčko). 1 x 2,4 ml 0,5M dihydrogenfosforečnanu draselného.
3. Testovací Latex (červené víčko). Připraven k použití. 1 x 1,2 ml latexových částic senzibilizovaných anti-PBP2' monoklonálními protilátkami.
4. Kontrolní Latex (bílé víčko). Připraven k použití. 1 x 1,2 ml nesenzitizovaných latexových částic.
5. 100 jednorázových míchadýlek
6. 1 balení po 24 4 jamkových reakčních karet (slidů).
7. Návodu k použití.

Latexové reagencie obsahují 0,08% azidu sodného jako konzervačního prostředku.

STABILITA A SKLADOVÁNÍ

Neotevřené skladujte při 2-8 ° C do data expirace uvedeného na štítku.

Po otevření by měl být MASTALEX™ MRSA skladován při teplotě 2-8 ° C a může být používán až do uplynutí doby použitelnosti vyznačené na obalu. **Reagencie nezmrazujte.**

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Použití pouze pro *in vitro* diagnostiku. Dodržujte bezpečnostní opatření schválených biologicky nebezpečných a aseptických technik. Souprava by měla být používána pouze řádně vyškoleným a kvalifikovaným personálem laboratoře. Před likvidací sterilizujte všechny biologicky nebezpečné odpady. Konzervant azid sodný může být při požití toxický a může reagovat s olovem a mědí a vytvářet vysoce explozivní soli. Vždy se odpadu zbavujte splachováním do kanalizace s velkým množstvím vody. Viz. bezpečnostní list.

POŽADOVANÝ ALE NEDODÁVANÝ MATERIÁL

Standardní mikrobiologické zásoby a vybavení jako jsou standardní 5μl kličky nebo sterilní jednorázové mikrobiologické kličky (vnitřní objem 1,5μl), varná vodní lázeň nebo topný blok, mikrofuga nebo stolní centrifuga, malé zkumavky a pipety.

POSTUP

A. Příprava vzorku

V testu by měly být použity čerstvé kultury organismů dříve identifikovaných biochemickými a morfoloickými testy jako např. *Staphylococcus aureus*, Gram pozitivní, koaguláza pozitivní koky. Organismy by měly být pěstovány na krevním agaru nebo jiném vhodném médiu při 35-37 ° C po dobu 18-24 hodin.

B. Extrakční postup

- Před použitím nechte reagencie MASTALEX™ MRSA vytemperovat na pokojovou teplotu.
- Kápněte 4 kapky (200μl) extrakční reagencie 1 do mikrozkušavky nebo jiné vhodné plastové zkumavky.
- Za použití standardní 5μl sterilní kličky, vezměte dostatečné množství buněk k vyplnění vnitřního průměru kličky a důkladně je suspendujte v tekutině. Celkový objem by měl být 3-5μl nebo přibližně 1,5 x 10⁹ buněk. Eventuálně by mělo být použito 25-30 malých kolonií (o průměru 0,5mm) nebo 4-5 velkých kolonií (o průměru 2,5mm). Pokud používáte 1,5μl jednorázové sterilní kličky, odeberte dostatečný počet buněk k vyplnění kličky a důkladně je suspendujte v tekutině. Opakujte podruhé. Dva vnitřní objemy kličky / zkumavky jsou ≈ 1,5 x 10⁹ buněk.
- Zavíčkujte zkumavku a umístěte jí do varné vodní lázně nebo topného bloku při 100 ° C na 3 minuty. Pokud používáte topný blok, zajistěte, aby zkumavky přesně pasovaly do bloku.
- Vyjměte zkumavky z vodní lázně nebo topného bloku a nechte je vychladnout na pokojovou teplotu. Doba ochlazení může být zkrácena, pokud jsou zkumavky umístěny ve studené vodní lázni nebo na ledu.
- Po vychladnutí přidejte do zkumavky 1 (50μl) kapku extrakční reagencie 2 a dobře promíchejte.
- Centrifugujte při 1500 g po dobu 5 minut, nebo ekvivalentně, tj. při 3000 rpm na 15 cm rotoru nebo 4500 rpm na 4,5 cm rotoru. Eventuálně může být použita mikrofuga po dobu 1-5 minut.
- Odstraňte supernatant ihned po centrifugaci a použijte ho jako testovací vzorek v latexaglutinačním postupu. **Poznámka:** - Ujistěte se, že vysrážený materiál není narušen a případně i použit v aglutinačním postupu, - hrozí riziko nespecifické aglutinace.
- Vzorek může být uchováván při teplotě 2-8 ° C pro pozdější využití v daný den nebo jej skladuje dlouhodoběji při teplotě -70 až -80 ° C. U vzorků skladovaných při -70 až -80 ° C se vyvarujte opakovaného zmrazování a rozmrazování.

C. Latexový aglutinační postup

Poznámka: - Ujistěte se, že latexové reagencie jsou zahřáté na pokojovou teplotu a že testovací a kontrolní latexové reagencie jsou před použitím dostatečně promíchány, aby bezprostředně před tímto použitím byla suspenze homogenní.

Poznámka: - při vícenásobném dávkování držte láhev zcela ve svislé poloze a lehce pauzujte mezi dávkováními kapek. Zabraňte, aby reagencie přišly při dávkování do přímého kontaktu se vzorkem na reakčních kartách. Po použití zajistěte, aby všechny lahvičky s reagencemi byly bezpečně uzavřeny.

- U každého vzorku, který má být testován, dejte 50 μl supernatantu do dvou kroužků předznačených na testovací kartě. Do jednoho kroužku přidejte 1 kapku (25μl) Test Latexu a do druhého kroužku přidejte jednu kapku (25μl) Kontrolního Latexu.
- Smíchejte dohromady supernatant a latex v každé jamce pomocí samostatných míchadýlek, jak je uvedeno, a rozprostřete směs v černém kruhu na reakční kartě. Míchejte slidem ručně nebo za pomoci mechanického míchadla po dobu 3 minut a sledujte okem aglutinaci.

3. Po třech minutách umístíte reakční karty na stůl a sledujte vznik případné aglutinace v černých kruzích, zaznamenejte výsledek.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

- Pozitivní aglutinační reakce pouze s Test Latexem a nikoli s Kontrolním Latexem znamená, že organismus obsahuje PBP2' a měl by být vyhodnocen jako meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA). Stupně pozitivity mohou být udávány takto:

Silná aglutinace proti jasnému pozadí	3+
Aglutinace proti mírně zakalenému pozadí	2+
Slabá aglutinace proti zakalenému pozadí	1+
Homogenní bílá suspenze bez viditelné aglutinace	-

- Negativní reakce s Test Latexem i Kontrolním Latexem naznačuje, že organismus neobsahuje žádný PBP2' a měl by být vyhodnocen jako meticilin-citlivý *Staphylococcus aureus* (MSSA).

- Je-li pozitivní aglutinační reakce viděna u Kontrolního Latexu, test by měl být klasifikován jako neurčitý a měl by se opakovat.

- K nespecifické reakci může dojít v případě, že je příliš velké množství použitých buněk.

- Neurčité výsledky by měly být znovu testovány. Je třeba zajistit, aby kroky při zahřívání a centrifugaci byly dodržovány tak, jak je uvedeno v postupu. Ohřívání delší než 5 minut, může vést ke snížení citlivosti a ohřívání po dobu 1 minuty nebo méně, může vést k nespecifické aglutinaci.

Pokud opakované testování vzorku stále dává neurčitý výsledek, měla by být použita jako alternativní metoda např. antimikrobiální testování citlivosti nebo testování pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

- Ve velmi vzácných případech může být výsledek falešně negativní, pokud izolovaný *S. aureus* produkuje nízké hladiny PBP2'. Doporučuje se, že alternativní postupy např. antimikrobiální testování citlivosti, by měly být provedeny podle standardních postupů např. Clinical and Laboratory Standards Inst.. (CLSI®).

- Negativní výsledky získané tímto kitem by měly být považovány za shodné s jinými klinicky relevantními daty při diagnostice infekce MRSA. Především je třeba provést test znovu, pokud v průběhu infekce *S.aureus* prognóza ukazuje selhání léčby apod.

OMEZENÍ POUŽITÍ

Test je určen pro pravděpodobnou identifikaci organismů MRSA. Jiné organismy produkující PBP2' mohou rovněž poskytnout pozitivní výsledek.

- Některé kmeny organismů mohou mít nízkou úroveň meticilinové rezistence nebo ve vzácných případech produkují PBP2' v malém množství. V takovýchto případech se doporučuje provádět testování antimikrobiální citlivosti.

- Meticilin-rezistentní koaguláza negativní stafylokoky (CNS) produkují PBP2' a tento kit detekuje jeho přítomnost, avšak plná validace jeho diagnostického využití pro CNS nebyla provedena. Tato souprava se tedy nedoporučuje pro testování CNS.

- Existují další mechanismy meticilinové rezistence, které nejsou detekovány tímto kitem, včetně hyperprodukce β-laktamázy (*BORSA* – borderline oxacillin resistant *Staphylococcus aureus*) a ostatních pozměněných PBPs (*MODSA* - modified *Staphylococcus aureus*).

- Test by neměl být prováděn na vzorku krevní kultury.

KONTROLA KVALITY

Zkontrolujte známky poškození. Kontrola kvality musí být provedena alespoň na jednom organismu, u kterého byla prokázána pozitivní reakce a alespoň na jednom organismu, u kterého byla prokázána negativní reakce. Nepoužívejte výrobek, pokud jsou reakce s kontrolními organismy chybné. Níže uvedený seznam ukazuje souhrn kontrolních kmenů, které může koncový uživatel snadno získat.

Testovaný organismus	Výsledek	
	Test Latex	Kontrolní latex
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Žádná aglutinace	Žádná aglutinace
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 33591 (MRSA)	Aglutinace	Žádná aglutinace

LITERATURA

Literatura je k dispozici na vyžádání.

IFU154 DNH 05/09 V8

MAST is a Registered Trademark

ATCC is a trademark of the American

Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA