



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

RST 501

Verwendungszweck

Ein Objektträger-Agglutinations-Schnelltest zur Identifizierung des Penicillinbindeproteins 2' und zur Bestätigung von Methicillin resistenten *Staphylococcus aureus*.

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Packungsinhalt

MAST®ALEX MRSA enthält die folgenden Bestandteile:

1. Extraktions-Reagenz 1 (mit grünem Deckel), gebrauchsfertig. 1 x 10 mL 0,1 M Natriumhydroxid.
2. Extraktions-Reagenz 2 (mit gelbem Deckel). 1 x 2,4 mL 0,5 M Kaliumdihydrogenphosphat.
3. Test-Latex-Reagenz (mit rotem Deckel), gebrauchsfertig. 1 x 1,2 mL Latexpartikel, beschichtet mit monoklonalen Anti-PBP2'-Antikörpern.
4. Referenz-Latex-Reagenz (mit weißem Deckel), gebrauchsfertig. 1 x 1,2 mL unbeschichtete Latexpartikel.
5. 100 Einmal-Stäbchen.
6. 16 Einmal-Testkarten mit je 6 Testfeldern.
7. Gebrauchsanleitung.

Die Latex-Reagenzien enthalten Natriumazid in einer Konzentration von 0,08 % als Konservierungsmittel.

Lagerung und Haltbarkeit

Alle Behälter fest verschlossen und trocken bei 2 bis 8°C bis zum auf dem Packungsetikett angegebenen Verfallsdatum lagern. Einmal geöffnet muss der MAST®ALEX MRSA-Kit bei 2 bis 8°C gelagert werden und kann bis zum Verfallsdatum verwendet werden. **Die Reagenzien nicht einfrieren.**

Vorsichtsmaßnahmen

Nur zur *In-vitro*-Diagnostik. Die Schutzmaßnahmen für den Umgang mit potenziell infektiösem Material beachten und nur unter sterilen Bedingungen arbeiten. Nur von geschultem Labpersonal durchzuführen. Den Abfall des potenziell infektiösen Materials vor der Entsorgung autoklavieren. Natriumazid (Konservierungsmittel) kann bei Einnahme toxisch sein und mit Blei- oder Kupferwasserleitungen unter Bildung von hoch explosiven Salzen reagieren. Es sollte daher zusammen mit viel Wasser in den Abfluss entsorgt werden. Bitte das Sicherheitsdatenblatt beachten.

Zusätzlich benötigte Materialien

Mikrobiologische Instrumente wie Standard-5 µL -Impfösen oder sterile Einmal-Impfösen (Volumen: 1,5 µL), Wasserbad oder Heizblock, Tischzentrifuge, Rührchen und Pipetten.

Testdurchführung

A. Probenvorbereitung

Frische Kulturen des Testorganismus, der bereits durch biochemische und morphologische Tests als *Staphylococcus aureus*, d.h. Gram-positive, Koagulase-positive Kokken, identifiziert wurde, für diesen Test verwenden. Die Organismen 18 bis 24 Stunden auf Blutagar oder einem anderem geeigneten Medium bei 35 bis 37°C kultivieren.

B. Extraktion

1. Die MAST®ALEXMRSA-Latex-Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.
2. 4 Tropfen (200 µL) des Extraktions-Reagenz 1 in ein Eppendorf-Gefäß geben.
3. Mit einer Standard-5 µL-Impföse die Zellen entnehmen, dass sie gerade den Impföseninnendurchmesser ausfüllen, und sie in der Flüssigkeit gründlich suspendieren. Das Endvolumen sollte 3 bis 5 µL oder ca. 1,5 x 10⁷ Zellen betragen. Alternativ 25 bis 30 kleine (Kolonie-Durchmesser ca. 0,5 mm) oder 4 bis 5 große (Kolonie-Durchmesser ca. 2,5 mm) Kolonien verwenden. Beim Einsatz einer 1,5 µL-Einmal-Impföse so viele Kolonien entnehmen, dass die Impföse ausgefüllt ist, und das Zellmaterial in der Flüssigkeit gründlich suspendieren. Diesen Vorgang ein zweites Mal wiederholen. Zwei Innen-Volumen der Impföse entsprechen ca. 1,5 x 10⁷ Zellen.
4. Das Rührchen verschließen und 3 min in einem kochenden Wasserbad oder Heizblock bei 100°C inkubieren. Bei Einsatz eines Heizblocks sollte garantiert sein, dass die Rührchen von allen Seiten vom Heizblock umschlossen sind.
5. Das Rührchen aus dem Wasserbad oder Heizblock entnehmen und auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Dies kann durch Verwendung eines kalten Wasserbades oder Eis beschleunigt werden.
6. Danach 1 Tropfen (50 µL) Extraktions-Reagenz 2 zum Rührchen hinzugeben und gut mischen.
7. 5 Minuten bei 1.500 x g oder 3.000 Upm in einem 15 cm-Rotor bzw. 4.500 Upm in einem 4,5 cm-Rotor zentrifugieren. Alternativ eine Mikrofuge für 1 bis 5 min verwenden.
8. Den Überstand als Testprobe in den Latex-Agglutinationstest einsetzen. **N.B.** Es ist wichtig, dass kein Pellet beim Abziehen des Überstandes mit aufgezogen wird, da dies unspezifische Agglutination hervorrufen kann.
9. Die Testprobe bei 2 bis 8°C bei Durchführung des Tests am gleichen Tag oder bei minus 70 bis minus 80°C bei späterer Testung lagern. Bei gefrorenen Proben ist das wiederholte Auftauen und Einfrieren zu vermeiden.

C. Latex-Agglutination

N.B. – Die Latex-Reagenz-Flaschen sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden, und die Test- und Referenz-Latex-Reagenzien sollten gut gemischt werden, damit eine homogene Suspension entsteht.

N.B. – Beim Tröpfeln sollte die Flasche vertikal gehalten werden und eine Pause zwischen 2 Tropfen gemacht werden. Es muss verhindert werden, dass die Reagenzien mit der Testprobe auf der Testkarte in Berührung kommen. Nach dem Gebrauch müssen alle Reagenz-Flaschen verschlossen werden.

1. Für jede Testprobe je 50 µL Überstand auf zwei Felder der gekennzeichneten Testkarte pipettieren. Zu einem Feld einen Tropfen (25 µL) Latex-Reagenz und zum anderen einen Tropfen (25 µL) Kontroll-Latex-Reagenz hinzugeben.
2. Den Überstand und das Latex-Reagenz auf jedem Feld mit verschiedenen Stäbchen vermischen und über das schwarze Feld der Testkarte ausstreichen. Die Karte drei Minuten mit der Hand hin- und herbewegen und mit dem bloßen Auge auf Agglutination kontrollieren.
3. Nach drei Minuten die Testkarten auf den Tisch legen und die Testfelder auf Agglutination kontrollieren. Alle Ergebnisse dokumentieren.

Interpretation der Ergebnisse

- Eine sichtbare Agglutination mit dem Latex-Reagenz und nicht dem Kontroll-Latex-Reagenz zeigt das Vorhandensein von PBP2' an. Der Testorganismus sollte als präsumtiver Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) dokumentiert werden. Die unten stehende Tabelle gibt Hilfen bei der Testauswertung:

Starke Agglutination mit klarem Hintergrund	3+
Agglutination mit leicht trübem Hintergrund	2+
Schwache Agglutination mit trübem Hintergrund	1+
Homogene weiße Suspension ohne sichtbare Agglutination	-

- Eine negative Reaktion bei Test- und Referenz-Latex-Reagenz zeigt das Fehlen von PBP2' an. Der Testorganismus sollte als präsumtiver Methicillin sensitiver *Staphylococcus aureus* (MSSA) eingestuft werden.
- Wenn sich eine positive Latex-Agglutinations-Reaktion mit dem Referenz-Latex-Reagenz zeigt, sollte der Test als ergebnislos eingestuft und wiederholt werden.
- Unspezifische Reaktionen treten auf, wenn zu viel Zellmaterial verwendet wird.
- Tests ohne eindeutiges Ergebnis sollten wiederholt werden. Es ist wichtig, dass die Inkubationstemperaturen und Zentrifugationszeiten strikt eingehalten werden. Wenn die Probe länger als 5 min erhitzt wird, kann die Testempfindlichkeit reduziert werden. Bei kürzerem Erhitzen (weniger als 1 min) kann unspezifische Agglutination auftreten. Wenn auch nach Wiederholung des Tests kein Ergebnis erzielt werden kann, sollten alternative Methoden angewendet werden, z. B. Anitbiotika-Empfindlichkeitstestung oder PCR.
- In seltenen Fällen können auch falsch-negative Reaktionen auftreten und zwar dann, wenn der zu testende *Staph. aureus* wenig PBP2' produziert. Wenn MHK-Werte ermittelt werden sollen, sollte nach Standard-Methoden wie dem Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) gearbeitet werden.
- Negative Ergebnisse, die mit Hilfe dieses Kits erzielt werden, sollten zusammen mit anderen klinisch relevanten Daten, die auf eine MRSA-Infektion hindeuten, betrachtet werden. Es sollten wiederholte Testungen erfolgen, wenn während des Verlaufs einer *S. aureus*-Infektion, eine Fehlbehandlung erfolgte.

Grenzen

- Der Test ist für die präsumtive Identifizierung von MRSA geeignet. Andere Organismen, die das PBP2'-Protein ebenfalls synthetisieren, können auch positive Ergebnis liefern.
- Einige Stämme weisen eine geringe Methicillinresistenz auf oder stellen lediglich geringe Mengen an PBP2' her. In solchen Fällen sollten geeignete Antibiotika-Empfindlichkeitstests durchgeführt werden.
- Methicillinresistente Koagulase negative Staphylokokken (CNS) synthetisieren PBP2' und werden ebenfalls von diesem Kit erfasst. Bisher gibt es allerdings keine Bestätigung, dass der Kit für die Diagnostika von CNS geeignet ist. Daher sollte er in diesem Zusammenhang nicht verwendet werden.
- Es existieren andere Methicillin-Resistenzmechanismen, die mit diesem Test nicht erfaßt werden, wie z.B. die Überproduktion von β-Laktamase (BORSA - borderline oxacillin resistant *Staphylococcus aureus*) oder veränderte PBPs (MODSA - modified *Staphylococcus aureus*).
- Der Test sollte nicht mit direktem Probenmaterial wie z.B. Blutkulturen durchgeführt werden.

Qualitätskontrolle

Das Produkt auf Anzeichen von Verfall überprüfen. Die Qualitätskontrolle muss mit mindestens einem Organismus durchgeführt werden, um das erwartete Ergebnis zu bestätigen. Wenn die Kontrollreaktion fehlerhaft ist, das Produkt nicht einsetzen. Die in der unten stehenden Tabelle angegebenen Referenzstämme sind kommerziell erhältlich und können vom Endkunden erworben werden.

Referenzstamm	Ergebnis	
	Latex-Reagenz	Kontroll-Latex-Reagenz
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Keine Agglutination	Keine Agglutination
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 33591 (MRSA)	Agglutination	Keine Agglutination

Referenz

Bibliographie auf Anfrage erhältlich.

IFU154 DE 08/20 V12

MAST ist ein registriertes Warenzeichen
ATCC ist das eingetragene Warenzeichen der
American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA