



BD Oxacillin Screen Agar

PRZEZNACZENIE

Podłoże **BD Oxacillin Screen Agar** (początkowo określane jako MRSA Screen Agar) zostało opracowane do wykrywania szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę/oksacylinę (MRSA, ORSA). Ze względu na to, że w metodzie wykrywania MRSA stosuje się takie samo inokulum, jak w procedurze badania wrażliwości przy użyciu krążków nasączonych antybiotykami, test przesiewowy z oksacyliną można w wygodny sposób wykonać na izolowanych szczepach podczas rutynowego badania wrażliwości.

ZASADY I OBJAŚNIENIE PROCEDURY

Metoda mikrobiologiczna.

Oporność *S. aureus* na penicylinę zaobserwowano wkrótce po wprowadzeniu penicyliny, w późnych latach 40.¹ W późnych latach 60. w Stanach Zjednoczonych zaczęto izolować szczepy *S. aureus* oporne na metycylinę/oksacylinę.²

Za oporność *S. aureus* na oksacylinę odpowiedzialne są trzy różne mechanizmy. Są to: (1) typ klasyczny, polegający na wytwarzaniu dodatkowego białka wiążącego penicylinę (PBP), które jest kodowane przez gen chromosomalny *mecA*, (2) wytwarzanie dużej ilości β -laktamazy oraz (3) wytwarzanie zmodyfikowanych PBP, które zmniejszają powinowactwo drobnoustrojów do antybiotyków β -laktamowych.³

Cechy, które mogą pomóc w różnicowaniu tych trzech typów oporności na oksacylinę (metycylinę) przedstawiono w publikacji *Manual of Clinical Microbiology*, wyd. 9.³

Szczepy posiadające gen *mec* (oporność klasyczna) są oporne na penicyliny oporne na penicylinazę (PRP), takie jak metycylina, oksacylina i nafcylina. Ekspresja oporności wśród tych szczepów zachodzi w sposób bądź homogeny, bądź heterogeny. W przypadku ekspresji homogennej, w standardowych badaniach *in vitro* niemal wszystkie komórki wykazują oporność. W przypadku heterogennej ekspresji oporności, niektóre komórki wydają się wrażliwe, a inne oporne. Często zdarza się, że ekspresja oporności zachodzi tylko u 1 na 10^4 do 1 na 10^8 komórek w badanej populacji. Ekspresja heterogenna czasem prowadzi do MIC, które wydaje się graniczne, np. MIC oksacyliny równe 4 do 8 $\mu\text{g/ml}$. Izolowane szczepy wykazujące oporność klasyczną są zazwyczaj oporne na inne antybiotyki, takie jak erytromycyna, klindamycyna, chloramfenikol, tetracyklina, trimetoprim-sulfametoksazol, chinolony oraz aminoglikozydy.³

Oporność spowodowana nadmierną produkcją β -laktamazy lub obecnością zmodyfikowanych PBP także powoduje oporność graniczną. Izolowane szczepy, które są oporne w mechanizmie bądź nadmiernej produkcji β -laktamazy, bądź zmodyfikowanego PBP, zazwyczaj nie wykazują oporności wielolekowej.³ Ponadto, **zazwyczaj nie obserwuje się wzrostu tych szczepów na płytkach z agarem.**³⁻⁵

Wzrost populacji opornej na metycylinę jest wolniejszy, preferuje ona niższą temperaturę inkubacji i wysokie stężenie soli.

Podłoże **BD Oxacillin Screen Agar** składa się z podłoża Mueller Hinton Agar poddanego standaryzacji do procedury dyfuzyjnego badania wrażliwości bakterii tlenowych na antybiotyki z zastosowaniem krążków.⁶ Dodatek chlorku sodu poprawia wzrost subpopulacji opornych na PRP. Do wykrywania oporności na PRP preferowana jest oksacylina, gdyż jest ona stabilniejsza, a wyniki są bardziej miarodajne (zobacz tabelę 2C [M100 (M2)] i tabelę 2C w dokumencie CLSI M100 [M7]).^{7,8}

ODCZYNNIKI

BD Oxacillin Screen Agar

Skład* w przeliczeniu na jeden litr wody oczyszczonej

Wyciąg wołowy	2,0 g	Oksacylina	0,006
Kwaśny hydrolizat kazeiny	17,5	Agar	17,0
Skrobia	1,5	pH 7,3 ± 0,2	
Chlorek sodu	40,0		

*Skorygowany i (lub) uzupełniony zgodnie z wymaganiami mającymi na celu spełnienie kryteriów wydajności.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

IVD . Wyłącznie do zastosowań profesjonalnych. ⓧ

Nie należy używać płytek, jeżeli są na nich widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, odbarwienia, wyschnięcia, pęknięcia lub inne zjawiska wskazujące na pogorszenie jakości. Procedury aseptycznej techniki pracy z produktem, zagrożenia biologiczne oraz usuwanie zużytego produktu opisano w dokumencie **OGÓLNE INSTRUKCJE DOTYCZĄCE STOSOWANIA**.

PRZECHOWYWANIE I DOPUSZCZALNY OKRES PRZECHOWYWANIA

Po otrzymaniu, płytki należy przechowywać w ciemnym miejscu w temperaturze od 2 do 8° C, w ich oryginalnym opakowaniu izolującym do chwili użycia. Unikać zamrażania i przegrzewania. Posiewu na płytce można dokonywać aż do daty ważności (patrz etykieta na opakowaniu) i inkubować w zalecanych czasach inkubacji.

Płytek z otwartych stosów zawierających po 10 płytek można używać przez okres jednego tygodnia, przechowując w czystym miejscu w temperaturze od 2 do 8° C.

KONTROLA JAKOŚCI PRZEZ UŻYTKOWNIKA

Podłoża zaszczepia się reprezentatywnymi próbkami wymienionych szczepów. Należy wykonać zawiesinę kilku dobrze odizolowanych kolonii badanego drobnoustroju z inkubowanej przez 18–24 godz. hodowli w próbówce z pożywką płynną **BD Trypticase Soy Broth** i skorygować zmętnienie do standardu 0,5 McFarland. Zaszczepić miejscowo 10 µl badanej zawiesiny na podłożu **BD Oxacillin Screen Agar** za pomocą mikropipety. Alternatywnie można zanurzyć bawełnianą wymazówkę w badanej zawiesinie i delikatnie odsączyć nadmiar płynu, przyciskając ją do wewnętrznej ścianki próbówki. Wykonać posiew na płytce, rozprowadzając materiał za pomocą wymazówki po powierzchni około 2,5 cm. Należy także wykonać posiew na płytce z podłożem **BD Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood (TSA II)** lub **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** jako nieselektywną kontrolę wzrostu.

Płytki inkubuje się w temperaturze 30–35°C w atmosferze tlenowej. Nie należy przekraczać temperatury 35°C. Inkubować płytki przez pełne 24 godz.

Szczepy bakteryjne	Wzrost
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Brak wzrostu po 24 godz. inkubacji (wrażliwe)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	Wzrost po 24 godz. inkubacji (oporne)
Bez posiewu	Jasnobursztynowe, przejrzyste do bardzo nieznacznie matowego

PROCEDURA

Dostarczane materiały

Podłoże **BD Oxacillin Screen Agar** (płytki **Stacker** o śr. 90 mm). Sprawdzane pod kątem obecności mikroorganizmów.

Materiały niedostarczane

Pomocnicze pożywki hodowlane, odczynniki i wyposażenie laboratoryjne zgodnie z wymaganiami.

Typy próbek

Podłoże to nie jest przeznaczone do izolowania MRSA/ORSA z próbek pochodzenia klinicznego. Zamiast tego na opisywanym podłożu zaszczenia się czyste hodowle izolowanych szczepów, wstępnie zidentyfikowanych jako *Staphylococcus aureus* (zobacz **Procedura testowa** oraz **CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW I OGRANICZENIA DOTYCZĄCE PROCEDURY**).

Procedura testowa

1. Wykonać wstępną identyfikację izolowanego szczepu jako *Staphylococcus aureus*, np. szkiełkowym lub probówkowym testem na koagulazę (bądź wykonać pełną identyfikację biochemiczną).
2. Przygotować zawiesinę kilku dobrze odizolowanych kolonii badanego szczepu *S. aureus* z inkubowanej przez 18–24 godz. hodowli w próbówce z odpowiednią pożywką płynną, taką jak **BD Trypticase Soy Broth**, a następnie skorygować zmętnienie do standardu 0,5 McFarland.
3. Zaszczepić miejscowo 10 µl badanej zawiesiny na podłożu **BD Oxacillin Screen Agar** za pomocą mikropipety.
4. Alternatywnie można zanurzyć bawełnianą wymazówkę w badanej zawiesinie i delikatnie odsączyć nadmiar płynu, przyciskając ją do wewnętrznej ścianki próbówki. Wykonać posiew na płytce, rozprowadzając materiał za pomocą wymazówki po powierzchni około 2,54 cm. Należy także wykonać posiew na płytce z podłożem **BD Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood (TSA II)** lub **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** jako nieselektywną kontrolę wzrostu.
5. Płytki badane i kontrolne można podzielić na kilka sektorów w kształcie klinów, zaznaczając je na dolnej powierzchni płytki. Na każdej płytce można testować kilka wyizolowanych szczepów. Jednak każdą płytkę należy wykorzystać i inkubować tylko raz. **NIE NALEŻY PONOWNIE UŻYWAĆ I PONOWNIE INKUBOWAĆ PODŁOŻA BD Oxacillin Screen Agar.**
6. Płytki inkubuje się w temperaturze 30–35°C przez **pełne 24 godz. Nie należy przekraczać temperatury 35°C.**

Wyniki

Po inkubacji zbadać płytki pod kątem wzrostu. Należy zauważyć, że płytki z tym podłożem trzeba badać dokładnie. Nawet jedna bardzo mała kolonia wskazuje na to, że izolowany szczep jest oporny na metycylinę (oksacylinę). Zahamowanie wzrostu oznacza, że drobnoustrój jest wrażliwy na PRP (metycylinę, nafcylinę i oksacylinę). Szczepy rosnące na podłożu Oxacillin Screen Agar należy uznać za odporne na wszystkie antybiotyki β-laktamowe, w tym połączenia β-laktam/inhibitor β-laktamazy i cefalosporyny.

Uwaga: Okresowo publikowane są informacyjne dodatki do dokumentu CLSI M2, bądź jego uaktualnione wersje, zawierające poprawione tabele dla krążków przeciwbakteryjnych oraz standardy interpretacji. Należy przestrzegać zaleceń podanych w najnowszych tabelach. Pełen standard i dodatki informacyjne można zamówić pod adresem Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, USA. Telefon: ++1-610-688-1100.

CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW I OGRANICZENIA DOTYCZĄCE PROCEDURY

BD Oxacillin Screen Agar jest standardowym podłożem do wykrywania szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę/oksacylinę (MRSA, ORSA).^{3,6-8}

Badania wewnętrzne wykazały, że istnieje różnica w rozmiarze inokulum pomiędzy wykonywaniem posiewu przez naniesienie mikropipetą 10 µl badanej zawiesiny a zaszczepieniem za pomocą wymazówki. Prawdopodobieństwo wystąpienia subpopulacji odpornej jest większe w dużych populacjach komórek bakterii. Wykrycie oporności, zwłaszcza w populacjach heterogennych pod względem oporności, jest łatwiejsze w przypadku użycia większego inokulum podczas zaszczepiania na płytce 10 µl zawiesiny za pomocą mikropipety.⁹ Każdy szczep wyhodowany na opisywanym podłożu należy zbadać ilościowo, wykonując rozcieńczenie w pożywce płynnej lub na agarze, bądź metodami molekularnymi (określenie genu *mecA*) w celu potwierdzenia oporności na oksacylinę, a także oporności na inne antybiotyki, charakterystyczne dla MRSA, takie jak chloramfenikol, klindamycyna, erytromycyna, gentamicyna i tetracyklina.

Wyniki badań skuteczności⁹

W badaniu terenowym przeprowadzonym w dużym szpitalu miejskim, 152 szczepy *S. aureus* zostały zbadane na podłożu **BD Oxacillin Screen Agar** (dawniej MRSA Screen Agar) w porównaniu z referencyjną procedurą badania wrażliwości na metycylinę przez rozcieńczanie na agarze. Obiema metodami wykryto łącznie 121 wrażliwych szczepów. 30 szczepów było opornych (MRSA) według obu metod. Pozostały jeden szczep wykazywał wzrost na podłożu MRSA Screen Agar, lecz był wrażliwy na metycylinę. Czulość testu wyniosła zatem 100, a swoistość – 99,2%.

Ograniczenia procedury

W rzadkich przypadkach szczepy *S. aureus* przy granicznym MIC mogą nie osiągnąć widocznego wzrostu w ciągu 24 godz. Zaleca się, aby wszystkie wątpliwe wyniki uzyskane na płytce przesiewowej potwierdzać standardowym testem MIC.

Podłoże to nie jest przeznaczone do izolowania MRSA bezpośrednio z próbek pochodzenia klinicznego.

Nie zaleca się używania podłoża **BD Oxacillin Screen Agar** do wykrywania koagulazoujemnych gronkowców opornych na metycylinę/oksacylinę.

PIŚMIENNICTWO

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. Tenover (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

PAKOWANIE / DOSTĘPNOŚĆ

BD Oxacillin Screen Agar

Nr katalogowy 257658 Gotowe podłoża na płytkach
hodowlanych, cpu 20

DODATKOWE INFORMACJE

W celu uzyskania dodatkowych informacji należy się skontaktować z lokalnym przedstawicielem firmy BD.



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