



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

Utilisation

Test rapide au latex pour la détection de la Pénicilline binding protein 2' (PLP2a) et la confirmation des *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

USAGE IN VITRO SEULEMENT

Composition

MAST® ALEX MRSA contient les produits suivants :

- Réactif d'extraction 1 (bouchon vert). Prêt à l'emploi. 1 x 10 mL d'hydroxyde de sodium 0,1 M.
- Réactif d'extraction 2 (bouchon jaune). 1 x 2,4 mL de phosphate de potassium dihydrogène 0,5 M.
- Latex Test (bouchon rouge). Prêt à l'emploi. 1 x 1,2 mL de latex sensibilisé avec l'anticorps monoclonal anti-PLP2a.
- Latex de contrôle (bouchon blanc). Prêt à l'emploi. 1 x 1,2 mL de particules de latex non sensibilisées.
- 100 bâtonnets à usage unique.
- 16 cartes de lecture à 6 zones.
- Notice d'emploi.

Les réactifs au latex contiennent de l'azote de sodium à 0,08 % comme conservateur.

Stabilité et stockage

Le coffret non ouvert se conserve à 2 à 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Après ouverture, MAST® ALEX MRSA peut être stocké à 2 à 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Ne pas congeler les réactifs.

Précautions d'emploi

Usage in vitro uniquement. Observer les précautions d'usage pour du matériel dangereux et les techniques aseptiques. A utiliser uniquement par du personnel formé et qualifié. Stériliser tous les déchets dangereux avant de les jeter. L'azote de sodium est un conservateur toxique en cas d'ingestion et qui peut réagir avec les canalisations en plomb et cuivre en formant des sels très explosifs. Rincer abondamment avec de l'eau. Se référer à la fiche de sécurité.

Matériels nécessaires non fournis

Fourniture microbiologique standard et équipement tel que des anses standard de 5 µL ou des anses stériles jetables (volume interne de 1,5 µL), bain-marie ou bain sec, centrifugeuse de paillasse, tubes et pipettes.

Procédure

A. Préparation de l'échantillon

Utiliser des colonies d'une culture jeune identifiée par les tests biochimiques et la morphologie comme *Staph. aureus*. Par exemple les cocci coagulase + et gram + doivent être testés. Les germes doivent être cultivés sur gélose au sang ou sur un milieu approprié à 35 à 37°C pendant 18 à 24 heures.

B. Procédure d'extraction

- Ramener les réactifs du coffret MAST® ALEX MRSA à température ambiante avant utilisation.
- Déposer 4 gouttes (200 µL) de Réactif d'extraction 1 dans un tube de centrifugation ou un autre tube en plastique approprié.
- Prélever suffisamment de cellules afin de remplir une anse calibrée stérile de 5 µL et remettre en suspension dans le liquide. Le volume total doit être de 3 à 5 µL ou approximativement 1,5 x 10⁶ cellules. Une autre possibilité consiste à prélever 25 à 30 petites colonies (0,5 mm de diamètre) ou 4 à 5 grandes colonies (2,5 mm de diamètre). Si une anse stérile jetable de 1,5 µL est utilisée, il faut prélever suffisamment de cellules pour remplir le cercle et bien remettre en suspension dans le liquide. Répéter une seconde fois. Deux volumes internes d'anse par tube ≈ 1,5 x 10⁶ cellules.
- Boucher le tube et le placer dans un bain marie ou un bain sec à 100°C pendant 3 minutes. Pour le bain sec bien contrôler que les tubes sont adaptés pour un bon contact dans le bloc de chauffage.
- Sortir le tube du bain marie ou du bain sec puis refroidir jusqu'à température ambiante. La durée du refroidissement peut être réduite si les tubes sont placés dans de l'eau froide ou de la glace.
- Après refroidissement ajouter une goutte (50 µL) de Réactif d'extraction 2 dans le tube et bien mélanger.
- Centrifuger à 1500 g pendant 5 minutes ou par exemple 3000 t/min pour un rotor de 15 cm ou 4500 t/min pour un rotor de 4,5 cm. Une autre possibilité consiste à utiliser une micro centrifugeuse pendant 1 à 5 minutes.
- Utiliser immédiatement le surnageant de centrifugation comme test échantillon dans la procédure d'agglutination au latex.

Remarque: s'assurer que le matériel précipité n'est pas utilisé dans la procédure d'agglutination car des agglutinations non spécifiques peuvent apparaître.

- L'échantillon testé peut être stocké à 2 à 8°C pour une utilisation différée dans la journée ou bien stocké à moins 70/moins 80°C pour une conservation plus longue. Pour les échantillons stockés à moins 70/moins 80°C éviter les congélations et décongélations répétées.

C. Procédure d'agglutination latex

Remarque : les flacons de réactifs au latex doivent être ramenés à température ambiante et les latex test et de contrôle doivent être suffisamment agités pour avoir une suspension homogène juste avant utilisation.

Lors de la distribution bien maintenir le flacon en position verticale et stopper légèrement entre deux gouttes. Ne pas laisser les réactifs du flacon entrer en contact avec l'échantillon à tester déposé sur la carte de lecture lors de la distribution. Après utilisation bien fermer les flacons de réactifs.

- Déposer 50 µL de surnageant d'échantillon dans deux cercles d'une carte préalablement identifiée. Ajouter dans un cercle une goutte (25 µL) de latex sensibilisé et dans le deuxième cercle une goutte (25 µL) de latex de contrôle.
- Bien homogénéiser le latex avant utilisation.
- Mélanger l'échantillon de surnageant et le latex dans chaque puits à l'aide des bâtonnets fournis et étaler le mélange sur toute la surface des cercles noirs de la carte de lecture. Agiter la plaque par une rotation manuelle ou à l'aide d'un plateau rotatif pendant 3 minutes. Observer l'agglutination à l'œil.
- Après 3 minutes d'agitation, poser la carte sur la paillasse et observer la présence ou non d'agglutination. Noter les résultats

Interprétation des résultats

- La présence d'agglutination du latex sensibilisé uniquement indique que la souche possède la protéine PLP2a et peut être déclarée SARM présomptive. Les degrés de positivité sont les suivants.

Agglutination forte sur fond limpide	3+
Agglutination avec une légère turbidité du fond	2+
Légère agglutination avec une turbidité du fond	1+
Suspension homogène blanche sans agglutination	-

- L'absence d'agglutination du latex sensibilisé et du latex de contrôle indique que la souche ne possède pas de PLP 2a et peut être déclarée *S. aureus* SASM (*S. aureus* sensible à la méthicilline) présomptive.
- La présence d'agglutination dans le puits du latex de contrôle indique une réaction douteuse. Le test doit être répété.
- Des réactions non spécifiques peuvent se produire si le volume de cellules utilisé est trop important.
- Les résultats douteux doivent être re-testés. Vérifier alors que les étapes de thermisation et de centrifugation sont effectuées selon la procédure. Si le deuxième test est à nouveau douteux, effectuer alors un antibiogramme ou une PCR.
- Dans de très rares cas, des résultats faussement négatifs peuvent apparaître pour des *S. aureus* produisant des niveaux faibles de PLP2a. Effectuer un antibiogramme standard selon le Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI® ou le CA-SFM.
- Les résultats négatifs obtenus avec ce coffret doivent être interprétés en conjonction avec les données cliniques pertinentes lors d'un diagnostic d'infection à SARM. En particulier, un nouveau test doit être effectué si le pronostic en cours d'une infection à *S. aureus* montre une faiblesse du traitement, etc.

Limites d'utilisation

- Ce test est destiné à l'identification présomptive des SARM. D'autres germes produisant la PLP 2a peuvent donner des résultats positifs.
- Certaines souches peuvent avoir un bas niveau de résistance à la méthicilline ou dans certains cas rares peuvent produire de faibles quantités de PBL 2a. Un antibiogramme est recommandé pour de telles souches.
- Les staphylocoques coagulase négatifs résistants à la méthicilline (SCN) produisent la PLP 2a et ce coffret détecte leur présence bien qu'une étude complète du diagnostic pour ces souches n'ait pas été faite. Le test n'est pas recommandé pour les souches SCN.
- D'autres mécanismes de résistance à la méthicilline ne sont pas détectés par ce test; notamment l'hyper production de bêta lactamases (BORSAs-borderline oxacillin resistant *Staphylococcus aureus*) ainsi que d'autres PLPs (MODSAs- modified *Staphylococcus aureus*).
- Le test ne peut être effectué sur un échantillon direct comme par exemple une hémoculture.

Contrôle de qualité

Vérifier l'absence de signes de dégradation. Le contrôle de qualité doit être effectué sur au moins une souche pour démontrer les performances attendues. Ne pas utiliser le produit si le résultat du test avec la souche de contrôle est erroné. La liste ci-dessous montre la performance de souches de contrôle que l'utilisateur peut se procurer facilement.

Souches Test	Résultat	
	Latex Test	Latex de contrôle
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Absence d'agglutination	Absence d'agglutination
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 33591 (SARM)	Agglutination	Absence d'agglutination

Références

Bibliographie disponible sur demande.