



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

Antisieri liquidi stabili per la determinazione delle coagulasi stafilococciche.

ESCLUSIVAMENTE PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*

Contenuto: Cfr. etichetta della confezione.

Formulazione

I MAST® ASSURE ANTISERA sono preparati da conigli iperimmunizzati con ceppi standard di microrganismi uccisi che possiedono sierotipi noti o antigeni gruppo-specifici. Contengono sodio azide allo 0,085% come conservante.

Conservazione e validità

Conservare la confezione originale, ben sigillata, a 2 a 8°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione. Dopo l'apertura, MAST® ASSURE ANTISERA devono essere conservati a 2 a 8°C e possono essere utilizzati fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. **Non congelare i reagenti.**

Avvertenze e Precauzioni

Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*. Rispettare le precauzioni di sicurezza ed impiegare tecniche asettiche. Deve essere utilizzato solo da personale di laboratorio opportunamente qualificato. Prima dell'eliminazione, sterilizzare tutti i materiali biologici pericolosi. Il conservante sodio azide può essere tossico per ingestione e può reagire con le tubazioni di piombo e rame formando sali altamente esplosivi. Smaltire irrorando sempre con abbondante acqua. Consultare la scheda di sicurezza del prodotto.

Materiali richiesti ma non forniti

Attrezzature e prodotti per analisi microbiologiche di base, per esempio: anse, stick applicatori, vetrini puliti per microscopia, provette di vetro, tamponi, terreni di coltura MAST, tamponi, inceneritori, termostati, ecc., come pure, specificatamente:

- Soluzione fisiologica sterile 0,85%
- Autoclave con capacità di mantenere 121°C o dispositivo per riscaldare le sospensioni batteriche a 100°C
- Centrifuga capace di raggiungere 3000 rpm.
- Plasma di coniglio
- Siero normale di coniglio
- Diluente per il siero e il plasma di coniglio. Si consiglia di utilizzare una soluzione di peptone 2% p/v e sodio citrato 1% p/v.

Procedura

A. Preparazione della Soluzione antigenica

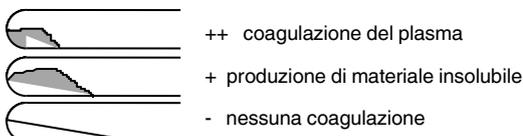
1. Per la produzione dell'enzima coagulasi, inoculare una colonia del microrganismo in esame in 5 ml di Brain-Heart Infusion (BHI) Broth Mast (DM106) in una provetta da 30 ml e incubare per una notte a 37°C.
2. Al termine dell'incubazione, centrifugare la brodocoltura a 3000 rpm per 30 minuti, decantare il surnatante e utilizzarlo come soluzione antigenica per il test.

B. Sierotipizzazione - Procedimento

1. Aggiungere 0,1 ml della soluzione antigenica 9 piccole provette analitiche.
2. Alla provetta 1 aggiungere 0,1 ml dell'antisiero tipo I, alla provetta 2 aggiungere 0,1 ml dell'antisiero tipo II e alle provette 3-8 aggiungere 0,1 ml dell'antisiero tipo III-VIII. Alla provetta 9 aggiungere 0,1 ml del siero normale di coniglio diluito 1:20.
3. Miscelare il contenuto delle provette utilizzando un miscelatore per provette, quindi lasciare riposare in termostato a 37°C per 1 ora.
4. Estrarre le provette dal termostato, aggiungere 0,2 ml di plasma di coniglio diluito 1:10, miscelare il contenuto delle provette utilizzando un miscelatore per provette e quindi incubare nuovamente in termostato a 37°C.
5. Dopo 1 ora di incubazione, osservare le provette, per valutare la presenza di coagulazione. Se i risultati non sono chiari, proseguire l'incubazione e osservare i risultati dopo 2 ore, 4 ore, 24 ore e 48 ore.

Interpretazione dei risultati

1. Per osservare i risultati della coagulazione inclinare verso una posizione orizzontale, come sotto illustrato.



2. Verificare la presenza di coagulazione nella provetta di controllo. Se la provetta di controllo non evidenzia alcuna coagulazione prolungare il tempo di incubazione come indicato nella sezione **B** punto 5.
3. Quando la coagulazione è presente in tutte le provette tranne una, il microrganismo in esame è considerato come appartenente al sierotipo del corrispondente antisiero della provetta in cui si è verificata l'inibizione della formazione del coagulo. Se l'inibizione si manifesta in due o più provette, prolungare il tempo di incubazione, registrando i risultati quando solo una provetta manifesta inibizione.

4. Se dopo 48 ore si osserva coagulazione nella provetta di controllo e inibizione della coagulazione in più di una provetta, il microrganismo deve essere considerato come avente più di una specificità di coagulasi.

Limitazioni

Il reagente consente di sierotipizzare solo colture di microrganismi identificati come *Staphylococcus aureus* per aspetto morfologico e con test biochimici.

Nota: Alcuni ceppi possono manifestare una scarsa capacità di produrre coagulasi, rendendo difficoltosa l'interpretazione dei risultati. Se la provetta in cui è stato aggiunto come controllo il siero di coniglio normale non manifesta alcun segno di coagulazione dopo 24 ore, si consiglia di amplificare la produzione di coagulasi con uno dei seguenti metodi prima di saggiare nuovamente il ceppo.

Incremento della Produzione di Coagulasi

a) Agitazione della coltura

1. Preparare matracci di agitazione contenenti BHI Broth fino a 1/10 -1/5 del volume.
2. Inoculare una colonia del microrganismo in esame nel brodo di coltura e incubare il microrganismo in aerobiosi a 37°C per 10 a 12 ore, agitando a circa 120 rpm.
3. Al termine dell'incubazione, centrifugare la brodocoltura a 3000 rpm per 30 minuti, decantare il surnatante e utilizzarlo come soluzione antigenica per il test.

b) Brodo addizionato con plasma di coniglio.

1. Preparare e sterilizzare una certa quantità di BHI Broth e aggiungere ad esso una soluzione stock di plasma di coniglio sterilizzato per filtrazione (filtro da 0,22 µm) per ottenere una concentrazione finale del 10% v/v. Dispensare 3 ml del terreno di coltura contenente plasma di coniglio in una piccola provetta analitica sterile (circa 10 ml).
2. Inoculare una colonia del microrganismo in esame nel terreno di coltura e coltivare il microrganismo in aerobiosi a 37°C per una notte.
3. Rompere il coagulo e omogeneizzare pipettando su e giù per diverse volte. Prelevare la parte liquida della coltura e utilizzarla come soluzione dell'antigene.

c) Piastra agarizzata contenente plasma di coniglio per selezionare le colonie che producono coagulasi

1. Preparare e sterilizzare una certa quantità di Nutrient Agar e raffreddarlo a 50°C in bagnomaria. Aggiungere una soluzione stock di plasma di coniglio sterilizzato per filtrazione (filtro da 0,22 µm) per ottenere una concentrazione finale del 10% v/v. Miscelare con cura. Versare in piastre sterili e lasciare solidificare.
2. Inoculare le piastre con il microrganismo in esame e incubare in aerobiosi a 37°C per una notte.
3. Al termine dell'incubazione, la produzione della coagulasi può essere osservata, illuminando le piastre dal basso, come un anello bianco intorno alle colonie. La quantità di coagulasi prodotta è indicata dal diametro dell'anello. Selezionare la colonia che evidenzia l'anello più largo e inoculare in bordo come descritto al punto **b**.

Nota: Alcuni ceppi possono produrre una grande quantità di coagulasi, rendendo difficoltosa l'interpretazione dei risultati. Se tutte le provette manifestano coagulazione dopo 1 ora di incubazione, diluire la coagulasi e rieseguire il test con il metodo di seguito riportato.

1. In quattro piccole provette allestire diluizioni seriali per raddoppio dell'antigene analitico (da 1:2 a 1:16), utilizzando il diluente.
2. Aggiungere 0,1 ml di soluzione antigenica a ciascuna diluizione. Aggiungere inoltre a ciascuna provetta 0,1 ml di siero normale di coniglio diluito 1:20, miscelare e incubare a 37°C per 1 ora.
3. Aggiungere 0,2 ml di plasma di coniglio diluito 1:10 in ciascuna provetta, miscelare il contenuto delle provette utilizzando un miscelatore per provette e quindi riincubare in termostato a 37°C. Osservare la presenza di coagulazione.
4. Utilizzare la soluzione antigenica per il test (sezione **B**) alla più alta diluizione che induce coagulazione entro 1 ora di incubazione.

Nota: Alcuni ceppi di *S. aureus* producono l'enzima fibrinolisinasi, che lisa il plasma coagulato. Con tali ceppi, il plasma coagulato una volta formato può nuovamente lisarsi. Porre quindi attenzione durante l'osservazione dei risultati.

Controllo Qualità

Il controllo qualità deve essere eseguito impiegando almeno un microrganismo che mostri una reazione positiva e almeno un microrganismo che mostri una reazione negativa. Non utilizzare il prodotto se le reazioni con i microrganismi di controllo non sono corrette. Verificare eventuali segni di deterioramento. Non utilizzare reagenti contaminati o torbidi.

Bibliografia

La pertinente bibliografia è disponibile su richiesta.