



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® ASSURE STAPHYLOCOCCAL COAGULASE TYPING ANTISERA

Uso previsto

Antisueros líquidos y estables para determinación de tipos de Estafilococos coagulasa.

SOLAMENTE PARA USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*

Contenido: Ver etiqueta del envase.

Composición

Los MAST® ASSURE ANTISERA son preparados de conejos hiperinmunizados con cepas estándar de microorganismos muertos que poseen serotipos conocidos o grupos específicos de antígenos y contienen azide de sodio al 0.085% como conservante.

Almacenamiento y caducidad

Almacenar sin abrir a 2 a 8°C hasta la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta del envase. Una vez abierto, MAST® ASSURE ANTISERA debe ser almacenado a 2 a 8°C y puede ser utilizado hasta la fecha de caducidad dada en la etiqueta. **No volver a congelar los reagentes.**

Advertencias y precauciones

Exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*. Observar 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 conservante de azide de sodio puede ser tóxico si se ingiere y puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre para formar sales altamente explosivas. Desechar siempre tirando de la cisterna para que se vaya por el desagüe 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 y equipos como por ejemplo: lazos, palillos aplicadores, portas de cristal para microscopio limpios, tubos mezcladores, pipetas, hisopos, medios de cultivo MAST incineradores e incubadores, etc. así como componentes específicos como: solución salina estéril al 0.85%; autoclave capaz de llegar a 121°C o un aparato para calentar soluciones bacterianas a 100°C; centrifugador capaz de alcanzar 3000 rpm.; plasma de conejo; suero normal de conejo; diluyente para plasma de conejo y suero. Se recomienda usar el 2% w/v de peptona y el 1% w/v de solución de citrato de sodio.

Procedimiento

A. Preparación de la solución de antígeno

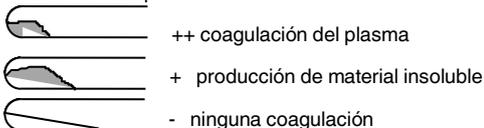
- Inocular una colonia del microorganismo en 5ml de Mast Brain-Heart Infusion (BHI) Broth DM106 en un tubo de ensayo de 30ml e incubar a 37°C durante toda la noche para producir la enzima coagulasa.
- Después de la incubación, centrifugar el fluido del cultivo a 3000 rpm durante 30 minutos, desechar el sobrante líquido y usarlo como solución de antígeno para el ensayo.

B. Procedimiento de serotipificación

- Añadir 0.1ml de solución de antígeno a cada uno de los 9 tubos de ensayo.
- Al tubo 1 añadir 0.1ml de antisuero del tipo I, al tubo 2 añadir 0.1ml de antisuero del tipo II y a los tubos del 3 al 8 añadir 0.1ml de antisueros del tipo III-VIII adecuadamente. Al tubo 9 añadir 0.1ml de suero normal de conejo diluido en 20 partes.
- Mezclar los contenidos de los tubos de ensayo usando un mezclador y dejarlos en posición vertical en un incubador a 37°C durante 1 hora.
- Sacar los tubos del incubador, añadir 0.2ml de plasma de conejo diluido en 10 partes, mezclar los contenidos de los tubos de ensayo usando el mezclador de tubos y colocándolos luego otra vez en el incubador a 37°C.
- Observar los tubos para ver si hay coagulación después de 1 hora de incubación. Si los resultados no son claros, continuar la incubación y observar los resultados después de 2 horas, 4 horas, 24 horas y 48 horas de incubación.

Interpretación de resultados

- Para observar resultados de coagulación sujetar los tubos de ensayo e inclinar hacia la posición horizontal como se muestra debajo.



- Comprobar que hay coagulación en tubo de ensayo de control. Si no hay coagulación en el tubo de control, extender el tiempo de incubación como se detalla en la sección B paso 5.
- Cuando se encuentra coagulación en todos los tubos menos en uno, el serotipo de la coagulasa del microorganismo se toma como el serotipo correspondiente al antisuero en el tubo donde ha ocurrido la inhibición en la formación del coágulo. Si se encuentra inhibición en dos o más tubos, el tiempo de incubación debe ser aumentado y los resultados observados otra vez cuando solamente uno de los tubos muestra inhibición.
- Si tras 48 horas se ve coagulación en el tubo de control y se ve inhibición en más de un tubo de microorganismo, debería ser considerado como que tiene más de una especificidad coagulasa.

Limitaciones de uso

Solamente los cultivos identificados como *Staphylococcus aureus* por características morfológicas y bioquímicas pueden ser serotipados con este producto.

Nota: Algunas cepas de microorganismos pueden tener una habilidad baja para producir coagulasa lo que resulta en una dificultad para interpretar los resultados. Si el tubo al que el suero normal de conejo ha sido añadido como control no muestra signos de coagulación después de 24 horas, se recomienda que la producción de coagulasa se aumente por uno de los métodos siguientes antes de volver a comprobar la cepa.

Aumento de la Producción de Coagulasa.

a) Agitar el cultivo.

- Preparar botellas para agitar que contengan BHI Broth hasta el 1/10² - 1/15² del volumen de la botella.
- Inocular una colonia del microorganismo en el medio de cultivo y cultivar el microorganismo aerobímicamente a 37°C durante 10 a 12 horas, batiendo a 120 rpm.
- Después de la incubación, centrifugar el líquido del cultivo a 3000 rpm durante 30 minutos, desechando el líquido sobrante y usarlo como si fuera la solución de antígeno del ensayo.

b) Caldo de cultivo suplementado con plasma de conejo.

- Preparar y esterilizar algunos BHI Broth y añadirle filtro esterilizado (0.22µm de filtro) de solución stock de plasma de conejo para darle al final una concentración del 10% v/v. Dispensar 3ml de medio de cultivo que contenga plasma de conejo a un pequeño tubo estéril de ensayo (sobre 10ml).
- Inocular una colonia del microorganismo a examen en el medio de cultivo y cultivar el microorganismo aerobímicamente durante la noche a 37°C.
- Romper el medio de cultivo coagulado y homogeneizar pipeteando hacia arriba y abajo varias veces. Tomar la parte líquida del cultivo y usarla como si fuera la solución antígeno.

c) Placa Agar que contiene plasma de conejo para selección colonias que producen coagulasa.

- Preparar y esterilizar algo de Nutrient Agar y llevarlo a 50°C al baño maría. Añadirle filtro esterilizado (0.22µm de filtro) de solución stock de solución plasma de conejo para darle al final una concentración del 10% v/v y mezclar minuciosamente. Verter en placas estériles y dejar solidificar.
- Inocular las placas con el microorganismo a examen y cultivar el microorganismo aerobímicamente durante la noche a 37°C.
- Después de la incubación, la producción de coagulasa puede ser observada si las placas son iluminadas desde abajo, como un anillo blanco alrededor de las colonias. La cantidad de coagulasa producida es indicada por el diámetro del anillo. Seleccionar una colonia que muestre el anillo más grande e inocularla en el medio líquido tal y como se describe en b. arriba.

Nota: Algunas cepas de microorganismos pueden producir una gran cantidad de coagulasa resultando en dificultad a la hora de interpretar los resultados. Si todos los tubos muestran coagulación tras 1 hora de incubación, la coagulasa puede ser diluida de acuerdo con el método siguiente, después volver a comprobar.

- Preparar diluciones seriadas en 2 partes de la solución de antígeno a ensayo de 1:2 a 1:16 usando el diluyente.
- Añadir 0.1ml de solución de antígeno a cada dilución de 4 tubos pequeños respectivamente. También añadir 0.1ml de suero normal de conejo diluido 1:20 a cada tubo, mezclar e incubar a 37°C durante 1 hora.
- Añadir 0.2ml de plasma de conejo diluido en 10 partes a cada tubo, mezclar los contenidos de los tubos usando un mezclador de tubos y después colocarlo en el incubador a 37°C durante 1 hora y observar para ver coagulación.
- Usar la solución de antígeno para el ensayo (sección B) a la dilución más alta que produce coagulación en 1 hora de incubación.

Nota: Algunas cepas de *S.aureus* producen la enzima fibrinolisisina la cual lisa el plasma coagulado. Si el ensayo coagulasa es llevado a cabo, usando la citada cepa, el plasma coagulado una vez formado va a lisa otra vez por lo que se debe tener cuidado durante la observación de resultados.

Control de calidad

Se recomienda que el control de calidad se lleve a cabo con al menos un microorganismo que demuestre una reacción positiva y al menos otro que demuestre una reacción negativa. No usar el producto si las reacciones con los microorganismos de control son incorrectas. Comprobar si hay signos de deterioro. No usar reagentes si están contaminados o turbios.

Referencias

Bibliografía disponible si se requiere.