

MAST ASSURE™ STAPHYLOCOCCAL COAGULASE TYPING ANTISERA

Solution stable d'antisérums pour la détermination du type de coagulase des staphylocoques.

USAGE IN VITRO UNIQUEMENT

Présentation: voir étiquette sur la boîte.

Formule

Les antisérums MAST ASSURE™ sont préparés à partir de lapins hyperimmunisés avec des souches standards inactivées possédant des sérotypes ou des antigènes de groupes spécifiques connus. La solution contient 0,085% d'azote de sodium comme conservateur.

Stabilité et stockage

Conserver fermé à 2-8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la boîte. Avant et après ouverture, les sérums MAST ASSURE™ doivent être stockés entre 2°C et 8°C jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. **Ne pas congeler les réactifs.**

Précautions d'emploi

Usage in Vitro uniquement. Respecter les précautions d'usage contre les risques biologiques et les conditions d'asepsie. Ne doit être utilisé que par un personnel de laboratoire correctement formé et qualifié. Stériliser tous les déchets biocontaminés avant de les jeter. L'azote de sodium, utilisé comme conservateur, peut être toxique lorsqu'il est ingéré. Il peut réagir avec les plomb et le cuivre des canalisations pour former des sels explosifs. Rincer abondamment à l'eau. Se référer à la fiche de sécurité du produit.

Matériel nécessaire non fourni

Matériels et équipements microbiologiques standards tels que des anses, bâtonnets applicateurs, des lames d'agglutination pour microscopes en verre, des tubes test en verre, écouvillons, des milieux de culture MAST, incinérateurs et incubateurs, etc., ainsi que les articles spécifiques tels que :

- une solution stérile à 0,85%
- un autoclave capable d'atteindre 121°C ou un appareil permettant de chauffer les suspensions bactériennes à 100°C.
- une centrifugeuse capable d'atteindre 3000 t/m.
- plasma de lapin
- sérum de lapin normal
- diluant pour plasma de lapin et sérum. Il est recommandé d'utiliser une solution à 2% p/v de peptone et à 1% p/v de citrate de sodium.

Procédure

A. Préparation de la solution antigène.

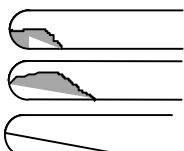
1. Inoculer une colonie du germe à tester dans 5ml de bouillon Mast Brain-Heart Infusion (BHI) Broth DM106 dans un tube test de 30ml et incubé à 37°C toute une nuit pour produire l'enzyme coagulase.
2. Après incubation, centrifuger le bouillon de la culture à 3000 t/m pendant 30 minutes, décanter le surnageant et l'utiliser comme solution antigène pour le test.

B. Procédure de sérotypage.

1. Ajouter 0,1ml de solution d'antigène dans 9 tubes test.
2. Ajouter 0,1ml d'antisérum de type I dans le premier tube, 0,1ml d'antisérum de type II dans le second tube. Ajouter 0,1ml d'antisérum de type III-VIII dans les tubes 3 à 8, respectivement. Dans le dernier tube, ajouter 0,1ml de sérum de lapin normal dilué au 1/20^{ème}.
3. Agiter les tubes au vortex puis les placer en position verticale dans un incubateur à 37°C pendant 1 heure.
4. Ajouter 0,2ml de plasma de lapin dilué au 1/10^{ème}. Agiter les tubes au vortex puis les replacer à 37°C dans l'incubateur.
5. Observer la coagulation dans les tubes après une heure d'incubation. Si les résultats ne sont pas clairs, continuer l'incubation et observer les résultats après 2 heures, 4 heures, 24 heures et 48 heures d'incubation.

Interprétation des résultats

1. Pour observer les résultats de la coagulation, maintenir les tubes test horizontalement comme illustré ci-dessous.



++ coagulation du plasma

+ production de matériaux insolubles

- absence de coagulation

2. Vérifier la présence de coagulation dans le tube de contrôle. S'il n'y a pas de coagulation dans le tube de contrôle, augmenter le temps d'incubation comme détaillé dans l'étape 5B.
3. Lorsque la coagulation est présente dans tous les tubes, excepté un, le sérotype de la coagulase de la souche test est celui du tube avec inhibition de la coagulation.

Si l'inhibition est présente dans 2 tubes ou plus, le temps d'incubation doit être augmenté et les résultats observés à nouveau lorsque seul un tube présente une inhibition.

4. Si après 48 heures, la coagulation est visible dans le tube de contrôle et dans plus d'un tube, la souche doit être considérée comme ayant plusieurs spécificités pour la coagulase.

Limites d'utilisation

Seules les cultures de *Staphylococcus aureus* identifiés par leurs caractères morphologiques et biochimiques peuvent être sérotypés avec ce produit.

Remarque: Certaines souches peuvent avoir une faible capacité à produire de la coagulase rendant l'interprétation de résultats difficile. Si le tube de contrôle contenant du sérum normal de lapin ne montre aucun signe de coagulation après 24 heures, il est recommandé d'accroître la production de coagulase par une des méthodes suivantes avant de retester la souche.

Accroissement de la production de coagulase

a) Culture sous agitation

1. Préparer des flacons de bouillon BHI de volume maximum équivalents au 1/10^{ème} - 1/5^{ème} du volume du flacon.
2. Inoculer une colonie de la souche à tester dans la souche à tester et incubé en aérobiose à 37°C pendant 10-12 heures, sous agitation à environ 120 t/m.
3. Après incubation, centrifuger le bouillon à 3000 t/m pendant 30 minutes. Décanter le surnageant et l'utiliser comme solution d'antigène pour le test.

b) Bouillon additionné de plasma de lapin.

1. Préparer et stériliser du bouillon BHI puis l'ajouter à la solution stock de plasma de lapin stérilisée par filtration (filtre de 0,22µm) afin d'obtenir une concentration finale de 10% v/v. Distribuer 3ml de milieu de culture contenant du plasma de lapin dans un petit tube test stérile (environ 10ml).
2. Inoculer une colonie de la souche à tester dans le milieu de culture et incubé à 37°C en aérobiose toute une nuit.
3. Fragmenter le milieu de culture coagulé et l'homogénéiser en pipettant de haut en bas plusieurs fois. Utiliser la solution de culture comme solution d'antigène.

c) Gélose au plasma de lapin pour la sélection de colonies produisant la coagulase.

1. Préparer et stériliser une gélose nutritive et la porter à 50°C dans un bain-marie. Ajouter la solution stock de plasma de lapin stérilisée par filtration (filtre de 0,22µm) afin d'obtenir une concentration finale de 10% v/v. Mélanger vigoureusement. Couler le milieu en boîte de Pétri et laisser prendre la gélose.
2. Inoculer les boîtes avec le germe à tester et cultiver le germe aérobiose à 37°C toute une nuit.
3. Après incubation, la production de coagulase se distingue par un anneau blanc autour des colonies lorsque les boîtes sont éclairées par dessous. La quantité de coagulase produite est indiquée par le diamètre de l'anneau. Sélectionner la colonie ayant l'anneau le plus grand et l'inoculer dans le bouillon comme décrits ci-dessus en b.

Remarque: Certaines souches ayant une faible capacité à produire de la coagulase donnent des résultats difficiles à interpréter. Si tous les tubes présentent une coagulation après 1 heure d'incubation, la coagulase doit être diluée selon la méthode suivante, puis retestée.

1. Préparer des dilutions au 1/2 de la solution d'antigène test de 1:2 à 1:16 à l'aide du diluant.
2. Ajouter 0,1ml de solution d'antigène pour chaque dilution, respectivement dans 4 petits tubes test. Ajouter dans chaque tube 0,1ml de sérum normal de lapin dilué au 1/20^{ème}. Mélanger puis incubé à 37°C pendant 1 heure.
3. Ajouter 0,2ml de plasma de lapin dilué au 1/10^{ème} dans chaque tube, mélanger le contenu des tubes au vortex puis incubé à 37°C pendant une heure. Observer la coagulation.
4. Utiliser la plus haute dilution de solution d'antigène (section B) donnant une coagulation au bout d'une heure d'incubation.

Remarque: Certaines souches de *Staphylococcus aureus* produisent l'enzyme fibrinolyse qui lyse le plasma coagulé. Si un test de coagulase est effectué avec une telle souche, le plasma coagulé se lyse une fois formé ; aussi ; une attention particulière devra être portée lors de l'observation des résultats.

Contrôle de qualité

Il est recommandé que le contrôle de qualité soit effectué avec au moins une souche de contrôle positive et au moins une souche de contrôle négative. Ne pas utiliser le produit si les réactions avec les souches de contrôle sont incorrectes. Vérifier tous signes de détérioration. Ne pas utiliser des réactifs contaminés ou troubles.

Références

Bibliographie disponible sur demande.