

BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin

USO PREVISTO

BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin (agar al sale di mannitolo con oxacillina) è un terreno di coltura utilizzato per l'isolamento dello *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA).

PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA

Metodo microbiologico.

I meccanismi che contribuiscono alla resistenza dello *Staphylococcus aureus* all'oxacillina (o alla meticillina) sono tre: (1) il tipo classico, che vede la produzione di un'ulteriore proteina legante della penicillina (PBP, Penicillin-Binding Protein) codificata nel gene cromosomico *mecA*, (2) iperproduzione di β -lattamasi e (3) produzione di PBP modificate, che riducono l'affinità degli organismi per gli antibiotici β -lattamici.¹

I ceppi che possiedono il gene *mecA* (resistenza classica) sono omogenei o eterogenei nella loro espressione di 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 una concentrazione minima inibente (CMI) marginale, ad es., CMI dell'oxacillina pari a 4 – 8 $\mu\text{g/mL}$. Gli isolati che presentano una resistenza classica sono di solito resistenti anche ad altri agenti, quali eritromicina, clindamicina, cloranfenicolo, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazolo, un chinolone, o un aminoglicoside.¹

Anche la resistenza mediata dall'iperproduzione di β -lattamasi o la presenza di PBP modificate dà luogo a una resistenza marginale. Di solito, gli isolati resistenti mediante meccanismi di iperproduzione di β -lattamasi o PBP modificate non sono resistenti a più farmaci.^{1,2}

BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin contiene peptoni ed estratto di carne bovina, che forniscono fattori essenziali per la crescita, quali azoto, carbonio, zolfo e micronutrienti. La concentrazione di cloruro di sodio al 7,5% determina una parziale o completa inibizione degli organismi batterici diversi dagli stafilococchi. La fermentazione del mannitolo, come indicato da una modifica dell'indicatore del fenolo rosso, favorisce la rilevazione dello *Staphylococcus aureus*, che è una delle specie di *Staphylococcus* positive al mannitolo. In seguito all'aggiunta di oxacillina, vengono inibiti tutti gli stafilococchi sensibili a ≤ 5 mg per litro di terreno di coltura. Simili concentrazioni di questo antimicrobico sono state proposte da altri autori per lo screening dell'MRSA e vengono utilizzate nell'agar di screening dell'oxacillina, che, tuttavia, non è un terreno di isolamento.³⁻⁶

REAGENTI

BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin

Formula* per litro di acqua purificata

Estratto di carne bovina	1,0 g
Digerito pancreatico di caseina	5,0
Digerito peptico di tessuto animale	5,0
Cloruro di sodio	75,0
D-mannitolo	10,0
Rosso fenolo	0,025
Oxacillina	0,005
Agar	15,0 g

pH 7,3 \pm 0,2

*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 le piastre con 10^2 – 10^3 UFC per piastra di ATCC 33592 e con 10^4 – 10^5 UFC per piastra dei ceppi rimanenti. Incubare le piastre a 32 – 35 °C per 24 h.

Ceppi	Risultati della crescita
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33592 (ceppo MRSA)	Crescita; colonie gialle, terreno di coltura giallo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Nessuna crescita
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Nessuna crescita
Non inoculate	Rosse

PROCEDURA

Materiali forniti

BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin (piastre impilate **Stacker** da 90 mm) microbiologicamente controllato.

Materiali non forniti

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

Tipi di campioni

Questo terreno di coltura può essere utilizzato per l'isolamento e la rilevazione dello *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina/oxacillina (=MRSA) da tutti i tipi di campioni clinici (v. anche **PRESTAZIONI METODOLOGICHE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**).

Procedura del test

Inoculare **BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin** con il campione clinico non appena questo perviene in laboratorio. Strisciare per l'isolamento. Allo scopo di rilevare l'intera gamma di patogeni associati all'infezione, è necessario includere i terreni di coltura non selettivi, quali **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood**, i terreni selettivi per i batteri Gram-negativi e, se necessario, anche per i batteri Gram-positivi, compresi gli stafilococchi sensibili all'oxacillina. Incubare **BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin** in aerobiosi per non meno di 24 h, preferibilmente tra 32 e 35 °C. Evitare temperature superiori a 35 °C e non incubare in atmosfera arricchita con anidride carbonica. Se necessario, è possibile incubare le piastre per altre 18 – 24 h.

Risultati

Controllare le piastre per verificare la presenza di colonie gialle, circondate da un alone giallo. Una crescita con queste caratteristiche indica che l'isolato è resistente alla meticillina (oxacillina). Gli isolati che crescono su questo terreno dovranno essere sottoposti a un ulteriore test per la sensibilità all'oxacillina con i metodi standard.^{1,5,6} Poiché la semplice fermentazione del mannitolo non indica solo la presenza dello *Staphylococcus aureus*, è necessario ottenere

l'identificazione di questo bacillo con il test della coagulasi oppure effettuare l'identificazione biochimica completa.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin è un terreno di coltura utilizzato per l'isolamento dello *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistente alla meticillina.

Valutazione delle prestazioni

Questo terreno di coltura è stato valutato internamente.⁷ Sono stati analizzati complessivamente 26 ceppi di stafilococchi, comprendenti 18 ceppi di *Staphylococcus aureus*, 5 di *S. epidermidis*, 2 di *S. haemolyticus* e 1 di *S. hominis*.

Dei 18 ceppi di *S. aureus*, che comprendevano a loro volta 7 ceppi di riferimento e 11 isolati clinici, 14 erano stati identificati in precedenza come ceppi di MRSA, utilizzando metodi standard. I rimanenti quattro ceppi erano ceppi di riferimento provenienti dalla American Type Culture Collection, tutti etichettati come MRSA-negativi.

Dei 14 ceppi MRSA, 12 hanno prodotto una crescita significativa di colonie positive al mannitolo su **BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin** dopo 20 h di incubazione a 35 °C ed erano resistenti all'oxacillina nel test di diffusione dell'agar (agar Mueller Hinton con disco di oxacillina da 1 µg). Un isolato clinico e un ceppo di riferimento (= ATCC 43300), entrambi etichettati come MRSA positivi, producevano una leggera crescita di colonie puntiformi positive al mannitolo su **BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin** e presentavano, rispettivamente, dimensioni di zona pari a 15 e 11 mm con il disco di oxacillina da un 1 µg. Una dimensione di zona pari a 11 mm indica la caratteristica di "intermedio", mentre una dimensione pari a 15 mm indica quella di "sensibile". I quattro ceppi di riferimento MRSA-negativi non crescevano su **BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin** dopo 20 h di incubazione. Questi erano sensibili nel test del disco di oxacillina (dimensioni di zona ≥ 22 mm).

I cinque ceppi di *S. epidermidis* (isolati clinici, tutti etichettati come resistenti alla meticillina) non crescevano su **BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin** dopo 20 h di incubazione. Tutti questi erano resistenti nel test del disco di oxacillina.

I due ceppi di *S. haemolyticus* (isolati clinici) crescevano su **BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin** dopo 20 h ed erano resistenti nel test del disco di oxacillina. Entrambi erano positivi al mannitolo.

Il ceppo di *S. hominis* produceva una crescita su **BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin** dopo 20 h ed era resistente nel test del disco di oxacillina. Il ceppo era negativo al mannitolo.

Riassumendo, **BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin** era comparabile al metodo del test di diffusione standard, come descritto nello standard M2-A7 dell'NCCLS per lo *S. aureus*.⁵

Limitazioni della procedura

Questo terreno può essere usato per l'isolamento dell'MRSA da campioni clinici. Non deve invece essere usato per l'isolamento di stafilococchi coagulasi-negativi resistenti alla meticillina/oxacillina.

Per gli isolati da questo terreno è necessario effettuare il test della coagulasi o un'identificazione biochimica completa, in quanto le specie diverse dallo *S. aureus* potrebbero essere positive al mannitolo e resistenti all'oxacillina.⁸

Si consiglia un ulteriore studio sui ceppi che producono in questo terreno una leggera crescita di colonie positive al mannitolo dopo 18 – 25 h di incubazione. A questo scopo utilizzare i metodi attualmente consigliati, quali la crescita su **Oxacillin Screen Agar** o test molecolari per la presenza del gene *mecA*.¹

BIBLIOGRAFIA

1. Swenson, J.M., J.F. Hindler, and J.H. Jorgensen. 2003. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. USA.

2. 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.
3. Van Enk, R.A., and K.D. Thompson. 1992. Use of a primary isolation medium for recovery of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 30: 504-505.
4. Kampf, G., et al. 1998. Evaluation of mannitol salt agar for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion and agar screening. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2254-2257.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests – 7th edition. Approved Standard M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
6. 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.
7. Data on file. BD Diagnostic Systems Europe. Heidelberg, Germany.
8. Bannermann, T.L. 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. *In*: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

BD Mannitol Salt Agar with Oxacillin

N. di cat. 257021 Terreni su piastra preparati, confezioni da 20

ULTERIORI INFORMAZIONI

Per ulteriori informazioni, rivolgersi al rappresentante BD di zona.



BD Diagnostic Systems

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

BD Diagnostic Systems Europe

Becton Dickinson France SA

11 rue Aristide Bergès

38800 Le Pont de Claix/France

Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 <http://www.bd.com>

BD, BD logo and Stacker are trademarks of Becton, Dickinson and Company.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

© 2003 Becton, Dickinson and Company