



PENICILLIN-BINDING PROTEIN (PBP2) LATEX AGGLUTINATION TEST DR0900

EN/ES/DE/FR/IT

CS – Český návod k použití je k dispozici na webových stránkách společnosti Oxoid na adrese www.oxid.com.

V části „Návod k použití“ zadejte kód „X“ – podrobné údaje naleznete na štítku láhve. Můžete se též obrátit na místního distributora.

DA – Der fäs en dansk brugervejledning på Oxoids website www.oxid.com. I afsnittet 'Instructions For Use' indfindes 'X'-koden – se flaskens etiket vedrørende detaljer. Alternativt kontaktes den lokale distributor.

EL – Οι Οδηγίες χρήσης στην ελληνική γλώσσα διατίθενται στην ιστοσελίδα της Oxoid www.oxid.com. Στην ενότητα 'Instructions For Use' (Οδηγίες χρήσης), πληκτρολογείτε τον κωδικό 'X' – ανατρέξτε στην εξωτερική συσκευασία για λεπτομέρειες. Εναλλακτικά, επικοινωνήστε με τον τοπικό διανομέα.

NO – Norsk brukerveiledning er tilgjengelig på Oxoids nettsted www.oxid.com. Legg inn 'X'-koden under 'Instructions For Use' – se flasketiketten for flere opplysninger. Alternativt kan du kontakte din lokale forhandler.

PL – Polska instrukcja dostępa jest na stronie internetowej Oxoid www.oxid.com. W części 'Instrukcja użycia' wprowadź kod 'X' – informacje szczegółowe podano na etykiecie butelki. Alternatywnie należy skontaktować się z lokalnym dystrybutorem.

PT-PT – As Instruções de Utilização estão disponíveis em Português no website da Oxoid em www.oxid.com. Na secção das "Instruções de Utilização", insira o código "X" – consulte o rótulo do frasco para obter mais informações. Em alternativa, contacte o distribuidor local.

SV – En svensk bruksanvisning är tillgänglig på Oxoids webbplats www.oxid.com. Skriv in "X"-koden i fältet "Bruksanvisning" – se flaskans etikett för närmare information. Alternativt kan du kontakta din lokala distributor.

BR-PT – As instruções em português estão disponíveis no site da Oxoid www.oxid.com. Na seção 'Instruções de uso' insira o código "X" – consulte a embalagem externa para obter mais detalhes. Como alternativa, entre em contato com o seu distribuidor local.

EN

PENICILLIN-BINDING PROTEIN (PBP2) LATEX AGGLUTINATION TEST DR0900

INTENDED USE

This test is a rapid latex agglutination assay, detecting PBP2 (also called PBP2a)¹, in isolates of *Staphylococcus*, as an aid in identifying methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci.

PRINCIPLES OF THE TEST

Staphylococci are a leading cause of nosocomial and community-acquired infections worldwide¹. In many situations, approximately 25% to 50% of *S. aureus* strains and 75% of coagulase-negative staphylococci (CoNS) are resistant to methicillin¹. MRSA are of particular concern because of the ease with which certain epidemic strains spread and colonize debilitated patients. Treatment of sensitive strains with penicillinase-resistant penicillins (PRP), is preferred as beta-lactam drugs are more easily absorbed into body fluids and tissues, cause fewer complications from treatment, and do not select for vancomycin-resistant organisms. Reliable identification of methicillin-resistance is therefore important.

Strains of *S. aureus* with reduced susceptibility to PRP are categorised as follows:

- (i) methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), which produce the low-affinity penicillin-binding protein PBP2₂, encoded by the *mecA* gene¹
- (ii) borderline methicillin-resistant *S. aureus* (BORSA), generally considered to be due to hyperproduction of type A - beta-lactamase^{1b}
- (iii) strains with modified PBPs due to altered penicillin-binding capacity or hyper-production of PBPs (MODSA)^{1c}.

MODSA have only rarely been isolated and their clinical response to beta-lactam therapy has not been well studied. Thus for clinical purposes, with rare exceptions, the presence of PBP2₂ is responsible for methicillin-resistance in the treatment of infections with *S. aureus* and CoNS^{1c}.

The methicillin-resistant phenotype can be highly heterogeneous, making it difficult to detect by conventional antimicrobial susceptibility test methods, such as Minimum Inhibitory Concentration (MIC), disc and agar screen. The accuracy of these methods is affected by inoculum size, incubation time and temperature, medium, pH, salt concentration and other factors^{1c}. In addition, these culture methods require 24 hours incubation for accurate results. CoNS often produce lower amounts of PBP2 and require induction by exposure to one of the PRPs to produce sufficient product to be detected^{1c,12}.

Detection of the *mecA* gene has been considered the gold standard in the determination of methicillin-resistance because of its accuracy, but this method is labour-intensive and expensive to perform^{1c}. The Oxoid PBP2 Latex Test has the advantage of direct detection of the PBP2 protein performed in a rapid timeframe with minimal labour. It has the potential for being even more accurate than the detection of the *mecA* gene, as false-positive results will not occur with strains that possess *mecA* but are unable to produce the protein product of the gene. In addition, the assay does not detect strains that are hyperproducers of either beta-lactamase or PBPs. The Oxoid PBP2 test has previously been evaluated worldwide, demonstrating its high sensitivity and specificity^{1c,11}.

Latex particles sensitised with a monoclonal antibody against PBP2 will specifically react with methicillin-resistant staphylococci to cause agglutination visible to the unaided eye.

COMPONENTS OF THE KIT

- DR0901** Test Latex sensitised with a monoclonal antibody against PBP2
- DR0902** Control Latex sensitised with a monoclonal antibody of the same IgG subclass showing no reactivity with proteins of *S. aureus*
- DR0903** Extraction Reagent 1
- DR0904** Extraction Reagent 2
- Test Cards
- Mixing Sticks
- Instruction Leaflet

Materials required but not provided

- Micropipette and tips (50µl)
- Microbiological loops (5µl/1µl)
- Boiling water bath or heating block
- Centrifuge (1500 x g)
- Microcentrifuge tubes (safe lock)
- Suitable laboratory disinfectant

PRECAUTIONS

This product is for *in vitro* diagnostic use only.

The heating time should be three minutes. Heating for more than five minutes may lead to a decrease in sensitivity. Heating for only one minute or less may lead to non-specific agglutination. When removing the supernatant for use in the test following centrifugation, withdraw the pipette carefully to avoid solid material at the bottom of the tube. Carry over of solid material may cause non-specific agglutination. Shake the Latex Reagents well to form a homogeneous suspension before use.

Reagents contain 0.095% sodium azide as a preservative. Sodium azide is toxic and may react with lead or copper plumbing to produce metal azides which are explosive by contact detonation. To prevent azide accumulation in plumbing, flush with copious amounts of water immediately after waste disposal.

As specimen materials may contain pathogenic organisms, handle with appropriate precautions. The extraction procedure may not kill bacteria; therefore the extract must be handled with the same precautions.

Extraction Reagents 1 and 2 contain a mild irritant and a weak acid. Avoid direct contact with wearing suitable protective equipment. If the material comes into contact with the skin, mucous membranes or eyes immediately wash the area by rinsing with plenty of water.

STORAGE

Store the kit at 2-8°C. Under these conditions the reagents will retain their reactivity until the expiry date shown on the box.

CONTROL PROCEDURES

For each new lot of the kit and weekly thereafter, the following control procedures must be performed.

1. Positive Control

Use a known MRSA strain such as ATCC[®] 43300 (Oxoid Cult-Loops[®] CL9022). Follow the method given in the test procedure. Ensure that agglutination occurs within 3 minutes.

2. Negative Control

Use a known Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) strain such as ATCC[®] 25923 or ATCC[®]

29213, (Oxoid Cult-Loops[®] CL7010 or CL7011). Follow the method given in the test procedure. Ensure that no agglutination occurs within 3 minutes. Do not use the test if reactions with the control organisms are incorrect.

3. Do not use kits beyond their expiry date.

IMPORTANT PROCEDURE NOTE

Do not allow the reagents to become contaminated by allowing the dropper tip to touch the specimen on the reaction card. Ensure that caps are securely fitted after use to prevent contamination and drying out of the reagents. After use return the kit to the refrigerator ensuring that the bottles are stored in an upright position.

PREPARATION OF CULTURE

Cultures may be tested from any of the following culture media:

Tryptone Soya Agar (Tryptic Soy Agar) with 5% sheep blood (TSA blood), Columbia Agar with 5% sheep blood, Mueller-Hinton Agar. The use of fresh (18-24 hours) cultures is recommended. However, cultures 24-48 hours old may be tested, if necessary to obtain sufficient growth. The performance data quoted in this leaflet were generated using these media as part of the submission to the North American Food and Drugs Administration. Data on file show that the test is also effective with colonies of *S. aureus* from Tryptone Soya Agar and Columbia Agar with 5% horse blood, Iso-Sensitest Agar and DSTA. These media are commonly used in Europe but not in North America, and so they were not used in the trials used to generate the data shown in the Performance Characteristics section.

Special requirements:

The PBP2 test should be performed only on *Staphylococcus* species (Gram-positive cocci). A coagulase or equivalent test must be performed in order to determine if the isolate is *S. aureus* or another species of *Staphylococcus*.

Inoculum preparation:

For *S. aureus*, the test can be performed from well-isolated colonies on the primary isolation plate, if there is sufficient growth, or from a subculture of the isolate. Other microbiota that are present on the plate have not been shown to interfere with the assay. For coagulase-negative staphylococci, an induction is needed for the production of sufficient PBP2.

1. Prepare a broth suspension of the organism equivalent to a 1 McFarland standard and streak a lawn on TSA with blood, Columbia Blood Agar, or Mueller-Hinton Agar. Alternatively, inoculate the agar plate with several colonies and streak in four quadrants.
2. Place an oxacillin disc (1µg/ml) onto the lawn of organisms or in the main inoculum quadrant.
3. Incubate at 37°C for at least 24 hours but not more than 48 hours.

Caution: To avoid false negative results, do not perform the test unless sufficient inoculum is available. Always harvest organisms from close to the disc.

TEST METHOD

PBP2 Extraction Procedure

1. Add four drops of Extraction Reagent 1 into a microcentrifuge tube.
2. Approximately 1.5 x 10⁷ (3-5µl) cells should be tested. This may be achieved by using a sterile 5µl loop to remove sufficient growth to fill the internal diameter of the loop. Alternatively, a sterile 1µl loop may be used to remove several colonies and scoop up a heaped loopful 1mm high covering the external diameter of the loop. Suspend the test culture in the microcentrifuge tube. Vortex, if clumps are present. A very turbid suspension should be visible.
3. Place the tube into boiling water or heating block (OVER 95°C) and heat for three minutes.
4. Remove the microcentrifuge tube and allow it to cool to room temperature.
5. Add one drop of Extraction Reagent 2 into the tube and mix well.
6. Centrifuge at 1500 x g for five minutes, (i.e., 3000rpm at 15cm rotation radius or 4500rpm at 4.5cm rotation radius). Use the supernatant for the test.

Latex Agglutination Procedure

1. For each supernatant to be tested, label one circle of the test card for testing with Test Latex and another for testing with Control Latex.
2. Mix the latex reagents well by inversion several times, and add one drop of Test Latex or Control Latex to each labelled circle.
3. Place 50µl of supernatant on the Test circle and the Control circle, being careful to avoid the pellet. Mix the latex and supernatant in each circle thoroughly with a mixing stick.
4. Pick up and rock the card for up to three minutes and look for agglutination under normal lighting conditions. Record the results of the test.
5. Dispose of reaction card safely into disinfectant or infectious waste.

READING AND INTERPRETATION OF RESULTS

Agglutination is seen with Test but not Control Latex within 3 minutes	PBP2 ⁺ Positive (MRSA)
No agglutination in either Latex Reagent within 3 minutes	PBP2 ⁻ Negative (MSSA)
Agglutination is seen with the Control Latex within 3 minutes	Indeterminate

Strength of agglutination reaction

- Negative (-) = a homogeneous suspension of particles with no visible clumping
- Weak positive (+) = small but definite clumps against a clouded background
- Strong positive (++) = large and small clumps against a slightly clouded background or large clumps against a very clear background.

NB Occasionally, negative reactions may have a finely granular appearance or reactions can be stringy. In such cases, the degree of background clearing should be used to interpret the result. An opaque background indicates a negative result and a clear background should be interpreted as a positive result.

LIMITATIONS

Indeterminate results should be re-tested with a fresh extract. If, upon retesting, the result is again indeterminate, the methicillin resistance must be determined by other methods.

False-negative results can occur if insufficient culture is used for testing. In such cases, the test should be repeated with sufficient culture.

True positive results generally have strong reactions. False-positive reactions have been known to occur rarely, but are generally limited to weak reactions. Such results can be verified by retesting with a fresh culture.

Modified *S. aureus* (MODSA), and borderline resistant strains of *S. aureus* (BORSA) do not possess PBP2 and are not expected to react in this assay.

Some organism strains may have a low level methicillin-resistance or, in rare cases, produce PBP2 in low amounts, and give a false negative result.

Because of limitations in sensitivity and specificity of the CLSI susceptibility test methods for coagulase-negative staphylococci¹, particularly for strains other than *Staphylococcus epidermidis*, the results with the PBP2 assay may not agree with the results of standard susceptibility testing. Strains with MICs of $\leq 0.5\mu\text{g/ml}$ should be considered methicillin-resistant, regardless of the PBP2 assay results.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. The Oxoid Penicillin-Binding Protein Latex Agglutination Test has been evaluated in four geographically diverse laboratories with fresh clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. 201 isolates were tested with NCCLS methods and with the Oxoid PBP2 test from each of three media. One weak false-positive Oxoid Latex reaction (negative on repeat) was found from TSA with blood. All positive reactions were strong, except 3 weak (but positive) reactions from Mueller-Hinton Agar. The sensitivity of the Latex test in detecting MRSA on each medium was 99%; the specificity was 99% for TSA with blood and 100% for tests from all other media.

Results of testing of 201 fresh clinical isolates of *S. aureus* from 4 laboratories:

	MRSA	BORSA ^a	MSSA
No. tested	68	3	130
Growth on Oxacillin Salt Agar (NCCLS)	68	0	0
MIC $\leq 4\mu\text{g/ml}$ (NCCLS)	68	0	0
Positive Latex from TSA Blood	68	0	1 (1) ^b
Positive Latex from Columbia Blood	68	0	0
Positive Latex from Mueller-Hinton	68 (3) ^b	0	0

^a MICs were 2µg/ml and *mecA* was negative.

^b Number of weak reactions shown in parentheses.

2. Testing of challenge strains of *S. aureus* in three geographically distinct areas:

Three laboratories each examined a set of previously collected challenge strains of *S. aureus* and compared the PBP2 results to the NCCLS methods of determination of MRSA. A total of 724 strains were tested from TSA with blood. The sensitivity of the Oxoid PBP2 Test was 98.5% and the specificity was 100%. Sensitivities of the agar screen and MIC methods were 98.7% and 99.2% and specificities were 90.0% and 88.7%. Two strains of MODSA were also tested separately; both strains gave a negative result with the Latex test.

3. Testing Coagulase-negative staphylococci

Two laboratories tested coagulase-negative staphylococci for PBP2 after induction with oxacillin discs. One laboratory tested 115 methicillin-resistant strains and 45 methicillin-susceptible strains, including 58 fresh clinical isolates. The sensitivity was 96.5% for testing from TSA blood and 95.6% for Mueller-Hinton Agar. The specificity was 100% from TSA blood and 98% from Mueller-Hinton Agar. Obtaining a good inoculum was more difficult with Mueller-Hinton Agar. The second laboratory tested 212 methicillin-resistant strains and 203 methicillin-susceptible strains with a sensitivity of 99.5% and specificity of 99.5%, using growth on Columbia Agar for the inoculum.

4. Reproducibility

Ten different well-characterised *S. aureus* strains (3 MRSA, 3 MSSA, 3 BORSA and 1 MODSA) were sent to

three geographically diverse laboratories with each strain submitted 5 times in a coded and blinded fashion. All 150 test results agreed with the expected results for 100% reproducibility. The three *mecA* positive strains were positive each time they were tested (45/45 tests). The three MSSA and three BORSA strains gave negative results each time the test was performed (90/90 tests). The MODSA strains had a MIC of 16µg/ml to oxacillin and gave a negative result in the Oxoid Latex Test, as expected, each time the test was performed (15/15 tests).

REFERENCES

1. Bignardi G.E., Woodford N., Chapman A., et al (1998). *J. Antimicrobiol. Chemother.*, **37**:53-63.
2. Chambers H.F., (1997). *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**:781-791.
3. Gerberding J.L., Mick C., Liu H.H., et al (1991). *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**:2574-2579.
4. Hussain Z., Stokes L., Garrow S., et al (2000). *J. Clin. Microbiol.*, **38**:2051-2054.
5. Louie L., Matsumura S.O., Choi E., et al (2000). *J. Clin. Microbiol.*, **38**:2170-2173.
6. Murakami K., Minamide W., Wada K., et al (1991). *J. Clin. Microbiol.*, **29**:2240-2244.
7. Nakatomi Y., and Sugiyama J., (1998). *Microbiol. Immunol.*, **42**:739-743.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000 Approved Standard Fifth Edition (M7-A5)). National committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
9. Tanover F.C., Jones R.N., Swenson J.M., et al (1999). *J. Clin. Microbiol.*, **37**:4051-4058.
10. Thornsbury C. and McDougal L. (1983). *J. Clin. Microbiol.*, **18**:1084-1091.
11. Yamazumi T., Marshall S.A., Wilke W.W., et al (2001). *J. Clin. Microbiol.*, **39**:53-56.
12. York M.K., Gibbs L., Chehab F., et al (1996). *J. Clin. Microbiol.*, **34**:249-253.

ES

PENICILLIN-BINDING PROTEIN (PBP2) LATEX AGGLUTINATION TEST DR0900

UTILIDAD

Esta prueba es un ensayo rápido de aglutinación de látex para detectar PBP2₂ (también denominada PBP2a)¹ en aislados de *Staphylococcus*, diseñado para la identificación de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes y estafilococos coagulasa-negativos meticilina-resistentes.

PRINCIPIOS DE LA PRUEBA

Los estafilococos son una de las causas más frecuentes de infecciones nosocomiales y extrahospitalarias en todo el mundo¹. En muchos hospitales, entre el 25 y el 50% de los aislados de *S. aureus* y el 75% de los de estafilococos coagulasa-negativos, son resistentes a meticilina¹. Los MRSA suponen un problema sanitario especialmente importante, debido a la facilidad con la que determinadas razas epidémicas se extienden y colonizan pacientes debilitados. El tratamiento de los aislados sensibles con penicilinas resistentes a la penicilinas (PRP) es de elección, puesto que los antibióticos betalactámicos tienen una buena distribución a los tejidos, producen menos complicaciones terapéuticas y no seleccionan microorganismos resistentes a vancomicina. La identificación correcta y fiable de la resistencia a meticilina es, por tanto, de capital importancia.

Las razas de *S. aureus* con sensibilidad reducida a las PRP se clasifican en las siguientes categorías:

- (i) *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA, del inglés methicillin-resistant *S. aureus*), que produce la proteína fijadora de penicilina de baja afinidad PBP2₂, codificada por el gen *mecA*¹
- (ii) *S. aureus* de resistencia incierta a meticilina (BORSA, del inglés borderline methicillin-resistant *S. aureus*), que habitualmente se debe a hiperproducción de beta-lactamasa tipo A^{1b}, y
- (iii) razas con PBPs modificadas debido a una capacidad alterada de fijación de la penicilina o a una hiperproducción de PBPs (MODSA, del inglés modified *S. aureus*)^{1c}. Los MODSA se han aislado en raras ocasiones y su respuesta clínica a la terapia con betalactámicos no ha sido bien estudiada. Por tanto, a efectos clínicos, la resistencia a meticilina en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* o estafilococos coagulasa-negativos se debe, con raras excepciones, a la presencia de PBP2.

El fenotipo meticilina-resistente puede ser muy heterogéneo, lo que hace difícil su detección mediante los métodos convencionales de estudio de la sensibilidad antimicrobiana, tales como la Concentración Inhibidora Mínima (CIM), o los métodos de criba en agar o con disco. La exactitud de estos métodos se ve afectada por la densidad del inóculo, temperatura y tiempo de incubación, medio utilizado, pH, concentración de sales y otros factores^{1c}. Además, todos estos métodos basados en el cultivo necesitan un período de 24 horas de incubación para obtener resultados fiables. Los estafilococos coagulasa-negativos producen con frecuencia concentraciones bajas de PBP2₂ y pueden necesitar de una inducción por exposición a una de las PRPs, para producir una cantidad suficiente que pueda ser detectada^{1c,12}.

La detección del gen *mecA* se ha considerado como el "gold standard" en la determinación de la resistencia a meticilina, debido a su exactitud, pero es un método de realización compleja y de alto coste económico^{1c}. El "Oxoid PBP2 Latex Test" tiene la ventaja de la detección directa de la PBP2₂, de manera rápida y con un trabajo mínimo. Puede ser incluso más exacta que la detección del gen *mecA*, puesto que no dará resultados positivos en aquellos aislados que poseen el gen pero que no producen la proteína. Además, no detecta aquellos aislados que simplemente sean hiperproductores ya sea de betalactamasa, o de PBPs.

El "Oxoid PBP2 Test" ha sido evaluado a nivel mundial, habiendo demostrado una gran sensibilidad y especificidad^{1c,11}.

Las partículas de látex sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal contra la PBP2₂, reaccionarán específicamente con los estafilococos meticilina-resistentes y producirán una aglutinación visible a simple vista.

COMPONENTES DEL EQUIPO

- DR0901** Látex Reactivo sensibilizado con un anticuerpo monoclonal contra la PBP2
- DR0902** Látex de control sensibilizado con un anticuerpo monoclonal de la misma subclase de IgG sin reactividad con proteínas de *S. aureus*
- DR0903** Reactivo de Extracción 1
- DR0904** Reactivo de Extracción 2
- Tarjetas de Reacción
- Palitos mezcladores
- Prospecto de instrucciones

Material necesario no suministrado

- Micropipeta y puntas (50µl)
- Asas microbiológicas (5µl/1µl)
- Baño de ebullición o bloque térmico
- Centrifuga (1500 x G)
- Tubos de microcentrifuga (con cierre de seguridad)
- Desinfectante de laboratorio adecuado.

PRECAUCIONES

Este producto es para uso *in vitro* exclusivamente.

El tiempo de calentamiento debe ser de tres minutos. Por encima de cinco minutos disminuye la sensibilidad. Si es de un minuto o menos se pueden producir aglutinaciones inespecíficas.

Al recoger el sobrenadante para la prueba tras la centrifugación, se debe evitar aspirar o recoger con la punta de la pipeta material sólido del fondo del tubo, ya que éste podría producir aglutinaciones inespecíficas.

Los reactivos de látex se deben agitar hasta conseguir una suspensión homogénea antes de su uso.

Los reactivos contienen un 0,095% de azida sódica como conservante. La azida sódica es tóxica y puede reaccionar con las cañerías de plomo o cobre y producir azidas metálicas que son explosivas por detonación de contacto. Para evitar la acumulación de azidas en las cañerías de los desagües, se debe dejar correr un volumen abundante de agua tras el vertido del material de desecho.

Puesto que las muestras pueden contener microorganismos patógenos, se deben manipular con las precauciones adecuadas. El procedimiento de extracción puede no matar a las bacterias y, por tanto, el extracto se debe manipular con las mismas precauciones.

Los Reactivos de Extracción 1 y 2 contienen un irritante ligero y un ácido débil. Se debe evitar el contacto directo mediante el uso del equipo protector adecuado. Si se produce un contacto con la piel, membranas mucosas u ojos se debe lavar inmediatamente el área afectada con agua corriente abundante.

CONSERVACION

El equipo se debe conservar a 2-8°C. En esas condiciones, los reactivos mantendrán su actividad hasta la fecha de caducidad indicada en la caja.

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL

Para cada equipo que se empiece de un nuevo lote y una vez a la semana mientras dure, se deben seguir los siguientes procedimientos de control.

1. **Control Positivo:** utilícese una raza conocida de MRSA, como la ATCC[®] 43300 (Oxoid Cult-Loop CL9022). El control positivo debe producirse en el prospecto de instrucciones. La aglutinación se debe producir en un plazo de tres minutos.
2. **Control Negativo:** utilícese una raza conocida de *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA), como la ATCC[®] 25923 (Oxoid Cult-Loop CL7010). Sigase el método indicado en el prospecto de instrucciones. No se debe producir aglutinación en un plazo de tres minutos. Si las reacciones obtenidas con los microorganismos de control no son correctas, el equipo no debe utilizarse.
3. No se debe utilizar el equipo más allá de la fecha de caducidad.

NOTA IMPORTANTE

Se debe evitar la contaminación de los reactivos por contacto de la punta del gotero con la muestra en la tarjeta de reacción. Una vez se ha terminado de usar el equipo, los tapones de los goteros se deben recolocar con firmeza, a fin de evitar la contaminación y el secado de los reactivos. El equipo se debe volver a refrigerar inmediatamente, con los viales en posición vertical.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se puede analizar colonias obtenidas de los siguientes medios de cultivo:

Agar Tryptone Soya (Tryptic Soy Agar) con 5% de sangre de carnero (Agar sangre TSA), Agar columbia con 5% de sangre de carnero, Agar Mueller-Hinton. Se recomienda la utilización de cultivos frescos (18-24 horas), pero se puede utilizar cultivos de 24-48 horas, si es necesario para obtener crecimiento suficiente. Los datos de las características de funcionamiento que aparecen en este prospecto, se obtuvieron utilizando los medios indicados, como parte de la documentación remitida a la Food and Drug Administration de los EE.UU. Se dispone de datos que indican que la prueba también puede realizarse con colonias de *S. aureus* aisladas en Agar Tryptone Soya y Agar Columbia con 5% de sangre de caballo, agar Iso-Sensitest y Agar DST. Estos medios son de uso frecuente en Europa pero no en Norteamérica, por lo que se utilizaron en los ensayos que generaron los datos que se muestran en la sección Características de Funcionamiento.

Requerimientos especiales:

La prueba de PBP2 se debe realizar sólo con bacterias del género *Staphylococcus* (cocos grampositivos). Se debe realizar una prueba de coagulasa, o equivalente, a fin de determinar si el aislado es un *S. aureus* u otra especie de estafilococo.

eingetaucht wird. Verschließen Sie nach Gebrauch die Tropffläschen sorgfältig, um die Reagenzien vor Kontamination und Austrocknung zu schützen. Legen Sie die Testpackung nach Gebrauch zurück in den Kühlschrank oder Kühlraum.

Probenmaterial

Für den Test können Kolonien von nachfolgend aufgeführten Nährböden eingesetzt werden.

Es sollten frische Kulturen nach einer Bebrütung von 18-24 Stunden verwendet werden, jedoch können auch 24-48 Stunden alte Kolonien getestet werden, sofern dies zum Erhalt ausreichender Mengen an Koloniematerial notwendig sein sollte. Die in dieser Packungsbeilage aufgeführten Daten zur Leistungscharakteristik wurden mit nachstehenden Medien und im Rahmen der FDA-Zulassung des Tests erhoben.

Columbia-Agar mit Schafblut

Mueller-Hinton-Agar

Caseinpepton-Sojamehlopepton-(CASO)-Agar mit Schafblut

Interne Daten zeigen, daß der Test ebenso mit *S. aureus* Kolonien von Columbia-Agar mit Pferdeblut, Caseinpepton-Sojamehlopepton-(CASO)-Agar mit Pferdeblut, DST und Isosensitest-Agar durchgeführt werden kann. Diese Medien sind in Europa, nicht aber den USA gebräuchlich und somit wurden sie nicht in den Untersuchungen zu den in Abschnitt „Leistungsmerkmale“ aufgeführten Daten eingesetzt.

Besondere Hinweise:

Der PB2²-Latex-Test sollte nur mit Staphylokokken-Spezies durchgeführt werden. Ein Koagulase- oder ähnlicher Test muss durchgeführt werden, um die Identität des Isolates als *S. aureus* oder andere Staphylokokken-Spezies festzustellen.

Herstellen des Inokulums:

Im Falle von *S. aureus* kann der Test direkt mit einzelnen Kolonien einer Primärplatte oder gegebenenfalls Subkultur durchgeführt werden, sofern ausreichendes Wachstum vorliegt. Eine Beeinflussung des Tests durch Wachstum von Begleitflora auf diesen Platten konnte bisher nicht beobachtet werden.

Bei koagulasenegativen Staphylokokken muß vor Durchführung des Tests eine ausreichende Produktion des PB2² induziert werden.

1. Herstellen einer Suspension mit McFarland-Standard von 1 und Ausrich auf Caseinpepton-Sojamehlopepton-(CASO)-Agar mit Schafblut, Columbia-Agar mit Schafblut oder Mueller-Hinton-Agar. Alternativ können die Platten auch mit mehreren Einzelkolonien in vier Quadranten ausgebracht werden.

2. Auflegen eines Oxacillin-Testblättchens (1µg) an einer Position, an der rasenförmiges Bakterienwachstum erwartet werden kann.

3. Inkubation bei 37°C für mindestens 24 aber nicht mehr als 48 Stunden.

Achtung: um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden, kann der Test erst durchgeführt werden, wenn ausreichend Koloniematerial vorhanden ist. Für den Test immer Kolonien verwenden, die nahe um das Testblättchen gewachsen sind.

DURCHFÜHRUNG

Extraktionsverfahren

1. Jeweils 4 Tropfen Extraktionsreagenz 1 in ein Reaktionsgefäß geben.

2. Für den Test stellen ungefähr 1,5 x 10⁷ (3-5µl) Zellen verwendet werden. Hierfür mit einer sterilen, 5µl Impfloße so viel verdächtiges Koloniematerial vom Nährboden abheben, daß der Ring („Loop“) der Impfloße gefüllt ist. Alternativ eine sterile 1µl Impfloße verwenden, mit der 3 Portionen verdächtiges Koloniematerial (der Ring der Impfloße sollte jeweils gefüllt sein) abgenommen werden. Koloniematerial im Extraktionsreagenz homogen suspendieren.

3. Reaktionsgefäß in einem kochenden Wasserbad oder Heizblock (ÜBER 95°C) für 3 Minuten inkubieren.

4. Reaktionsgefäß aus dem Wasserbad oder Heizblock nehmen und auf Raumtemperatur abkühlen.

5. 1 Tropfen Extraktionsreagenz 2 zufügen und gut mischen.

6. Ansatz für 5 Minuten bei 1.500 g zentrifugieren. Dies entspricht 3.000 rpm bei einem Rotor-Radius von 15cm oder 4.500 rpm bei einem Radius des Rotors von 4,5cm). Den Überstand für den Test einsetzen.

Agglutinationsverfahren

1. Je zu untersuchender Probe werden 2 Felder einer Reaktionskarte benötigt. Ein Feld ist zur Durchführung des Tests, das zweite für die Durchführung der Negativ-Kontrolle erforderlich. Felder bitte entsprechend beschriften (z.B. TEST und KONTROLLE).

2. 5-10 µl Überstand aus dem Reaktionsgefäß entnehmen und auf je ein Feld der Reaktionskarte auftragen. 1 Tropfen Latex-Testreagenz (DR901) auf das mit TEST beschriftete Feld auftropfen. Überstand und Latex-Testreagenz mit einem Rührstäbchen gut mischen.

3. 1 Tropfen Latex-Kontrollreagenz (DR902) auf das mit KONTROLLE beschriftete Feld auftropfen. Überstand und Latex-Kontrollreagenz mit einem neuen Rührstäbchen gut mischen.

4. Die Reaktionskarte vorsichtig schwenken und auf Agglutination innerhalb von 3 Minuten prüfen. Dazu keine Vergrößerungshilfe benutzen

5. Reaktionskarte in einem geeigneten Desinfektionsmittel entsorgen.

AUSWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Agglutination des Latex-Testreagenz aber nicht des Kontrollreagenz innerhalb 3 Minuten PB2²-Positiv MRSA oder MR-KNS

Keine Agglutination in beiden Reagenzien PB2²-Negativ MSSA oder MS-KNS

Agglutination mit dem Kontrollreagenz innerhalb 3 Minuten Nicht auswertbar

Anmerkung: Negative Reaktionen können gelegentlich leicht feinkörnig oder fädig erscheinen. In diesen Fällen sollte das Aufklaren des Hintergrundes als einer anderen Methode bestimmt werden. Ein opaker Hintergrund weist auf eine negative Reaktion, ein Aufklaren des Hintergrundes auf eine positive Reaktion hin.

TESTBECHRÄNKUNGEN

1. Nicht auswertbare Ergebnisse sollten mit einem frischen Extrakt erneut getestet werden. Tritt erneut eine nicht auswertbare Reaktion auf, muss die Methicillin-Resistenz mit einer anderen Methode bestimmt werden.

2. Eine nicht ausreichende Menge an Koloniematerial kann zu einem falsch-negativen Ergebnis führen. In diesem Fall sollte der Test mit ausreichend Koloniematerial wiederholt werden.

3. Richtig-positive Ergebnisse zeigen im allgemeinen einen starken Reaktionsausfall. Falsch-positive Ergebnisse wurden bislang selten beobachtet und wiesen generell eher schwache Reaktionen auf. Solche Reaktionsausfälle können durch einen erneuten Test einer frischen Kultur verhindert werden.

4. *S. aureus* mit einer Überproduktion an PBPs (MODSA) und Borderline-resistente Stämme von *S. aureus* (BORSA) besitzen kein PB2² und reagieren nicht mit diesem Test.

5. Manche Stämme weisen eine low-level Methicillin-Resistenz bzw. geringe Mengen an PB2² auf und können falsch-negative Ergebnisse zeigen.

6. Bedingt durch die Einschränkungen der Spezifität und Sensitivität der CLSI- Methode zur Empfindlichkeitsprüfung koagulasenegativer Staphylokokken¹, insbesondere für Stämme die nicht der Spezies *S. epidermidis* angehören, können die Ergebnisse des PB2²-Latex-Tests von denen der Standard-Empfindlichkeitsprüfung abweichen. Stämme mit einer MHK $\geq 0,5\mu\text{g/ml}$ sollten unabhängig vom PB2²-Ergebnis als Methicillin-resistent angesehen werden.

LEISTUNGSMERKMALE

1. Der PB2²-Latex-Test wurde in 4 unterschiedlichen Laboratorien mit frischen klinischen Isolaten von *S. aureus* evaluiert. 201 Isolate wurden mit der NCCLS-Methode und dem Oxoid PB2²-Latex-Test von 3 unterschiedlichen Medien getestet. Eine schwach falsch-positive Latexagglutination (negativ bei erneuter Testung) wurde mit Caseinpepton-Sojamehlopepton-(CASO)-Agar mit Schafblut beobachtet. Alle positiven Reaktionen waren deutlich, bis auf 3 schwache (aber positive) Reaktionen von Mueller-Hinton-Agar.

Die Sensitivität des Latex-Tests bezüglich der Detektion von MRSA betrug 100% auf allen getesteten Medien. Die Sensitivität betrug 99% für Caseinpepton-Sojamehlopepton-(CASO)-Agar mit Schafblut und 100% für die übrigen Medien.

Ergebnisse der Untersuchung von 201 klinischen Isolaten von *S. aureus* in 4 Laboratorien:

	MRSA	BORSA ^a	MSSA
Anzahl getesteter Stämme	68	3	130
Wachstum auf Oxacillin Salt Agar (NCCLS)	68	0	0
MHK $\geq 4\mu\text{g/ml}$ (NCCLS)	68	0	0
Positiver Latex Test von CASO Agar mit Blut	68	0	1 (1) ^a
Positiver Latex Test von Columbia Agar mit Blut	68	0	0
Positiver Latex Test von Mueller-Hinton-Agar	68 (3) ^a	0	0

^a MHK betrug 2µg/ml und mecA war negativ

^a Anzahl der schwachen Reaktionen in Klammern

2. Untersuchung von *S. aureus* Stämmen in 3 geographisch unterschiedlichen Regionen: Drei Laboratorien untersuchten zuvor gesammelte Stämme von *S. aureus* und verglichen die Ergebnisse des PB2²-Latex-Test mit den NCCLS-Methoden zur Bestimmung von MRSA. Insgesamt wurden 724 Stämme von Caseinpepton-Sojamehlopepton-(CASO)-Agar mit Schafblut getestet. Die Sensitivität und Spezifität des Oxoid PB2²-Latex-Test betrug 98,5% und 100%. Die Sensitivitäten der Agar-Screen- und MHK-Methode betrugen 98,7% und 99,2% während die Spezifitäten mit 90,0% und 88,7% ermittelt wurden.

Zusätzlich wurden 2 MODSA-Stämme untersucht. Beide erbrachten ein negatives Ergebnis mit dem Latex-Test.

3. Untersuchung von koagulasenegativen Staphylokokken:

Zwei Laboratorien testeten koagulasenegative Staphylokokken auf PB2² nach Induktion mit Oxacillin-Testblättchen. Ein Labor testete 115 Methicillin-resistente und 45 Methicillin-sensible Stämme inklusive 58 frischer klinischer Isolate. Die Sensitivität betrug 96,5% von Caseinpepton-Sojamehlopepton-(CASO)-Agar mit Schafblut und 95,6% von Mueller-Hinton-Agar. Die Spezifität betrug 100% von Caseinpepton-Sojamehlopepton-(CASO)-Agar mit Schafblut und 98% von Mueller-Hinton-Agar. Ein ausreichendes Inokulum war schwieriger von Mueller-Hinton-Agar zu erhalten. Das zweite Labor testete 212 Methicillin-resistente und 203 Methicillin-

sensible Stämme mit einer Sensitivität von 99,5% und einer Spezifität von 99,5% von Columbia-Agar mit Schafblut.

4. Reproduzierbarkeit:

10 verschiedene, gut charakterisierte *S. aureus* Stämme (3 MRSA, 3 MSSA, 3 BORSA und 1 MODSA) wurden an 3 Laboratorien in verschiedenen Regionen verschickt. Hierbei erhielt Jedes Labor jeden Stamm 5 Mal als codiertes, anonymisiertes Isolat. Alle 150 Ergebnisse erbrachten das erwartete Resultat für 100% Reproduzierbarkeit. Die 3 mecA-positiven Stämme ergaben bei jedem Test ein positives Ergebnis (45/45 Tests). Die 3 MSSA sowie die 3 BORSA ergaben bei jedem Test ein negatives Ergebnis (90/90 Tests). Der MODSA Stamm mit einer MHK von 16µg/ml Oxacillin ergab jedesmal das erwartete negative Ergebnis mit dem Oxoid Latex Test (15/15 Tests).

FR

TEST LATEX (PLP2²) Test au latex pour la détection des Protéines Liant la Pénicilline (PLP2²)

DR9000

Ce kit détecte les PLP2² (ou PB2pa²) sur les isolats de *Staphylococcus* pour l'identification des *Staphylococcus aureus* résistants à la pénicilline (SARM) et pour les staphylocoques coagulase négative méticilline résistant.

PRINCIPE DU TEST

Les Staphylocoques ont une cause majeure d'infections nosocomiales et communautaires dans le monde¹. Dans un grand nombre d'institutions, environ 25% à 50% des souches de *S. aureus* et 75% des staphylocoques coagulase négative (CoNS) sont résistants à la méticilline²⁻³. Les SARM sont à considérer particulièrement dans la mesure où certaines souches épidémiques disséminent facilement et colonisent les patients. Le traitement de choix des souches sensibles est une pénicilline résistant aux pénicillinases, car les α -lactamines diffusent facilement dans le corps humain, présentent peu d'effets secondaires et ne sélectionnent pas de souches vancomycine résistantes. Une identification précise de la résistance à la méticilline est donc nécessaire. Les souches de *S. aureus* de sensibilité réduite aux pénicillines sont classées comme suit:

- S. aureus* méticilline résistant (SARM), produisant une PLP2 d'affinité réduite pour les pénicillines et codée par le gène *mecA*^{4,5}.
- S. aureus* résistant „border-line“ à la méticilline (BORSA), résistance généralement considérée comme étant du à une hyperproduction de α -lactamase de classe A^{6,7}, et
- (iii) Des souches porteuses de PLPs modifiées avec une capacité de liaison aux pénicillines modifiée ou hyperproduction de PLPs (MODSA)^{8,9}. Les MODSA ont rarement été isolés et leur réponse clinique aux α -lactamines n'est pas encore bien connue. En clinique, à de rares exceptions près, la présence de PLPs est responsable de la résistance à la méticilline pour le traitement des infections à *S. aureus* et CoNS¹⁰.

Le phénotype de résistance à la méticilline peut être hétérogène, rendant le diagnostic difficile par les méthodes conventionnelles d'antibiogramme. La précision de ces méthodes est altérée par la taille de l'inoculum, le temps et la température d'incubation, le milieu, le pH, la concentration en sel et d'autres facteurs¹¹. De plus, ces méthodes de culture nécessitent 24 heures d'incubation pour des résultats fiables. Les CoNS produisent souvent des quantités moindres de PLP2 et nécessitent une induction préalable par exposition à une pénicilline, de façon à produire une quantité suffisante de PLP2 pour être détectée¹²⁻¹³.

La mise en évidence du gène *mecA* est considérée comme le gold standard dans la détermination de la résistance à la méticilline, mais cette méthode nécessite du temps et reste onéreuse¹⁴. Le latex PLP2 a l'avantage d'être une méthode directe et rapide de détection de la protéine PLP2 avec un temps de manipulation réduit. Cette méthode peut parfois être plus précise que la détection du gène *mecA*, car il n'y a pas de risque d'avoir des faux positifs avec les souches possédant le gène *mecA* mais incapables de produire la protéine. De plus, le test ne détecte pas les souches qui sont hyperproductrices de α -lactamases ou de PLPs.

Le test OXOID PLP2 a été évalué dans le monde entier démontrant une excellente sensibilité et spécificité¹⁴⁻¹⁵.

Les particules de latex sensibilisées avec un anticorps monoclonal contre les PLP2 vont réagir spécifiquement avec les staphylocoques résistant à la méticilline et provoquer une agglutination visible à l'œil nu.

COMPOSITION DU COFFRET

DR9001 Latex sensibilisé par un anticorps monoclonal dirigé contre les PLP2.
DR9002 Latex de contrôle sensibilisé par un anticorps monoclonal de la même sous-classe d'Ig Gne montrant aucune réactivité avec les protéines de *S. aureus*.

DR9003 Réactif d'extraction 1

DR9004 Réactif d'extraction 2

Cartes test

Sticks

Notice

Matériel nécessaire mais non fourni

- Micropipettes et embouts (50µl)
- Oeases (5µl ou 1µl)
- Bain-marie bouillant ou bloc chauffant
- Centrifugeuse (1500g)
- Microtubes à centrifuger
- Désinfectant de laboratoire

PRÉCAUTIONS

Pour diagnostic *in vitro* uniquement.

Le temps de chauffage est de 3 minutes. Un chauffage au-delà de 5 minutes peut conduire à une baisse de sensibilité. Un chauffage inférieur à 1 minute peut conduire à des agglutinations non spécifiques.

Quand on prélève le surnageant après centrifugation pour effectuer le test, éviter de prélever des particules au fond du tube. Ceci pourrait conduire à des agglutinations non spécifiques.

Bien mélanger les réactifs au latex de façon à obtenir une suspension homogène. Les réactifs contiennent 0,095% d'azide de sodium comme conservateur. L'azide de sodium est toxique et peut réagir avec la tyauaterie en plomb ou en cuivre pour former des azotures métalliques hautement explosifs. Pour prévenir une accumulation dans la tyauaterie, éliminer avec un grand volume d'eau.

Les échantillons peuvent contenir des germes pathogènes : manipuler avec précaution. La procédure d'extraction peut ne pas tuer les germes, donc l'extrait doit être manipulé avec les mêmes précautions.

Les réactifs d'extraction 1 et 2 contiennent un composant légèrement irritant et un acide faible. Éviter le contact direct en portant des vêtements appropriés. En cas de contact avec la peau, les muqueuses ou les yeux, laver immédiatement avec une grande quantité d'eau.

CONSERVATION

Le coffret doit être conservé à 2-8°C. Dans ces conditions, les réactifs sont valables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le coffret.

PROCÉDURES DE CONTRÔLE

Pour chaque nouveau lot de réactif et ensuite une fois par semaine, les procédures de contrôle suivantes doivent être établies:

- Contrôle positif:** utiliser une souche SARM connue, telle que ATCC[®] 43300 (Culti-Loops[®] OXOID CL9022). Suivre la méthode mentionnée dans la section «Mode d'emploi». S'assurer que l'agglutination apparaît en 3 minutes.
- Contrôle négatif:** utiliser une souche de *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SASM), telle que ATCC[®] 25923 ou ATCC[®] 29213 (Culti-Loops[®] OXOID CL7010 ou CL7011). Suivre la méthode mentionnée dans la section «Mode d'emploi». S'assurer qu'aucune agglutination n'apparaît en 3 minutes.
- Ne pas utiliser le test si les réactions de contrôle sont incorrectes.
- Ne pas utiliser les coffrets après la date de péremption.

NOTE IMPORTANTE

Ne pas contaminer le réactif en touchant l'échantillon sur la carte de réaction avec l'embout du compte-gouttes. S'assurer que les bouchons sont bien vissés après utilisation pour prévenir toute contamination ou dessèchement des réactifs. Après utilisation, replacer les coffrets au réfrigérateur en position verticale.

Reueil et préparation des échantillons

Le test doit être réalisé à partir de colonies fraîches sur l'un des milieux gélosés suivants :

Gélose Columbia +5% de sang de mouton, Mueller-Hinton, Tryptone soja +5% de sang de mouton.

Il est recommandé d'utiliser des cultures fraîches (18-24 heures). Néanmoins des cultures de 24h à 48h peuvent être utilisées si nécessaire.

Les performances indiquées dans cette notice (faisant partie de la validation FDA) ont été générées à partir de ces milieux.

D'autres données montrent que le test est également valide avec des colonies de *S. aureus* cultivés sur Tryptone soja et Columbia +5% de sang de chape, gélose Iso-Sensitest et DSTA. Ces milieux sont couramment utilisés en Europe mais pas en Amérique du Nord où ont été générées les études relatives aux performances. Le test PLP2 doit être utilisé uniquement sur les staphylocoques (coccil gram+). Une coagulase ou un test équivalent doit être fait pour déterminer si l'agit d'un *S. aureus* ou d'une autre espèce de staphylocoque.

Préparation de l'inoculum

Pour *S. aureus*, le test peut être fait à partir de colonies isolées sur la première boîte d'isolation si la pousse est suffisante ou à partir d'une subculture. Les autres micro-organismes présents sur la boîte n'ont pas montré d'interférences avec le test.

Pour les staphylocoques coagulase négative, une induction est nécessaire pour avoir une production suffisante de PLP2.

1. Préparer un bouillon du germe à tester équivalent à 1 McFarland et ensemencer en nappe sur une gélose Tryptone soja au sang, Columbia au sang ou Mueller-Hinton. Une autre possibilité est d'ensemencer la boîte en 4 quadrants.

2. Placer un disque d'oxacilline (1µg/ml) sur la boîte (à l'endroit où il y a le plus de germes pour la méthode des quadrants).

3. Incuber à 37°C pendant au moins 24h mais pas plus de 48h.

Attention: Pour éviter d'avoir de faux négatifs, ne pas faire le test si l'inoculum est trop faible.

MODE D'EMPLOI

Extraction des PLP2

- Ajouter 4 gouttes de réactif d'extraction 1 dans un microtube.
- Environ 1,5x10⁷ (3-5µl) cellules doivent être testées. Il est possible d'utiliser une oese stérile de 5µl et d'en remplir le diamètre intérieur avec les colonies. Il est aussi possible d'utiliser une oese de 1µl et de prélever plusieurs colonies de façon à remplir l'oese et à recouvrir de 1mm le diamètre extérieur de l'oese. Mettre en suspension ces colonies dans le microtube. Vortexer si des agrégats sont visibles. La suspension doit être très trouble.
- Placer le tube dans un bain-marie bouillant ou un bloc chauffant (à 100°C) pendant 3 minutes.
- Sortir le tube et le laisser revenir à température ambiante.
- Ajouter une goutte de réactif d'extraction 2 dans le tube et bien mélanger.
- Centrifuger à 1500g pendant 5 minutes (c'est à dire 3000rpm avec un rayon de rotation de 15 cm ou 4500rpm avec un rayon de rotation de 4,5cm). Utiliser le surnageant pour le test.

Procédure d'agglutination

- Pour chaque surnageant à tester, identifier un cercle de la carte de réaction pour le latex test et un autre cercle pour le latex de contrôle.
- Bien mélanger les latex en retournant les flacons plusieurs fois et déposer une goutte de latex test ou de latex contrôle dans chaque cercle.
- Déposer 50µl de surnageant sur le cercle test et sur le cercle contrôle en évitant de toucher le culot. Bien mélanger le latex et le surnageant dans chaque cercle avec un stick.
- Imprimer un mouvement de rotation à la carte pendant 3 minutes et observer l'agglutination dans des conditions de lumière normale.
- Éliminer la carte de réaction dans un désinfectant.

LECTURE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Agglutination avec le latex test, mais pas avec le latex de contrôle en 3 minutes	PLP2 ² (+) (SARM)
Pas d'agglutination avec le latex test et contrôle en 3 minutes	PLP2 ² (-) (SASM)
Agglutination avec le latex de contrôle en 3 minutes Non interprétable	

Intensité de l'agglutination

Négative (-) = Suspension homogène sans agrégat visible
Positif faible (+) = Petits agrégats visibles sur un fond trouble
Positif fort (++) = Petits gros agrégats sur un fond trouble ou gros agrégats sur un fond clair.

NB : Occasionnellement des réactions négatives peuvent avoir une apparence granuleuse très fine ou certaines réactions peuvent être filamenteuses. Dans ce cas, le résultat doit être interprété en fonction du degré d'éclaircissement du fond. Un fond opaque indique que la réaction est négative, tandis qu'un éclaircissement du fond indique que la réaction est positive.

LIMITES

- En cas de résultat interprétable, la souche doit être re-testée sur un nouvel extrait frais. Si le résultat est toujours interprétable, déterminer la résistance à la méticilline par une autre technique.
- Des faux négatifs peuvent être observés si une quantité insuffisante de culture est testée. Dans ce cas, le test doit être répété avec suffisamment de germes.
- Les résultats vrais positifs produisent généralement des réactions fortes.
- Les réactions faussement positives sont rares, et sont généralement de faible intensité. Ces résultats peuvent être vérifiés avec des cultures fraîches.
- Les *S. aureus* de type MODSA et BORSA ne possèdent pas de PLP2 et ne doivent donc pas réagir avec ce test.
- Certaines souches peuvent avoir un bas niveau de résistance à la méticilline, ou dans de rares cas produire des quantités de PLP2 en faible quantité et donner des résultats faussement négatifs.
- À cause des limitations de sensibilité et spécificité des tests d'antibiogramme CLSI pour les staphylocoques coagulase négative¹, spécialement pour les souches autres que *S. epidermidis*, les résultats du test PLP2 peuvent ne pas être en accord avec les résultats de l'antibiogramme standard. Les souches avec des CMI $\geq 0,5\mu\text{g/ml}$ doivent être considérées comme résistantes à la méticilline quels que soient les résultats du test PLP2.

PERFORMANCES

1. Le test d'agglutination au latex PLP2 d'OXOID a été évalué dans 4 laboratoires situés dans des zones géographiques différentes avec des souches cliniques fraîches de *S. aureus*. 201 échantillons ont été testés avec les techniques d'antibiogramme NCCLS et avec le test OXOID PLP2 à partir de 3 types de milieux. Une réaction faible faussement positive avec le test latex OXOID PLP2 (résultat négatif) a été trouvée sur Tryptone soja au sang. Toutes les réactions positives ont été fortes excepté 3 faibles réactions (mais positives) sur milieu Mueller-Hinton.

La sensibilité du test latex OXOID PLP2 pour détecter les SARM sur chaque milieu est de 100%. La spécificité est de 99% sur Tryptone soja au sang et 100% sur les autres milieux.

Résultats des 201 souches cliniques fraîches de *S. aureus* des 4 laboratoires

	SARM	BORSA ^a	SASM
Nombre testé	68	3	130
Pousse sur milieu salé à l'oxacilline (NCCLS)	68	0	0
CMI $\geq 4\mu\text{g/ml}$ (NCCLS)	68	0	0
Latex positif sur milieu Tryptone soja au sang	68	0	1 (1) ^a
Latex positif sur Columbia au sang	68	0	0
Latex positif sur Mueller-Hinton	68 (3) ^a	0	0

^a Les CMI sont à 2µg/ml et le gène *mecA* est négatif

^a Nombre de réactions faibles entre parenthèses

2. Tests sur des souches de *S. aureus* de 3 zones géographiques distinctes

3 laboratoires ont examinés chacun un panel de souches de *S. aureus* collectées et caractérisées précédemment, et comparés les résultats du PLP2 avec la méthode du NCCLS pour la détermination de la résistance à la méticilline.

Un total de 724 souches ont été testées à partir de Tryptone soja au sang. La sensibilité du test OXOID PLP2 est de 98,5% et la spécificité de 100%. Les sensibilités des 2 méthodes de référence NCCLS sont de 98,7% et 99,2% et les spécificités de 90% et 88,7%.

2 souches de MODSA ont été testées séparément: Les 2 souches ont donné des résultats négatifs avec le latex OXOID PLP2.

3. Test sur les staphylocoques coagulase négative

2 laboratoires ont testé les staphylocoques coagulase négative avec le test OXOID PLP2 après induction avec un disque d'oxacilline. Un laboratoire a testé 115 souches résistant à la méticilline et 45 souches sensibles à la méticilline, en incluant 58 souches issues de patients.

La sensibilité est de 96,5% avec le milieu Tryptone soja au sang et 95,6% avec le milieu Mueller-Hinton. La spécificité est de 100% à partir du Tryptone soja au sang et 98% avec le Mueller-Hinton. Obtenir un bon inoculum est plus difficile avec une gélose Mueller-Hinton. Le second laboratoire a testé 212 souches résistant à la méticilline et 203 souches BORSA ont donné un résultat négatif à chaque fois (90/90 tests). La souche MODSA qui avait une CMI de 16µg/ml à l'oxacilline, a donné un résultat négatif avec le latex OXOID PLP2 comme attendu (15/15 tests).

4. Reproductibilité

10 souches différentes de *S. aureus* bien caractérisées (3 SARM, 3 SASM, 3 BORSA, et 1 MODSA) ont été envoyées à 3 laboratoires situés