



Mast Group Ltd.
Mast House, Derby Road,
Bootle, Merseyside, L20 1EA
United Kingdom
Tel: + 44 (0) 151 472 1444
Fax: + 44 (0) 151 944 1332
email: sales@mast-group.com
Web: www.mast-group.com



Mast Diagnostica GmbH
Feldstrasse 20
DE-23858 Reinfeld
Germany
Tel: + 49 (0) 4533 2007 0
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68
email: mast@mast-diagnostica.de
Web: www.mast-group.com

Mast Diagnostic
12 rue Jean-Jacques Mention
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1
France
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22
email: info@mast-diagnostic.fr
Web: www.mast-group.com



**Mast
Group**

MAST®ALEX MRSA

RST501

Uso previsto

Un examen rápido de látex en porta para la detección de la proteína vinculante de la penicilina y la confirmación de *Staphylococcus aureus* Resistentes a la Metilicina.

SOLAMENTE PARA USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*

Contenido

MAST®ALEX MRSA contiene los siguientes componentes:

1. Reagente de Extracción 1 (Tapa de color verde). Listo para usar.
1 x 10 mL de hidróxido de sodio 0.1M.
2. Reagente de Extracción 2 (Tapa de color amarillo).
1 x 2.4 mL de fosfato de potasio dihidrógeno 0.5M.
3. Examen de Látex (Tapa de color rojo). Listo para usar. 1 x 1.2 mL de partículas de látex sensibilizadas con anti-PBP2' anticuerpos monoclonales.
4. Látex de Control (Tapa de color blanco). Listo para usar.
1 x 1.2 mL partículas de látex insensibilizadas.
5. 100 aplicadores de Mezcla de un solo uso desechables.
6. 1 pack de 16 tarjetas de reacción de seis agujeros.
7. Folleto de instrucciones.

Los reagentes de látex contienen el 0.08% de sodio ácido como preservativo.

Estabilidad y almacenamiento

Almacenar sin abrir a 2 a 8°C hasta la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta del envase. Una vez abierto, MAST®ALEX MRSA debería ser almacenado a 2 a 8°C y usado hasta la fecha de caducidad dada en la etiqueta del envase. **No congelar los reagentes.**

Advertencias y precauciones

Exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*. Respetar las precauciones de seguridad y utilizar técnicas asépticas. Debe ser utilizado solo por personal de laboratorio cualificado y con experiencia. Antes del desecho, esterilizar todo el material biológico. El preservativo de sodio ácido puede ser tóxico si se ingiere y puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías para formar sales altamente explosivas. Siempre desear desechando engaujando con gran cantidad de agua. Referirse a la hoja de seguridad del producto.

Materiales requeridos pero no proporcionados

Accesorios y productos estándar para análisis microbiológico como por ejemplo bucles o lazos estándar de 5 µL o lazos microbiológicos estériles y desechables (volumen interno de 1.5 µL), hirviendo agua en una cubeta o fuente de calor, microfuga o banco de centrifugado, pequeños tubos y pipetas.

Procedimiento A. Preparación de la muestra

Los cultivos frescos de microorganismos previamente identificados mediante exámenes bioquímicos y morfológicos como *Staphylococcus aureus*, p.ej. Gram positivos, cocos coagulosa positivos, deberían ser usados en los exámenes. Los microorganismos deberían ser crecidos en un agar de sangre u otros medios adecuados a 35 a 37°C durante 18 a 24 horas.

B. Procedimiento de extracción

1. Dejar que los reagentes de MAST®ALEX MRSA equilibren a temperatura ambiente antes de su uso.
2. Dispensar 4 gotas (200 µL) de Reagente de Extracción 1 en un tubo de microfuga u otro tubo de plástico adecuado.
3. Usando un bucle o lazo estéril standard de 5 µL, tomar suficientes células para justo llenar el diámetro interno y uniformemente suspenderlas en el fluido. El volumen total deberían ser de 3 a 5 µL o aproximadamente células de 1.5 x 10⁷. Alternativamente 25 a 30 colonias pequeñas (diámetro de 0.5 mm) o 4 a 5 grandes (diámetro de 2.5 mm). Usando un bucle o lazo desechable de 1.5 µL tomar el suficiente número de células para llenar el bucle y suspenderlas uniformemente en el fluido. Repetir una segunda vez. Dos volúmenes internos del bucle/tubo ≈ 1.5 x 10⁷ células.
4. Tapar el tubo y colocarlo en una cubeta de agua hirviendo o bloque de calor a 100°C durante 3 minutos. Si se usa un bloque de calor asegurarse que los tubos encajan ajustadamente en el bloque.
5. Remover el tubo de la cubeta de agua o bloque de calor y dejar enfriar a temperatura ambiente. El tiempo de enfriamiento puede ser reducido si los tubos son colocados en un baño de agua fría o hielo.
6. Después de enfriar añadir una gota de 1 (50µl) de Reagente de Extracción 2 al tubo y mezclar bien.
7. Centrifugar a 1500 g durante cinco minutos o un equivalente p.ej.. 3000 rpm en un rotor de 15 cm o 4500 rpm en un rotor de 4.5 cm. Alternativamente, un microfuga puede ser usado durante 1 a 5 minutos.
8. Quitar el sobrante inmediatamente después de la centrifugación y usar como en el examen de muestra del Procedimiento de aglutinación de látex.

Nota:- Asegurarse que el material precipitado no esta perturbado ya que si se usa en el procedimiento de aglutinación podría ocurrir una aglutinación no específica.

9. La muestra debe ser almacenada a 2 a 8°C para su uso posterior o almacenada a menos 70 a menos 80°C para un almacenamiento a largo plazo. Para las muestras almacenadas de menos 70 a menos 80°C evitar volver al congelamiento y derretimiento.

C. Procedimiento de Aglutinación del Látex

Nota:- Asegurarse que las botellas de reagente de látex son llevadas a temperatura ambiente y que el examen y los reagentes de Látex Control son suficientemente agitados antes de su uso para dar una suspensión uniforme, directamente antes de su uso.

Nota:- cuando se esta multiplicando el dispensado mantener la botella en posición vertical y parar ligeramente entre el dispensado de gotas. No dejar que los reagentes se pongan en contacto directo con la muestra en la tarjeta de reacción cuando se esta dispensando. Después de su uso asegurarse de que las botellas de reagentes están cerradas de modo seguro.

1. Para cada muestra a ser examinada colocar 50 µL del sobrante en dos círculos de una Tarjeta de Examen etiquetada. A un círculo añadir una gota (25 µL) de Examen de Látex y al otro círculo añadir una gota (25 µL) de Látex Control.
2. Mezclar el sobrante y el látex juntos en cada agujero usando palillos mezcladores separados, y repartir la mezcla sobre el área negra del círculo en la tarjeta de reacción. Rotar el porta con la mano o usando una tabla de mezclador mecánica durante tres minutos y observar a ojo para ver la aglutinación.
3. Después de tres minutos, colocar las tarjetas de reacción en el banco y observar los círculos para ver signos de aglutinación y registrar los resultados.

Interpretación de resultados

Una reacción de aglutinación positiva Solamente con el Examen de Látex y no con el Control de Látex indica que el microorganismo contiene PBP2' y debería ser declarado como presunto resistente a la metilicina *Staphylococcus aureus* (MRSA). Los grados de positividad deberían ser puntuados como sigue:

Fuerte aglutinación contra un fondo claro.	3+
Agglutinación contra un fondo ligeramente turbio.	2+
Ligera aglutinación contra un fondo turbio.	1+
Suspensión blanca homogénea sin aglutinación visible.	-

- Una Reacción negativa con ambos Examen y Control de Látex indica que el microorganismo no contiene PBP2' y debería ser declarado como presunto sensible a la metilicina *Staphylococcus aureus* (MSSA).
- Si se ve una aglutinación positiva con el Látex de Control el examen debe clasificarse como indeterminado y repetido.
- Reacciones no específicas resultaran si la cantidad de células es bastante grande.
- Resultados indeterminados deben volver a ser vueltos a examinar. Cuando se haga asegurarse de que los pasos de calentamiento y la centrifugación son seguidos como se dice en el procedimiento. El calentamiento durante más de cinco minutos podría disminuir la sensibilidad y el calentamiento por más de un minuto o menos podría producir aglutinación no específica. Si no se vuelve a examinar la muestra todavía dará un resultado indeterminado, un método alternativo debería ser usado por ej. Susceptibilidad antimicrobiana o Exámenes de Reacción en Cadena a la Polimerasa (PCR).
- En casos muy raros, falsos negativos pueden resultar si el aislado de *S. aureus* produce niveles bajos de PBP2'. Se recomienda llevar a cabo procedimientos de susceptibilidad antimicrobiana siguiendo los métodos estándar e.j. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI®).
- Los resultados negativos obtenidos con este kit deberían de ser considerados a lo largo de otros datos clínicamente relevantes cuando se diagnostique una infección MRSA. En particular, volver a examinar si se presentan durante el curso de una infección de *S. aureus*, la prognosis indica un fallo en el tratamiento etc.

Limitaciones de uso

- El examen es designado para la presunta identificación de microorganismos MRSA. Otros microorganismos productores del gen PBP2' pueden dar también un resultado positivo.
- Algunas cepas de microorganismos pueden tener un nivel bajo de resistencia a la metilicina o en casos raros producir PBP2' en pequeñas cantidades. Adecuados exámenes de susceptibilidad antimicrobiana se recomiendan para dichos casos.
- Los estafilococos coagulosa negativos y resistentes a la Metilicina (CNS) producen PBP2' y este kit detectará su presencia, sin embargo, una completa validación de su uso diagnóstico para el CNS no ha sido hecha. Si es así no es recomendado para el uso con CNS.
- Existen otros mecanismos de resistencia a la Metilicina que no son detectados por este kit, incluyendo la hiper producción de β-lactamasas (BORSA- *Staphylococcus aureus* con resistencia límite a la oxacilina) y otros PBPs alterados (MODSA- *Staphylococcus aureus* modificado).
- El examen no debe de llevarse a cabo en una muestra directa como un cultivo de sangre.

Control de calidad

Comprobar si hay signos de deterioro. Se recomienda que el control de calidad se lleve a cabo con al menos un microorganismo que demuestre una reacción positiva y otro que demuestre una reacción negativa. No usar el producto si la reacción con el microorganismo de control es incorrecta. La lista de abajo ilustra una variedad de actuaciones de las cepas de control de uso rutinario, que el usuario final puede obtener facilmente.

Microorganismos	Resultado	
	Test látex	Control látex
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Ninguna aglutinación	Ninguna aglutinación
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 33591 (MRSA)	Agglutinación	Ninguna aglutinación

Referencias

Bibliografía disponible si se requiere.