

MAST® ALEX MRSA

RST501

Zamýšlené použití

Rychlý nátěrový latexový test pro detekci penicilin vázajícího proteinu (penicillin binding protein 2') a konfirmaci Methicilin Rezistentního *Staphylococcus aureus*.

POUZE PRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ IN VITRO

Složení

MAST-ALEX MRSA obsahuje následující komponenty:

1. Extrakční činidlo Extraction Reagent 1 (uzávěr zelené barvy). Připraveno k použití. 1 x 10 ml 0,1M hydroxidu sodného.
2. Extrakční činidlo Extraction Reagent 2 (uzávěr žluté barvy). 1 x 2,4 ml 0,5M dihydrogenfosforečnanu draselného.
3. Latexové činidlo Test Latex (uzávěr červené barvy). Připraveno k použití. 1 x 1,2 ml latexových částic senzibilizovaných anti-PBP2' monoklonálními protilátkami.
4. Latexové činidlo Control Latex (uzávěr bílé barvy). Připraveno k použití. 1 x 1,2 ml nesenzibilizovaných latexových částic.
5. 100 míchacích tyčinek k jednorázovému použití.
6. 1 balení 16 reakčních karet s pozicemi pro 6 reakcí.
7. Návod k použití.

Latexové reagenty obsahují konzervant 0,08% azid sodný.

Stabilita a skladování

Skladujte uzavřené při 2 až 8 °C do data expirace uvedeného na obalu. Po prvním otevření MAST-ALEX MRSA by měl být skladován při 2 až 8 °C a může být používán do data expirace uvedeného na obalu. **Nezmrazujte.**

Varování a bezpečnostní opatření

Pouze pro diagnostické použití *in vitro*. Dodržujte schválená opatření týkající se biologického nebezpečí a aseptické techniky. Určeno výhradně pro profesionální použití adekvátně proškolenou a kvalifikovanou osobou. Před likvidací sterilizujte veškerý biologický odpad. Konzervant azid sodný může být při požití toxický a může reagovat s olovem a mědí za vzniku vysoce výbušných solí. Vždy likvidujte propláchnutím velkým množstvím vody. Viz bezpečnostní list produktu.

Požadované materiály, které nejsou součástí balení

Standardní mikrobiologické potřeby a vybavení jako standardní 5µl kličky nebo sterilní jednorázové mikrobiologické kličky (vnitřní objem 1,5 µl), vodní lázeň nebo termoblok, mikrocentrifuga nebo stolní centrifuga, malé zkumavky a pipety.

Pracovní postup

A. Příprava vzorku

Čerstvá kultura mikroorganismu identifikovaná v předchozím biochemickém či morfologickém testu jako *Staphylococcus aureus*, tzn. mohou být pro test použity grampozitivní koaguláza pozitivní koky. Mikroorganismus by měl být kultivován na krevním agaru nebo jiném vhodném médiu při 35 až 37 °C po dobu 18 až 24 hodin.

B. Postup extrakce

1. Před použitím nechejte činidla MAST-ALEX MRSA vytemperovat na pokojovou teplotu.
2. Do zkumavky pro mikrocentrifugu nebo jiné vhodné plastové zkumavky přidejte 4 kapky (200 µl) extrakčního činidla Extraction Reagent 1.
3. Pomocí standardní sterilní 5µl kličky odeberte dostatečné množství buněk, aby vyplnily vnitřní průměr kličky a důkladně je suspendujte v připravené tekutině ve zkumavce. Celkový objem by měl být 3 až 5 µl nebo přibližně 1,5 x 10⁶ buněk.

Alternativně by mělo být použito 25 až 30 malých (průměr 0,5 mm) nebo 4 až 5 velkých (průměr 2,5 mm) kolonií. Použijete-li jednorázovou sterilní kličku o objemu 1,5 µl, odeberte dostatečný počet buněk, aby se klička naplnila, a důkladně je suspendujte v připravené tekutině ve zkumavce. Jedenkrát opakujte. Dva vnitřní objemy kličky/zkumavka ≈ 1,5 x 10⁶ buněk.

4. Uzavřete zkumavku a vložte ji na 3 minuty do vroucí vodní lázně nebo do termobloku nastaveného na 100 °C. Pokud používáte termoblok, ujistěte se, že zkumavky do něj těsně zapadají.
5. Vyjměte zkumavku z vodní lázně nebo termobloku a nechte ji vychladnout na pokojovou teplotu. Dobu chlazení lze zkrátit, pokud jsou zkumavky umístěny do studené vodní lázně nebo na led.
6. Po ochlazení přidejte do zkumavky 1 kapku (50 µl) extrakčního činidla Extraction Reagent 2 a dobře promíchejte.
7. Odstřed'ujte při 1500 g po dobu pěti minut nebo ekvivalentně, tj. 3000 rpm v 15cm rotoru nebo 4500 rpm v 4,5cm rotoru. Alternativně lze použít mikrocentrifugu po dobu 1 až 5 minut.
8. Ihned po centrifugaci odeberte supernatant a použijte jej jako vzorek podle postupu latexové aglutinace.

Poznámka: Zajistěte, aby vysrážený materiál nebyl narušen nebo použit při následném postupu latexové aglutinace, protože by mohlo dojít k nespecifické aglutinaci.

9. Vzorek lze skladovat při teplotě 2 až 8 °C pro pozdější použití v ten samý den nebo při teplotě minus 70 °C až minus 80 °C pro dlouhodobější skladování. U vzorků skladovaných při teplotě minus 70 °C až minus 80 °C se vyhněte opakovanému zmrazování a rozmrazování.

C. Postup latexové aglutinace

Poznámka: Zajistěte, aby lahvičky s latexovými činidly měly pokojovou teplotu a aby se latexová činidla Test Latex a Control Latex před použitím dostatečně protřepala, aby vznikla rovnoměrná suspenze přímo před použitím. **Poznámka:** Při

vícenásobném dávkování držte lahvičku ve zcela svislé poloze a mezi dávkováním jednotlivých kapek udělejte malou pauzu. Při dávkování nedovolte, aby se činidla dostala do přímého kontaktu se vzorkem na reakční kartě. Po použití se ujistěte, že jsou všechny lahvičky s činidly řádně uzavřeny.

1. Pro každý testovaný vzorek umístěte 50 µl supernatantu do dvou pozic předem označené reakční karty. Do jedné pozice přidejte jednu kapku (25 µl) latexového činidla Test Latex a do druhé pozice přidejte jednu kapku (25 µl) latexového činidla Control Latex.
2. Smíchejte supernatant a latexové činidlo v každé pozici vždy pomocí odlišné míchací tyčinky a rozetřete směs po černé ploše příslušné pozice na reakční kartě. Otáčejte náterem ručně nebo pomocí mechanické míchačky po dobu tří minut a pozorujte aglutinaci okem.
3. Po třech minutách položte reakční karty na stůl a pozorujte, zda se v pozicích objevují známky aglutinace. Výsledky zaznamenejte.

Interpretace výsledků

- Pozitivní aglutinační reakce pouze s latexovým činidlem Test Latex a nikoli s latexovým činidlem Control Latex znamená, že mikroorganismus obsahuje PBP2' a měl by být reportován jako předpokládáný methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA). Stupně positivity lze hodnotit následovně:

Silná aglutinace proti čírému pozadí.	3+
Agutinaace proti mírně zakalenému pozadí.	2+
Slabá aglutinace proti zakalenému pozadí.	1+
Homogenní bílá suspenze bez viditelné aglutinace.	-

- Negativní reakce s oběma latexovými činidly Test Latex i Control Latex znamená, že mikroorganismus neobsahuje PBP2' a měl by být reportován jako předpokládáný methicilin-senzitivní *Staphylococcus aureus* (MSSA).
- Pokud je zjištěna pozitivní aglutinační reakce s latexovým činidlem Control Latex, měl by být výsledek testu klasifikován jako nejednoznačný a opakován.
- Pokud je použito příliš velké množství buněk, mohou vzniknout nespecifické reakce.
- Vzorky s nejednoznačnými výsledky by měly být testovány znovu. V takovém případě se ujistěte, že zahřívání i centrifugace proběhly podle doporučeného postupu. Zahřívání po dobu delší než pět minut může vést ke snížení citlivosti. Zahřívání po dobu jedné minuty nebo kratší může vést k nespecifické aglutinaci. Pokud i při opakovaném testování vzorek vykazuje neurčitý výsledek, měla by být použita alternativní metoda, např. testování antimikrobiální citlivosti nebo polymerázové řetězové reakce (PCR).
- Ve velmi vzácných případech může dojít k falešně negativnímu výsledku, pokud izolát *S. aureus* produkuje nízké hladiny PBP2'. Doporučuje se, aby alternativní postupy testování antimikrobiální citlivosti byly prováděny podle standardních metod, např. podle Clinical and Laboratory Standards Inst. (CLSI®).
- Negativní výsledky získané pomocí této soupravy by při diagnostice infekce MRSA měly být brány v úvahu společně s ostatními klinicky relevantními daty. Zejména by mělo být provedeno opakované testování, pokud v průběhu infekce *S. aureus* prognóza naznačuje selhání léčby apod.

Limitace použití

- Test je určen k nepřímé identifikaci mikroorganismů MRSA. Pozitivní výsledek mohou vykazovat i jiné mikroorganismy produkující genový produkt PBP2'.
- Některé kmeny mikroorganismů mohou mít nízkou úroveň rezistence vůči methicilinu nebo ve vzácných případech produkují PBP2' v malém množství. V takových případech je doporučeno provést vhodné testování antimikrobiální citlivosti.
- Methicilin-rezistentní koaguláza negativní stafylokoky (CNS) produkují PBP2' a tato souprava dokáže zjistit jeho přítomnost, avšak úplná validace diagnostického použití pro CNS zatím nebyla provedena. Proto není tato souprava pro použití s CNS doporučena.
- Existují i jiné mechanismy rezistence k methicilinu, které tato souprava nedetekuje, včetně hyperprodukce β-laktamázy (BORSA – borderline oxacillin resistant *Staphylococcus aureus*) a jiných pozměněných PBPů (MODSA – modified *Staphylococcus aureus*).
- Test by neměl být prováděn z primárního vzorku, jako například z hemokultury.

Kontrola kvality

Zkontrolujte, zda nejsou patrné známky poškození. Kontrola kvality musí být provedena alespoň s jedním mikroorganismem pro průkaz pozitivní reakce, a alespoň s jedním mikroorganismem pro průkaz negativní reakce. Nepoužívejte soupravu, pokud jsou reakce s kontrolními mikroorganismy nesprávné. Níže uvedená tabulka předkládá přehled vhodných kontrolních kmenů, které jsou pro koncového uživatele snadno dostupné.

Testované mikroorganismy	Výsledek	
	Test Latex	Control Latex
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Bez aglutinace	Bez aglutinace
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 33591 (MRSA)	Agutinaace	Bez aglutinace

References

Seznam použité literatury je k dispozici na vyžádání.