

BD Oxacillin Screen Agar

VERWENDUNGSZWECK

BD Oxacillin Screen Agar (ursprünglich als MRSA-Screen-Agar bezeichnet) wurde zum Nachweis von methicillin-/oxacillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA, ORSA) entwickelt. Da das Verfahren zum Nachweis von MRSA das selbe Inokulum verwendet wie die Bauer-Kirby Empfindlichkeitsprüfung mit Antibiotika-Blättchen, kann der Oxacillin-Screeningtest an Isolaten bequem gleichzeitig mit den routinemäßigen Empfindlichkeitsprüfungen durchgeführt werden.

GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS

Mikrobiologische Methode.

Die Resistenz von *S. aureus* gegenüber Penicillin wurde kurz nach der Einführung von Penicillin in den späten 1940er Jahren beobachtet.¹ In den späten 1960er Jahren wurden in den USA erstmals methicillin-/oxacillin-resistente *S. aureus*-Stämme isoliert.²

Drei verschiedene Resistenzmechanismen tragen zur Oxacillin-Resistenz von *S. aureus* bei. Diese umfassen (1) den klassischen Typ, welche die Produktion eines zusätzlichen penicillinbindenden Proteins (PBP) beinhaltet, das durch ein chromosomales *mecA*-Gen codiert ist, (2) Hyper- β -Lactamase-Produktion und (3) Produktion von modifizierten PBPs, welche die Affinität der Organismen zu β -Lactam-Antibiotika verringert.³

Die charakteristischen Eigenschaften, welche bei der Differenzierung der drei Typen von Oxacillin-(Methicillin)-Resistenz hilfreich sein könnten, sind im *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. beschrieben.³

Stämme, welche das *mec*-Gen besitzen (klassische Resistenz), sind gegenüber penicillinase-resistenten Penicillinen (PRPs), wie z.B. Methicillin, Oxacillin und Nafcillin, resistent, und die Resistenz äußert sich entweder auf homogene oder heterogene Weise. Bei der homogenen Weise zeigen praktisch alle Zellen in *in-vitro* Standardtests Resistenz. Bei der heteroresistenten Weise erscheinen einige Zellen empfindlich und andere resistent. Häufig zeigt nur 1 von 10⁴ bis 1 von 10⁸ Zellen einer Testpopulation Resistenz. Die heterogene Äußerung führt gelegentlich zu MHK, welche grenzwertig erscheinen, d.h. Oxacillin-MHK von 4 – 8 $\mu\text{g/mL}$. Isolate mit klassischer Resistenz sind üblicherweise gegenüber anderen Agenzien, wie z.B. Erythromycin, Clindamycin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Trimethoprim-Sulfamethoxazol, einem Quinolon oder einem Aminoglycosid, resistent.³

Resistenz, welche sich durch Hyper- β -Lactamase-Produktion oder das Vorhandensein von modifizierten PBPs äußert, resultiert ebenfalls in grenzwertige Resistenz. Isolate, welche entweder durch Hyper- β -Lactamase-Produktion oder durch den modifizierten PBP-Mechanismus resistent sind, zeigen üblicherweise keine Mehrfachresistenz.³ **Außerdem wachsen diese Isolate wahrscheinlich nicht auf dieser Agar-Screeningplatte.**³⁻⁵

Die methicillinresistente Population wächst langsamer und bevorzugt eine niedrigere Inkubationstemperatur und eine hohe Salzkonzentration.

BD Oxacillin Screen Agar besteht aus Mueller-Hinton-Agar, einem Medium, welches für die Blättchendiffusionsmethode zur antimikrobiellen Empfindlichkeitprüfung von aeroben Bakterien standardisiert wurde.⁶ Natriumchlorid wurde beigefügt, um das Wachstum der PRP-resistenten Subpopulationen zu verbessern. Oxacillin wird zum Nachweis von PRP-Resistenz bevorzugt, da es stabiler ist und zu zuverlässigeren Resultaten führt (siehe Tabelle 2C [M100 (M2)] und Tabelle 2C im CLSI-Dokument M100 [M7]).^{7,8}

REAGENZIEN

BD Oxacillin Screen Agar

Zusammensetzung* pro 1 Liter destilliertem Wasser

Rindfleischextrakt	2,0 g	Oxacillin	0,006
Säurehydrolysat von Casein	17,5	Agar	17,0
Stärke	1,5	pH 7,3 ± 0,2	
Natriumchlorid	40,0		

*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD . Nur für den professionellen Gebrauch. ⓧ

Agarplatten bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknung, Rissen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden.

Hinweise zur aseptischen Arbeitsweise, Biogefährdung und Entsorgung des Produkts sind der **ALLGEMEINEN GEBRAUCHSANLEITUNG** zu entnehmen.

AUFBEWAHRUNG UND HALTBARKEIT

Nach Erhalt Platten bis unmittelbar vor dem Gebrauch im Dunkeln bei 2 – 8 °C in der Originalverpackung lagern. Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Die Platten können bis zum Verfallsdatum (s. Kennzeichnung auf der Verpackung) inokuliert und entsprechend den empfohlenen Inkubationszeiten inkubiert werden.

Platten aus bereits geöffneten Stapeln mit jeweils 10 Platten können bei Lagerung in einem sauberen Bereich bei 2 – 8 °C bis zu einer Woche verwendet werden.

QUALITÄTSSICHERUNG DURCH DEN ANWENDER

Repräsentative Proben mit den nachstehend aufgeführten Kulturen inokulieren. Mehrere gut isolierte Kolonien des Testorganismus aus einer 18 – 24 h alten Plattenkultur in ein Röhrchen **BD Trypticase Soy Broth** suspendieren und einen 0,5-McFarland-Trübungsstandard herstellen. **BD Oxacillin Screen Agar** mit Hilfe einer Mikropipette punktförmig mit 10 µL der Testsuspension inokulieren. Alternativ einen Wattetupfer mit der Testsuspension tränken und die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig gegen die Innenwand des Röhrchens ausdrücken. Platte durch Abstreichen des Tupfers über einen ca. 2,5 cm großen Bereich ausstreichen. Eine **BD Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood (TSA II)**- oder **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**-Platte als nicht selektive Wachstumsreferenz miteinbeziehen.

Platten bei 30 – 35 °C aerob inkubieren. 35 °C nicht überschreiten. Platten für volle 24 h inkubieren.

Stämme	Wachstum
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Kein Wachstum nach 24 h Inkubation (empfindlich)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	Wachstum nach 24 h Inkubation (resistent)
Nicht inokuliert	Hell bernsteinfarben, klar bis leicht opak

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

BD Oxacillin Screen Agar (90 mm **Stacker**-Platten). Mikrobiologisch kontrolliert.

Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

Probenarten

Dieses Medium ist nicht zur Isolierung von MRSA/ORSA aus klinische Proben bestimmt. Stattdessen wird das Medium mit Reinkulturen von Isolaten inokuliert, welche präsumtiv als *Staphylococcus aureus* identifiziert wurden (siehe auch **Testverfahren**, sowie **LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN**).

Testverfahren

1. Isolat präsumtiv als *Staphylococcus aureus* identifizieren, z.B. durch Objektträger- oder Koagulasetests (oder durch eine vollständige biochemische Identifizierung).
2. Inokulum durch Suspendierung mehrerer gut isolierter Kolonien des *S. aureus*-Testisolates aus einer 18 – 24 h alten Plattenkultur in ein Röhrchen eines geeigneten Bouillon-Mediums, z.B. **BD Trypticase Soy Broth**, zubereiten und einen 0,5-McFarland-Trübungsstandard herstellen.
3. **BD Oxacillin Screen Agar** mit Hilfe einer Mikropipette punktförmig mit 10 µL der Testsuspension inokulieren.
4. Alternativ einen Tupfer mit der Testsuspension tränken und die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig gegen die Innenwand des Röhrchens ausdrücken. Platte durch Abstreichen des Tupfers über einen ca. 2,5 cm großen Bereich ausstreichen.
Eine **BD Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood (TSA II)**- oder **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**-Platte als nicht selektive Wachstumskontrolle miteinbeziehen.
5. Die Test- und Kontrollplatten können durch Markierungen an der Plattenunterseite in mehrere keilförmige Sektoren unterteilt werden. Es können mehrere Isolate auf derselben Platte getestet werden. Trotzdem sollte jede Platte nur einmal verwendet und inkubiert werden. **BD Oxacillin Screen Agar NICHT WIEDERVERWENDEN UND ERNEUT INKUBIEREN.**
6. Platten bei 30 – 35 °C für volle 24 h inkubieren. **35 °C nicht überschreiten.**

Ergebnisse

Platten nach der Inkubation auf Wachstum überprüfen. Die Platten dieses Mediums müssen sorgfältig untersucht werden. Selbst ganz kleine Kolonien, oder nur eine einzige Kolonie, weisen darauf hin, dass das Isolat methicillin-(oxacillin)-resistent ist. Kein Wachstum deutet darauf hin, dass der Organismus gegenüber PRPs (Methicillin, Nafcillin und Oxacillin) empfindlich ist. Isolate, welche auf Oxacillin-Screen-Agar wachsen, sollten als resistent gegenüber allen β -Lactam-Antibiotika, einschließlich β -Lactam/ β -Lactamase-Inhibitor-Kombinationen und Cephalosporinen, gemeldet werden.

Hinweis: Ergänzende Informationen zum CLSI-Dokument M2 oder revidierte Versionen mit revidierten Aufstellungen von Antibiotika-Blättchen und Interpretationsrichtlinien werden regelmäßig herausgegeben. Die aktuellen Empfehlungen sollten jeweils den neuesten Tabellen entnommen werden. Das vollständige Normenwerk und die ergänzenden Information sind beim Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, USA, erhältlich. Telefon: +1-610-688-1100.

LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

BD Oxacillin Screen Agar ist ein Standardmedium zum Nachweis von methicillin/oxacillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA, ORSA).^{3,6-8}

Intern durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, dass zwischen der Inokulierung mit 10 µL der Testsuspension mit einer Mikropipette und der Inokulierung der Platte mit einem Tupfer ein Unterschied in der Inokulumgröße besteht. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der resistenten Subpopulation ist größer in einer großen Population aus bakteriellen Zellen. Der Nachweis der Resistenz, besonders bei der heterogen-resistenten Population, wird durch das größere Inokulum, welches unter Verwendung einer Mikropipette und durch Inokulierung der Platte mit 10 µL erreicht wird, verbessert.⁹

Jedes auf diesem Medium wachsende Isolat sollte mit Hilfe von Bouillon- oder Agarverdünnung oder molekularen Verfahren (Nachweis des *mecA*-Gens) quantitativ bestimmt werden, um die Oxacillin-Resistenz sowie die Resistenz gegenüber anderen antimikrobiellen Agenzien, welche charakteristisch für MRSA sind, z.B. Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Gentamycin und Tetracyclin, zu bestätigen.

Leistungsergebnisse⁹

In einer Feldstudie in einem großen städtischen Krankenhaus wurden 152 *S.aureus*-Isolate auf **BD Oxacillin Screen Agar** (früher MRSA Screen Agar) vergleichenden Tests mit einem Referenzagar-Verdünnungsverfahren zur Methicillin-Empfindlichkeitsprüfung unterzogen. Insgesamt stellten sich 121 Isolate mit beiden Methoden als empfindlich heraus. 30 Isolate

zeigten sich bei beiden Methoden resistent (MRSA). Das letzte Isolat zeigte auf MRSA Screening-Agar Wachstum, war jedoch empfindlich gegenüber Methicillin. Die Empfindlichkeit des Tests betrug also 100 % und die Spezifität 99,2 %.

Verfahrensbeschränkungen

Gelegentlich können *S. aureus*-Isolate mit grenzwertig-resistenten MHK innerhalb 24 h kein Wachstum zeigen. Deshalb wird empfohlen, dass zweideutige Ergebnisse der Screening-Platten mit einem Standard-MHK-Test bestätigt werden.

Dieses Medium darf nicht zur direkten Isolierung von MRSA aus klinischen Proben verwendet werden.

Die Verwendung von **BD Oxacillin Screen Agar** zum Nachweis von methicillin-/oxacillin-resistenten coagulase-negativen Staphylokokken wird nicht empfohlen.

LITERATUR

1. Chain, E., H.W. Florey, and M.A. Jennings. 1949. Acquired resistance of micro-organisms to penicillin, p. 1111-1136. *In* H.W. Florey, E. Chain, N.G. Heatley, M.A. Jennings, A.G. Sanders, E.P. Abraham, and M.E. Florey (ed.), *Antibiotics*, vol. II. Oxford University Press, London.
2. Barrett, F.F., R.F. McGehee, Jr., and M. Finland. 1968. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations. *N. Engl. J. Med.* 279:444-448.
3. Swenson, J.M., J.B. Patel, and J.H. Jorgensen. 2007. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. *In*: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. L. Landry, and M.A. Pfaller (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. USA.
4. Leitch, C., and S. Boonlayangoor. 1994. Test to detect oxacillin (methicillin)-resistant staphylococci with an oxacillin screen plate, p. 5.5.1-5.5.7. *In* H.D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures manual*, vol. 1 (suppl.1). American Society for Microbiology, Washington, D.C. USA.
5. Haberberger, R.L., A. J. Kallen, T.J. Driscoll, and M.R. Wallace. 1998. Oxacillin-resistant phenotypes of *Staphylococcus aureus*. *Lab. Med.* 29: 302-305.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Approved standard: M7. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI, Wayne, PA, USA. *Search for latest version at www.clsi.org*
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Disk diffusion supplemental tables: M100 (M2). CLSI, Wayne, PA, USA. *Search for latest version at www.clsi.org*
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). MIC testing supplemental tables: M100 (M7). CLSI, Wayne, PA, USA. *Search for latest version at www.clsi.org*
9. Data on file. BD Diagnostic Systems. Sparks, MD. USA

VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE

BD Oxacillin Screen Agar

Best.-Nr. 257658 Gebrauchsfertige Plattenmedien, 20 Platten

WEITERE INFORMATIONEN

Weitere Informationen erhalten Sie bei Ihrer örtlichen BD-Vertretung.



Becton Dickinson GmbH

Tullastrasse 8 – 12

D-69126 Heidelberg/Germany

Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16

Reception_Germany@europe.bd.com

<http://www.bd.com>
<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo and all other trademarks are the property of Becton, Dickinson and Company. © 2013 BD