

MAST® ASSURE STAPHYLOCOCCAL COAGULASE TYPING ANTISERA

χρήση

Σταθεροί αντιοροί σε υγρή μορφή για τον προσδιορισμό τύπων Σταφυλόκοκκου coagulase.

MONO ΓΙΑ IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ

Περιεχόμενα: Βλ. ετικέτα.

Σύσταση

Οι αντιοροί MAST® ASSURE παρασκευάζονται από κουνέλια υπερανοσοποιημένα με πρότυπα στελέχη θανατωμένων οργανισμών που έχουν γνωστούς ορότυπους ή αντιγόνα ειδικά στην ομάδα και περιέχουν 0.085% αζίδιο του νατρίου σαν συντηρητικό.

Σταθερότητα και αποθήκευση

Αποθηκεύστε όσο δεν έχει ανοιχτεί στους 2 να 8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Όταν ανοιχτούν, οι αντιοροί MAST® ASSURE πρέπει να αποθηκεύονται στους 2 να 8°C και μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέχρι την ημερομηνία λήξης στην ετικέτα. Μην καταψύχετε τα αντιδραστήρια.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Μόνο για in vitro διαγνωστική χρήση. Τηρήστε τις προβλεπόμενες προφυλάξεις για βιολογικούς κινδύνους και ασφατικές τεχνικές. Για χρήση μόνο από επαρκώς εκπαιδευμένο και πιστοποιημένο εργαστηριακό προσωπικό. Αποστειρώστε όλα τα βιολογικά επικίνδυνα απόβλητα πριν την απόρριψη. Το συντηρητικό αζίδιο του νατρίου μπορεί να είναι τοξικό αν καταποθεί και μπορεί να αντιδράσει με μολύβδινες και χάλκινες σωληνώσεις και να σχηματίσει άκρας εκρηκτικά άλατα. Πάντα να το απορρίπτετε μαζί με άφθονο νερό στην αποχέτευση. Αναφερθείτε στο Φύλλο Ασφάλειας Προϊόντος.

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Κοινά μικροβιολογικά αναλώσιμα και εξοπλισμός όπως loops, stick εφαρμογής, καθαρά γυάλινα slide μικροσκοπίου ή στειλικοί σε γυάλινα σωληνάρια, θρεπτικά υλικά MAST, αποτεφρωτήρες και επωαστήρες, κλπ, όπως επίσης:

- στείρο αλατούχο διάλυμα 0.85%
- αυτόκαυστο για 121°C ή συσκευή θέρμανσης βακτηριακών διαλυμάτων στους 100°C
- φυγόκεντρος για 3000 rpm.
- πλάσμα κουνελιού
- κανονικός ορός κουνελιού
- αραιωτικό για πλάσμα και ορό κουνελιού. Προτείνεται η χρήση διαλύματος 2% w/v πεπτόνης 1% w/v sodium citrate.

Διαδικασία

A. Προετοιμασία του διαλύματος αντιγόνου.

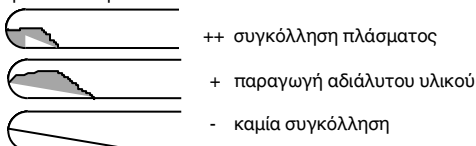
1. Εμβολιάστε μια αποικία του οργανισμού σε 5ml Mast Brain-Heart Infusion (BHI) Broth DM106 σε δοκιμαστικό σωλήνα 30ml και επώαστε στους 37°C τη νύχτα για να παραχθεί το ένζυμο coagulase.
2. Μετά την επώαση φυγοκεντρίστε το υγρό της καλλιέργειας στις 3000 rpm για 30 λεπτά, αφαιρέστε το υπερκείμενο και χρησιμοποιήστε το σαν το διάλυμα αντιγόνου για το τεστ.

B. Διαδικασία Ορότυποποίησης.

1. Προσθέστε 0.1ml αντιγονικού διαλύματος σε κάθε έναν από 9 μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες.
2. Στο σωλήνα 1 προσθέστε 0.1ml αντιορού type I, στο σωλήνα 2 προσθέστε 0.1ml αντιορού type II και στους σωλήνες 3-8 προσθέστε 0.1 ml αντιορών type III-VIII αντίστοιχα. Στο σωλήνα 9 προσθέστε 0.1ml 20 φορές αραιωμένου κανονικού ορού κουνελιού.
3. Αναμίξτε τα περιεχόμενα των σωληνίων χρησιμοποιώντας κατάλληλη συσκευή και αφήστε τα σε επωαστήρα στους 37°C για 1 ώρα.
4. Αφαιρέστε τους σωλήνες από τον επωαστήρα, προσθέστε 0.2ml αραιωμένο 10 φορές πλάσμα κουνελιού, αναμίξτε τα περιεχόμενα των σωληνίων με κατάλληλη συσκευή και τοποθετήστε σε επωαστήρα στους 37°C ξανά.
5. Παρατηρήστε τους σωλήνες για συγκόλληση μετά από 1 ώρα επώασης. Αν τα αποτελέσματα δεν είναι ξεκάθαρα, συνεχίστε την επώαση και παρατηρήστε τα αποτελέσματα μετά από 2 ώρες, 4 ώρες, 24 ώρες και 48 ώρες επώασης.

Ερμηνεία των Αποτελεσμάτων

1. Για να δείτε τα αποτελέσματα της συγκόλλησης κρατήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες και γείρετέ τους προς την οριζόντια θέση όπως φαίνεται παρακάτω.



2. Βεβαιωθείτε ότι υπάρχει συγκόλληση στο σωλήνα control. Αν δεν υπάρχει συγκόλληση στο σωλήνα control, επεκτείνετε το χρόνο επώασης όπως περιγράφεται στη παράγραφο **B** βήμα 5.
3. Αν βρεθεί συγκόλληση σε όλους τους σωλήνες εκτός από έναν, ο ορότυπος της coagulase του οργανισμού ελέγχου θεωρείται ότι είναι ο ορότυπος που αντιστοιχεί στον αντιορό στο σωλήνα όπου συνέβη αναστολή του σχηματισμού θρόμβου.

4. Αν βρεθεί αναστολή σε δύο ή περισσότερους σωλήνες, ο χρόνος επώασης θα πρέπει να αυξηθεί και να παρατηρηθούν ξανά τα αποτελέσματα, όταν μόνο ένας σωλήνας εμφανίσει αναστολή.
4. Αν μετά από 48 ώρες βρεθεί συγκόλληση στο σωλήνα control και αναστολή σε πάνω από έναν σωλήνα, ο οργανισμός θα πρέπει να θεωρείται ότι έχει πάνω από μία ιδιότητα coagulase.

Περιορισμοί Χρήσης

Μόνο καλλιέργειες οργανισμών που ταυτοποιήθηκαν σαν *Staphylococcus aureus* με μορφολογικές και βιοχημικές ιδιότητες θα πρέπει να ορότυποποιούνται με αυτό το προϊόν.

Σημείωση: Μερικά στελέχη οργανισμών μπορεί να έχουν ανεπαρκή ικανότητα παραγωγής coagulase, πράγμα που δυσκολεύει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Αν ο σωλήνας στον οποίο έχει προστεθεί κανονικός ορός κουνελιού σαν control δεν δείξει σημάδια συγκόλλησης μετά από 24 ώρες, προτείνεται η ενίσχυση της παραγωγής coagulase με μία από τις παρακάτω μεθόδους πριν τον επανέλεγχο του στελέχους.

Ενίσχυση της παραγωγής Coagulase

a) Ανακίνηση της καλλιέργειας

1. Προετοιμάστε δοχεία ανακίνησης που να περιέχουν BHI Broth έως το 1/10 - 1/5 του όγκου του δοχείου.
2. Εμβολιάστε μια αποικία του οργανισμού ελέγχου στο μέσο καλλιέργειας και καλλιεργήστε τον οργανισμό αερόβια στους 37°C για 10 να 12 ώρες, ανακινώντας στις 120 rpm.
3. Μετά την επώαση φυγοκεντρίστε το υγρό της καλλιέργειας στις 3000rpm για 30 λεπτά, αναρροφήστε το υπερκείμενο και χρησιμοποιήστε το σαν το αντιγονικό διάλυμα για το τεστ.

b) Broth συμπληρωμένο με πλάσμα κουνελιού

1. Προετοιμάστε και αποστειρώστε λίγο BHI Broth και προσθέστε σε αυτό διάλυμα stock πλάσματος κουνελιού, αποστειρωμένου με φίλτρο (φίλτρο 0.22μm), για να πάρετε τελική συγκέντρωση 10% v/v. Διανείμετε 3ml μέσου καλλιέργειας που περιέχει πλάσμα κουνελιού σε έναν μικρό στείρο δοκιμαστικό σωλήνα (περίπου 10ml).
2. Εμβολιάστε μια αποικία του οργανισμού ελέγχου στο μέσο καλλιέργειας και καλλιεργήστε τον οργανισμό αερόβια στους 37°C κατά τη νύχτα.
3. Διασπάστε το συγκολλημένο μέσο καλλιέργειας και ομογενοποιήστε με πιπετάρισμα πολλές φορές μέσα-έξω. Πάρτε το υγρό μέρος της καλλιέργειας και χρησιμοποιήστε το σαν το αντιγονικό διάλυμα.

c) Πλάκα agar που περιέχει πλάσμα κουνελιού για την επιλογή αποικιών που παράγουν coagulase

1. Προετοιμάστε και αποστειρώστε λίγο Nutrient Agar και θερμάνετε το στους 50°C σε υδατόλουτρο. Προσθέστε σε αυτό διάλυμα stock πλάσματος κουνελιού, αποστειρωμένου με φίλτρο (φίλτρο 0.22μm), για να πάρετε τελική συγκέντρωση 10% v/v και αναμίξτε καλά. Χύστε σε στείρα τρυβλία και αφήστε το να σταθεροποιηθεί.
2. Εμβολιάστε τα τρυβλία με τον οργανισμό ελέγχου και καλλιεργήστε τον οργανισμό αερόβια στους 37°C κατά τη νύχτα.
3. Μετά την επώαση μπορεί να παρατηρηθεί η παραγωγή coagulase αν τα τρυβλία φωτιστούν από κάτω, σαν λευκός δακτύλιος γύρω από τις αποικίες. Η ποσότητα της coagulase που παράχθηκε φαίνεται από τη διάμετρο του δακτυλίου. Επιλέξτε την αποικία με τον μεγαλύτερο δακτύλιο και εμβολιάστε την σε υγρό μέσο όπως περιγράφεται στην παράγραφο **b** παραπάνω.

Σημείωση: Μερικά στελέχη οργανισμών μπορούν να παράγουν μεγάλο ποσό coagulase, πράγμα που δυσκολεύει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Αν όλα τα σωληνάρια εμφανίσουν συγκόλληση μετά από 1 ώρα επώαση, η coagulase θα πρέπει να αραιωθεί με την ακόλουθη μέθοδο και να επαναληφθεί ο έλεγχος.

1. Προετοιμάστε σειριακές αραιώσεις 2-φορών του αντιγονικού διαλύματος από 1:2 έως 1:16 χρησιμοποιώντας το αραιωτικό.
2. Προσθέστε 0.1ml αντιγονικού διαλύματος σε κάθε αραιώση σε 4 μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες αντίστοιχα. Επίσης προσθέστε 0.1ml κανονικό ορό κουνελιού αραιωμένου 1:20 σε κάθε σωλήνα, αναμίξτε και επώαστε στους 37°C για 1 ώρα.
3. Προσθέστε 0.2ml κανονικό ορό κουνελιού αραιωμένου 10-φορές σε κάθε σωλήνα, αναμίξτε τα περιεχόμενα των σωληνίων με την ειδική συσκευή και τοποθετήστε στον επωαστήρα στους 37°C για 1 ώρα και ελέγξτε για συγκόλληση.
4. Χρησιμοποιήστε το αντιγονικό διάλυμα για τον έλεγχο (παράγραφος **B**) στην υψηλότερη αραιώση που εμφανίζει συγκόλληση εντός 1 ώρας επώασης.

Σημείωση: Μερικά στελέχη του *S.aureus* παράγουν το ένζυμο fibrinolysin που λυει το συγκολλημένο πλάσμα. Αν διενεργηθεί έλεγχος coagulase χρησιμοποιώντας τέτοιο στέλεχος, όταν παραχθεί το συγκολλημένο πλάσμα μπορεί να διαλυθεί ξανά. Επομένως θα πρέπει να δοθεί προσοχή κατά την παρατήρηση των αποτελεσμάτων.

Ποιοτικός Έλεγχος

Προτείνεται ο ποιοτικός έλεγχος να γίνεται με τουλάχιστον έναν οργανισμό για απόδειξη θετικής αντίδρασης και τουλάχιστον έναν οργανισμό για απόδειξη αρνητικής αντίδρασης. Μη χρησιμοποιείτε το προϊόν αν οι αντιδράσεις με τους οργανισμούς ελέγχου είναι λανθασμένες. Ελέγξτε για σημάδια φθοράς. Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια αν εμπολύνθηκαν ή είναι θολά.

Αναφορές

Παρέχεται βιβλιογραφία κατόπιν αίτησης.