

## **BD Oxacillin Screen Agar**

### **APPLICATION**

La **BD Oxacillin Screen Agar** (gélose de dépistage par l'oxacilline) (autrefois nommée MRSA Screen Agar) a été développée pour la détection des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline/oxacilline (« MRSA » et « ORSA », respectivement). Du fait que la méthode de détection des MRSA utilise le même inoculum que la procédure Bauer-Kirby d'antibiogramme par diffusion sur disque en gélose antimicrobien, le test de dépistage par l'oxacilline peut être aisément réalisé sur les isolats en même temps que les tests de sensibilité de routine.

### **PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE**

Méthode microbiologique.

La résistance à la pénicilline de *S. aureus* a été observée peu après l'introduction de la pénicilline, à la fin des années 1940.<sup>1</sup> Vers la fin des années 1960, des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline/oxacilline ont commencé à être isolées aux Etats-Unis.<sup>2</sup>

Trois mécanismes distincts contribuent à la résistance à l'oxacilline des *S. aureus* : (1) le mécanisme classique, consistant en la production d'une nouvelle protéine de liaison à la pénicilline (PLP) codée par un gène *mecA* chromosomique, (2) une hyperproduction de  $\beta$ -lactamase, et (3) une production de PLP modifiées atténuant l'affinité des microorganismes envers les  $\beta$ -lactamines.<sup>3</sup>

Pour connaître les caractéristiques permettant de différencier ces trois types de résistance à l'oxacilline (méthicilline), se reporter à la publication *Manual of Clinical Microbiology*, 9<sup>ème</sup> éd.<sup>3</sup>

Les souches comportant le gène *mec* (mécanisme classique) résistent aux pénicillines résistantes à la pénicillinase (PRP) telles que la méthicilline, l'oxacilline et la nafcilline, et peuvent être homogènes ou hétérogènes dans leur expression de cette résistance. Lorsque leur expression est homogène, quasiment toutes les cellules expriment une résistance lorsqu'elles sont testées par des tests *in vitro* standard. Lorsqu'elle est hétérogène, certaines cellules s'avèrent sensibles et d'autres résistantes. Il est fréquent qu'entre 1 sur 10<sup>4</sup> cellules et 1 sur 10<sup>8</sup> cellules seulement expriment une résistance, dans une population testée. L'expression hétérogène produit parfois des CMI faibles, de l'ordre de 4 à 8  $\mu\text{g/mL}$  pour une CMI d'oxacilline. Les isolats ayant une résistance classique sont généralement résistants à d'autres agents tels que l'érythromycine, la clindamycine, le chloramphénicol, la tétracycline, le triméthoprime-sulfaméthoxazole, une quinolone ou un aminoglycoside.<sup>3</sup>

La résistance résultant d'une hyperproduction de  $\beta$ -lactamase ou de la présence de PLP modifiées est également faible. Les isolats qui sont résistants soit par le mécanisme d'hyperproduction de  $\beta$ -lactamase, soit par celui de la présence de PLP modifiées ne présentent généralement pas de multirésistance aux médicaments.<sup>3</sup> De plus, **ils sont peu susceptibles de se développer sur la gélose de dépistage en boîte de Pétri.**<sup>3-5</sup>

La population résistante à la méthicilline se développe plus lentement, et préfère une faible température d'incubation ainsi qu'une concentration de sel élevée.

La **BD Oxacillin Screen Agar** se compose de Mueller Hinton Agar, qui est un milieu qui a été standardisé pour la procédure de diffusion sur disque appliquée lors des tests de sensibilité aux antimicrobiens des bactéries aérobies.<sup>6</sup> Le chlorure de sodium est ajouté pour stimuler la croissance des sous-populations résistantes aux PRP. L'oxacilline est préférable pour la détection de la résistance aux PRP, car elle est plus stable et donne des résultats plus fiables (voir le tableau 2C [M100 (M2)] et le tableau 2C dans le document M100 [M7] du CLSI).<sup>7,8</sup>

## REACTIFS

### BD Oxacillin Screen Agar

Formule\* par litre d'eau purifiée

Extrait de bœuf	2,0 g	Oxacilline	0,006
Hydrolysate acide de caséine	17,5	Gélose	17,0
Fécule	1,5	pH 7,3 ± 0,2	
Chlorure de sodium	40,0		

\*Ajustée et/ou complétée en fonction des critères de performances imposés.

## PRECAUTIONS

**IVD** . A usage professionnel uniquement. 

Ne pas utiliser de boîte de Pétri présentant des signes de contamination microbienne, décoloration, dessiccation ou fissure, ou d'autres signes de détérioration.

Consulter le document **MODE D'EMPLOI GENERAL** pour plus d'informations concernant les procédures de manipulation aseptique, les risques biologiques et l'élimination des produits usagés.

## STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver les boîtes de Pétri dans l'obscurité entre 2 et 8 °C, dans leur emballage d'origine, jusqu'au moment de leur utilisation. Ne pas congeler ni surchauffer. Les boîtes peuvent être ensemencées jusqu'à leur date de péremption (voir étiquette sur l'emballage) et incubées pendant le délai d'incubation recommandé.

Des boîtes provenant d'une pile ouverte de 10 boîtes sont utilisables pour une semaine lorsqu'elles sont conservées entre +2 et +8 °C dans un endroit propre.

## CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Ensemencer des échantillons représentatifs avec les cultures répertoriées ci-dessous. Mettre en suspension dans un tube de **BD Trypticase Soy Broth** plusieurs colonies bien isolées du microorganisme à tester prélevées dans une culture en boîte de Pétri âgée de 18 à 24 h, et ajuster la turbidité de façon à la conformer à celle du standard McFarland 0,5. Ensemencer la **BD Oxacillin Screen Agar** en déposant ponctuellement sur celle-ci 10 µL de la suspension à l'aide d'une micropipette. Ou bien, saturer un écouvillon en coton de la suspension, puis le presser délicatement contre la paroi interne du tube pour en extraire l'excès de fluide. Strier la boîte de Pétri en déplaçant l'écouvillon sur une surface de 2,5 cm environ. Ensemencer également une boîte de Pétri de **BD Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood (TSA II)** ou de **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** afin de disposer d'un milieu de croissance de référence non sélectif.

Incuber les boîtes à une température de 30 à 35 °C en conditions aérobies. Ne jamais dépasser 35 °C. Incuber les boîtes pendant 24 h pleines.

Souches	Croissance
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Aucune croissance au bout de 24 h d'incubation (sensibilité)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	Croissance au bout de 24 h d'incubation (résistance)
Sans ensemencement	Ambre clair, transparent à très légèrement opaque

## METHODE

### Matériaux fournis

**BD Oxacillin Screen Agar** (boîtes de Pétri **Stacker** de 90 mm). Produits contrôlés microbiologiquement.

### Matériaux non fournis

Milieus de culture auxiliaires, réactifs et matériel de laboratoire requis.

## Types d'échantillons

Ce milieu n'est pas conçu pour l'isolement de MRSA/ORSA à partir d'échantillons cliniques. Il doit être ensemencé avec des cultures pures d'isolats identifiés de façon présumptive comme étant des *Staphylococcus aureus* spp. (voir les rubriques « **Mode opératoire du test** » et « **CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE** »).

## Mode opératoire du test

1. Identifier présomptivement l'isolat comme *Staphylococcus aureus*, p. ex. par test de coagulase sur lame ou en tube (ou par identification biochimique complète).
2. Préparer l'inoculum en mettant en suspension dans un tube de bouillon approprié (p. ex. **Trypticase Soy Broth**) plusieurs colonies bien isolées de l'isolat de *S. aureus* prélevées dans une culture en boîte de Pétri âgée de 18 à 24 h, et ajuster la turbidité de façon à la conformer à celle du standard McFarland 0,5.
3. Ensemencer la **BD Oxacillin Screen Agar** en déposant ponctuellement sur celle-ci 10 µl de la suspension à l'aide d'une micropipette.
4. Ou bien, saturer un écouvillon de la suspension, puis le presser délicatement contre la paroi interne du tube pour en extraire l'excès de fluide. Strier la boîte de Pétri en déplaçant l'écouvillon sur une surface de 2,5 cm environ.  
Ensemencer également une boîte de Pétri de **BD Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood (TSA II)** ou de **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** afin de disposer d'un milieu de croissance de référence non sélectif.
5. Les boîtes de test et de référence peuvent être divisées en plusieurs portions qui seront tracées sur leur fond. Il est possible de tester plusieurs isolats sur chaque boîte. Dans tous les cas, cependant, ne jamais utiliser et incuber chaque boîte plus d'une fois. **NE JAMAIS REUTILISER NI REINCUBER une BD Oxacillin Screen Agar.**
6. Incuber les boîtes à une température de 30 à 35 °C pendant **24 h pleines. Ne jamais dépasser 35 °C.**

## Résultats

Après l'incubation, observer les boîtes de Pétri pour déceler des signes de croissance. Noter que les boîtes de ce milieu doivent être inspectées avec précaution. Noter également que la présence de très petites colonies, et même d'une seule colonie, suffit à révéler la résistance de l'isolat à la méthicilline (oxacilline). L'absence totale de croissance indique que le microorganisme est sensible aux PRP (méthicilline, nafcilline et oxacilline). Les isolats se développant sur la Oxacillin Screen Agar doivent être consignés comme résistant à tous les agents antimicrobiens comportant de la β-lactamine, y compris aux combinaisons d'inhibiteurs des β-lactamines/β-lactamases et aux céphalosporines.

Remarque : Des compléments d'information au document M2 du CLSI ou des versions révisées contenant des tableaux de valeurs pour les disques antimicrobiens et des normes d'interprétation actualisées sont publiés régulièrement. Il est recommandé de se reporter aux tableaux les plus récents pour consulter les recommandations actuelles. La norme complète et les compléments d'information peuvent être obtenus auprès du Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 Etats-Unis. Téléphone : +1-610-688-1100.

## CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE

La **BD Oxacillin Screen Agar** est un milieu standard utilisé pour la détection des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline/oxacilline (MRSA, ORSA).<sup>3,6-8</sup>

Des études internes ont montré que les inoculum sont de tailles différentes selon que l'on réalise l'ensemencement en déposant 10 µL de la suspension à l'aide d'une micropipette, ou en utilisant un écouvillon. La probabilité pour que la sous-population résistante apparaisse est plus élevée dans une population importante de cellules bactériennes. La détection de la résistance, en particulier dans la population à résistance hétérogène, est améliorée avec l'inoculum plus important résultant de l'utilisation d'une micropipette et de l'ensemencement avec 10 µL.<sup>9</sup>

Tout isolat se développant sur ce milieu doit être testé quantitativement par dilution en bouillon ou en gélose ou par des méthodes moléculaires (détermination du gène *mecA*) afin que soit confirmée la résistance à l'oxacilline ainsi que celle à d'autres agents antimicrobiens

caractéristiques des MRSA, tels que chloramphénicol, clindamycine, érythromycine, gentamicine et tétracycline.

### Résultats des performances<sup>9</sup>

Lors d'un essai en conditions réelles réalisé dans un grand hôpital urbain, 152 isolats de *S. aureus* ont été testés sur la **BD Oxacillin Screen Agar** (autrefois nommée MRSA Screen Agar) par comparaison avec une procédure de dilution en gélose de référence dans le but de déterminer leur sensibilité à la méthicilline. Les deux méthodes ont permis de déterminer que 121 isolats au total étaient sensibles. Trente isolats ont été révélés par les deux méthodes comme résistants (MRSA). Le dernier isolat restant s'est développé sur la MRSA Screen Agar mais s'est avéré sensible à la méthicilline. La sensibilité du test était donc de 100 %, et sa spécificité de 99,2 %.

### Limites de la procédure

Il peut arriver que des isolats de *S. aureus* présentant une faible CMI de résistance ne se développent pas en 24 h. Lorsque le milieu de dépistage donne des résultats équivoques, il est recommandé de vérifier ces derniers en procédant à un test CMI standard.

Ce milieu ne doit jamais être utilisé pour l'isolement de MRSA directement à partir d'échantillons cliniques.

L'utilisation de la **BD Oxacillin Screen Agar** pour la détection de staphylocoques à coagulase négative résistants à la méthicilline/oxacilline n'est pas recommandée.

### REFERENCES

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](http://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](http://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](http://www.clsi.org)*
9. Data on file. BD Diagnostic Systems. Sparks, MD. USA

### CONDITIONNEMENT

#### BD Oxacillin Screen Agar

N° réf. 257658

Milieus en boîtes de Pétri prêts à l'emploi, 20 unités par carton

### INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Pour plus d'informations, contacter le représentant local de 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