BD Oxacillin Screen Agar

USO PREVISTO

BD Oxacillin Screen Agar (agar di screening per l'oxacillina BD) (in origine denominato MRSA Screen Agar) è stato sviluppato per la rilevazione dello *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina/oxacillina (MRSA, ORSA). Dato che il metodo per la rilevazione di MRSA prevede l'uso dello stesso inoculo utilizzato nella procedura di test della suscettibilità con disco antimicrobico di Bauer-Kirby, il test di screening per l'oxacillina può essere tranquillamente eseguito sugli isolati contemporaneamente ai test della suscettibilità di routine.

PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA

Metodo microbiologico.
La resistenza dello *S. aureus* alla penicillina è stata osservata subito dopo l'introduzione della penicillina verso la fine degli anni '40.[1] Verso la fine degli anni '60, negli Stati Uniti si è iniziato a isolare ceppi di *S. aureus* resistenti alla meticillina/oxacillina.[2]
I meccanismi che contribuiscono alla resistenza dello *S. aureus* all'oxacillina sono tre: (1) il tipo classico, che vede la produzione di un'ulteriore proteina legante della penicillina (PBP) codificata nel gene cromosomico *mecA*, (2) iperproduzione di ß-lattamasi e (3) produzione di PBP modificate, che riducono l'affinità degli organismi per gli antibiotici ß-lattamici.[3]

Le caratteristiche che possono essere d'aiuto nel differenziare i tre tipi di resistenza all'oxacillina (meticillina) sono indicate nel *Manual of Clinical Microbiology,* 9. edizione.[3]

I ceppi che possiedono il gene *mec* (resistenza classica) sono resistenti alle penicilline resistenti alla penicillinase (PRP), ad es. meticillina, oxacillina e nafcillina, e possono essere sia omogenei sia eterogenei nella loro espressione della resistenza. Con l'espressione omogenea, pressoché tutte le cellule esprimono resistenza quando sottoposte ai normali test *in vitro*. Con l'espressione eteroresistente, alcune cellule appaiono suscettibili e altre resistenti. Spesso solo 1 su 10^{4-} 1 su 10^{8} cellule della popolazione sottoposta a test esprimono resistenza. L'espressione eterogenea a volte dà luogo a CMI marginali, ad es. CMI dell'oxacillina pari a 4 – 8 µg/mL. Gli isolati che presentano una resistenza classica sono di solito resistenti anche ad altri agenti quali eritromicina, clindamicina, cloranfenicolo, tetraciclina, trimethoprim-solfametoxazolo, un chinolone, o un aminoglicoside.[3]
Anche la resistenza mediata dall'iperproduzione di ß-lattamasi o la presenza di PBP modificate dà luogo a una resistenza marginale. Gli isolati resistenti mediante meccanismi di iperproduzione di ß-lattamasi o PBP modificate di solito non sono resistenti a più farmaci.[3]
Inoltre, **è improbabile che si verifichi una crescita di questi isolati sulla piastra dell'agar di screening.**[3-5]
La popolazione resistente alla meticillina cresce più lentamente, mostra una predilezione per temperature di incubazione più basse e un'elevata concentrazione salina.

BD Oxacillin Screen Agar è costituito da agar Mueller Hinton, che è un terreno standardizzato per la procedura di diffusione mediante disco impiegata nei test della suscettibilità antimicrobica dei batteri aerobi.[6] Viene aggiunto cloruro di sodio per migliorare la crescita delle sottopopolazioni resistenti alle PRP. È preferibile l'oxacillina per la rilevazione della resistenza alle PRP, in quanto è più stabile e risulta più affidabile (vedere la Tabella 2C [M100 (M2)] e la Tabella 2C del documento dell'CLSI M100 [M7]).[7,8]

REAGENTI

BD Oxacillin Screen Agar

Formula* per litro di acqua purificata

Estratto di carne bovina	2,0 g	Oxacillina	0,006
Idrolizzato acido di caseina	17,5	Agar	17,0
Amido	1,5	pH 7,3 ± 0,2	
Cloruro di sodio	40,0		

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.

PRECAUZIONI

IVD . Solo per uso professionale.

Non usare le piastre se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazioni cromatiche, essiccamento, fissurazioni o altri segni di deterioramento.

Per maneggiare i prodotti in condizioni asettiche, riconoscere i rischi biologici e smaltire i prodotti usati, consultare le **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**.

CONSERVAZIONE E VITA UTILE

Alla consegna, conservare le piastre al buio a 2 – 8 °C nella confezione originaria fino a immediatamente prima dell'uso. Evitare congelamento e surriscaldamento. Le piastre possono essere inoculate sino alla data di scadenza (v. l'etichetta sulla confezione) e incubate per i tempi di incubazione raccomandati.

Le piastre prelevate dalle confezioni da 10 già aperte possono essere usate per una settimana se conservate in luogo pulito a 2 – 8 °C.

CONTROLLO DI QUALITÀ A CURA DELL'UTENTE

Inoculare i campioni rappresentativi con le colture riportate in seguito. Sospendere varie colonie ben isolate di organismi per il test da una coltura su piastra di 18 – 24 h in una provetta contenente **BD Trypticase Soy Broth** e regolare la torbidità in base allo standard 0,5 di McFarland. Inoculare **BD Oxacillin Screen Agar** in vari punti con 10 µL della sospensione da usare per il test servendosi di una micropipetta. In alternativa, saturare un tampone di cotone con la sospensione da usare per il test ed espellere il fluido in eccesso premendo delicatamente il tampone contro la parete interna della provetta. Strisciare la piastra strofinando il tampone su un'area di circa 2,5 cm. Includere una piastra **BD Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood (TSA II)** o **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** come riferimento non selettivo per la crescita.

Incubare le piastre a 30 – 35 °C in aerobiosi. Non superare i 35 °C. Incubare le piastre per 24 h intere.

Ceppi	**Risultati della crescita**
Staphylococcus aureus ATCC 29213	Crescita assente dopo 24 h di incubazione (suscettibile)
Staphylococcus aureus ATCC 43300	Crescita dopo 24 h di incubazione (resistente)
Non inoculate	Ambra chiaro, da trasparenti a minimamente opache

PROCEDURA

Materiali forniti

BD Oxacillin Screen Agar (piastre impilate **Stacker** da 90 mm). Microbiologicamente controllate.

Materiali non forniti

Terreni di coltura accessori, reagenti e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Tipi di campioni
Questo terreno non deve essere usato per l'isolamento di MRSA/ORSA da campioni clinici. Il terreno viene invece inoculato con colture pure o isolati identificati in via presuntiva come *Staphylococcus aureus* (vedere **Procedura del test** e **PRESTAZIONI METODOLOGICHE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**).

Procedura del test
1. Identificare in via presuntiva l'isolato come *Staphylococcus aureus*, ad es. mediante test della coagulasi in provetta o su vetrino (o mediante una completa identificazione biochimica).
2. Preparare l'inoculo sospendendo varie colonie ben separate di isolati di *S. aureus* da una coltura su piastra di 18 – 24 h in una provetta contenente un brodo adatto, ad esempio brodo di soia **Trypticase,** e regolare la torbidità in base allo standard 0,5 di McFarland.
3. Inoculare **BD Oxacillin Screen Agar** in vari punti con 10 µL della sospensione usata per il test servendosi di una micropipetta.
4. In alternativa, saturare un tampone di cotone con la sospensione del test ed espellere il fluido in eccesso premendo delicatamente il tampone contro la parete interna della provetta. Strisciare la piastra strofinando il tampone su un'area di circa 2,54 cm.
   Includere una piastra **BD Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood (TSA II)** o **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** come controllo non selettivo per la crescita.
5. Le piastre utilizzate per il test e quelle di controllo possono essere divise in vari settori triangolari segnandoli sul fondo della piastra. Su ogni piastra è possibile sottoporre a test diversi isolati, tuttavia utilizzare e incubare ogni piastra una sola volta. NON RIUTILIZZARE E REINCUBARE **BD Oxacillin Screen Agar**.
6. Incubare le piastre a 30 – 35 °C per 24 h intere. Non superare i 35 °C.

Risultati
Dopo il periodo di incubazione, osservare i segni di crescita sulle piastre. Si noti che le piastre con questo terreno devono essere ispezionate con attenzione. Colonie anche molto piccole, addirittura una sola colonia, indicano che l'isolato è resistente alla meticillina (oxacillina). L'assenza di crescita indica che l'organismo è suscettibile alle PRP (meticillina, nafcillina e oxacillina). Gli isolati che mostrano una crescita sull'agar di screening per l'oxacillina devono essere indicati come resistenti a tutti gli agenti antimicrobici ß-lattamici, comprese combinazioni di ß-lattamici/inibitori della ß-lattamasi e cefalosporine.

N.B. Periodicamente vengono pubblicati supplementi informativi del documento M2 del CLSI, o versioni riviste, che contengono tabelle revisionate dei dischi antimicrobici e degli standard di interpretazione. Consultare le tabelle più recenti per le raccomandazioni attuali. È possibile ordinare gli standard completi e i supplementi informativi presso: Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, USA. Telefono: +1-610-688-1100.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA
BD Oxacillin Screen Agar è un terreno di coltura standard per la rilevazione dello *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina/oxacillina (MRSA, ORSA).[3,6-8]
Gli studi interni hanno dimostrato che esiste una differenza a livello di dimensioni dell'inoculo utilizzando per il test una micropipetta con 10 µL di sospensione o inoculando la piastra con un tampone. Le probabilità che emerga una sottopopolazione resistente è maggiore in una vasta popolazione di cellule batteriche. La rilevazione della resistenza, specialmente in popolazioni che resistono in modo eterogeneo, risulta migliore con l'inoculo di grandi dimensioni ottenuto utilizzando la micropipetta e 10 µL di sospensione.[9]
Tutti gli isolati che crescono su questo terreno devono essere sottoposti a test quantitativo mediante brodo, diluizione dell'agar o attraverso metodi molecolari (determinazione della presenza del gene *mec*A) per confermare la resistenza all'oxacillina oltre che ad altri agenti antimicrobici caratteristici di MRSA, ad es. cloranfenicolo, clindamicina, eritromicina, gentamicina e tetraciclina.

Risultati delle prestazioni[9]
Nell'ambito di una sperimentazione sul campo condotta in un grande ospedale, 152 isolati di *S. aureus* sono stati sottoposti a test su **BD Oxacillin Screen Agar** (in precedenza MRSA

Screen Agar) in confronto a una procedura di diluizione dell'agar usata come riferimento per vagliare la suscettibilità alla meticillina. Un totale di 121 isolati sono stati trovati suscettibili con entrambi i metodi. 30 isolati sono stati trovati resistenti (MRSA) con entrambi i metodi. Il solo isolato rimanente ha mostrato una crescita sull'agar di screening MRSA, ma era suscettibile alla meticillina. Pertanto la sensibilità del test è stata del 100% e la specificità del 99,2%.

Limitazioni della procedura
A volte è possibile che gli isolati di *S. aureus* con CMI marginalmente resistenti non crescano entro 24 h. Si consiglia di convalidare qualunque risultato equivoco desunto dalla piastra di screening con un normale test CMI.
Questo terreno non deve essere usato per l'isolamento di MRSA direttamente da campioni clinici. È sconsigliato l'uso di **BD Oxacillin Screen Agar** per la rilevazione di stafilococchi coagulasi-negativi resistenti alla meticillina/oxacillina.

BIBLIOGRAFIA

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

CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

BD Oxacillin Screen Agar
N. di cat. 254570 Terreni su piastra pronti all'uso, confezioni da 10

ULTERIORI INFORMAZIONI

Per ulteriori informazioni, rivolgersi al rappresentante BD di zona.

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