

## (12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle  
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale

WO 2010/040952 A2

(43) Date de la publication internationale  
15 avril 2010 (15.04.2010)

PCT

(51) Classification internationale des brevets :  
C12Q 1/14 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2009/051909

(22) Date de dépôt international :  
7 octobre 2009 (07.10.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0856815 8 octobre 2008 (08.10.2008) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
BIOMÉRIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280  
Marcy l'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : ORENGA,  
Sylvain [FR/FR]; 164, route du Suran, F-01160 Neuville  
sur Ain (FR). ROBICHON, Denis [FR/FR]; 111, ancien  
chemin de l'Hôpital, F-01150 Blyes (FR).

(74) Mandataire : SPRUGNOLI, Claude; bioMérieux,  
Département Propriété Industrielle, Chemin de l'Orme,  
F-69280 Marcy l'Etoile (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,  
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,  
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,  
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,  
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,  
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,  
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,  
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,  
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,  
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

## Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))

(54) Title : REACTION MEDIUM FOR STAPHYLOCOCCUS AUREUS BACTERIA

(54) Titre : MILIEU REACTIONNEL POUR LES BACTERIES STAPHYLOCOCCUS AUREUS

(57) Abstract : The present invention relates to a reaction medium for detecting and/or identifying *Staphylococcus aureus* bacteria, comprising a combination of two enzyme substrates for alpha-glucosidase.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un milieu réactionnel pour la détection et/ou l'identification de bactéries *Staphylococcus aureus* comprenant une combinaison de deux substrats enzymatiques d'alpha glucosidase.

## Milieu réactionnel pour les bactéries *Staphylococcus aureus*

La présente invention concerne un milieu de culture pour la détection des bactéries *Staphylococcus aureus*. L'invention concerne également l'utilisation de ce milieu, ainsi qu'une 5 méthode pour identifier des bactéries *S. aureus*.

En 2008, le genre *Staphylococcus* regroupe quarante et une espèces et vingt-quatre sous-espèces, dont au moins dix-sept ont été retrouvées chez l'homme. La plupart de ces espèces sont des pathogènes opportunistes chez l'homme présentant un risque élevé en cas de 10 blessure cutanée par un traumatisme ou par implantation directe d'un produit médical. D'ailleurs, l'espèce *S. aureus* est une bactérie qui se retrouve souvent chez des patients qui doivent recevoir des soins hospitaliers faisant intervenir des appareils tels que seringues, cathéters. Il y a donc un grand intérêt de détecter la présence de cette bactérie pathogène, de plus en plus impliquée dans les maladies nosocomiales.

15 Parmi les staphylocoques, *S. aureus* est incontestablement l'espèce la plus virulente, puisqu'elle produit un nombre important de toxines et d'enzymes extracellulaires. Elle peut être à l'origine de pathologies nombreuses et variées, allant du simple panaris, jusqu'aux infections les plus sévères comme les septicémies, endocardites, pneumopathies, infections ostéoarticulaires, dont le pronostic peut être très réservé.

20 En outre, seules cinq espèces : *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus hominis* représentent au moins 1% des souches pathogènes isolées dans des centres cliniques et, à elles cinq, plus de 98% des souches de staphylocoques les plus fréquemment rencontrées. Les autres espèces sont rarement rencontrées et peu pathogènes.

25 En bactériologie, il est classique d'opposer l'espèce *S. aureus*, caractérisée par la production d'une coagulase, aux autres espèces dites à coagulase négative.

Les méthodes traditionnelles pour différencier *S. aureus* de *Staphylococcus* non *aureus* reposent sur la recherche de la coagulase libre, de la DNase et sur l'obtention d'une agglutination sur latex visant à mettre en évidence la présence du facteur d'affinité pour le 30 fibrinogène, de la protéine A et d'antigènes capsulaires.

Il faut savoir que d'autres espèces de staphylocoques, potentiellement pathogènes, sont capables d'exprimer une coagulase.

Les espèces à coagulase positive sont les suivantes : *S. aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus delphinis*, *Staphylococcus lutrae* et *Staphylococcus schleiferi*.

Il existe des techniques de culture sur milieux sélectifs pour permettre d'évaluer la 5 présence de *S. aureus*. Il s'agit des milieux suivants :

- Le milieu hypersalé de Chapman (à 7,5 % de NaCl) est généralement sélectif pour *S. aureus* et les staphylocoques qui hydrolysent le Mannitol. Ces bactéries font virer le milieu de rouge au jaune. Certains micro-organismes et les entérocoques du groupe D, en particulier, peuvent produire la même réaction sur le milieu ; il est donc nécessaire alors 10 de vérifier la catalase (négative pour les streptocoques).

- Le milieu de Baird-Parker à l'œuf (contenant du Tellurite de potassium et du Chlorure de Lithium comme agents sélectifs) est utilisé pour isoler et dénombrer les staphylocoques à coagulase positive dans les produits alimentaires et permet de mettre en évidence l'activité lécithinase. Sur ce milieu les colonies de *S. aureus*, et d'autres espèces à coagulase positive apparaissent avec un centre noir entouré d'un halo opaque. D'autres 15 micro-organismes peuvent se développer sur ce milieu. Il s'agit principalement des groupes suivants :

- Coccis Gram + : des genres *Enterococcus* et *Listeria*,
- Bacilles Gram - : des genres *Proteus* et *Pseudomonas*.

- Le milieu de Baird-Parker + RPF (plasma de lapin + fibrinogène bovin) est utilisé pour isoler et dénombrer les staphylocoques à coagulase positive dans les produits alimentaires, milieu de référence conformément à la norme ISO 6888-1 et 6888-2, et permet de mettre en évidence l'activité coagulase. Sur ce milieu les colonies de *S. aureus*, et d'autres espèces à coagulase positive apparaissent avec un centre noir 25 entouré d'un halo opaque.

En fait, la révélation des *S. aureus*, qui utilise la technique du milieu hyper salé de Chapman, manque de sensibilité (pouvoir de mettre en évidence l'espèce recherchée lorsque celle-ci est présente en faible quantité dans un échantillon biologique à tester) et surtout de spécificité (pouvoir de détecter l'espèce recherchée dans l'échantillon biologique à tester 30 contenant d'autres espèces).

De même, la révélation des *S. aureus*, qui utilise la technique du milieu Baird-Parker à l'œuf, manque de sensibilité et de spécificité. Ainsi, certaines souches n'appartenant pas à l'espèce *S. aureus*, en particulier *Staphylococcus schleiferi* et *Staphylococcus saprophyticus*,

peuvent également donner des colonies entourées d'une auréole d'éclaircissement. Il peut arriver aussi que certaines souches de *S. aureus* n'expriment pas l'activité enzymatique recherchée ou ne se développent pas sur le milieu, car ils peuvent être présents en trop faible quantité dans les échantillons biologiques et/ou inhibées par les composants trop sélectifs du 5 milieu.

Dans le cas du milieu Baird-Parker + RPF, on observe généralement un certain nombre d'inconvénients. En premier lieu, il existe des difficultés de lecture et de sensibilité : de faux négatifs peuvent potentiellement apparaître du fait que certaines souches de *S. aureus* ne se développent pas sur ce milieu ou présentent une coagulase très faible et tardive faisant croire à 10 la présence de staphylocoques à coagulase négative. D'autre part, des résultats faussement négatifs peuvent également observés en raison d'interférences matricielles : en effet pour le dénombrement de faibles niveaux de contamination de *S. aureus*, une dilution minimale de l'échantillon est effectuée (1/10) ce qui engendre une difficulté de lecture du halo due à la 15 présence de composés matriciels (e.g échantillons de lait et/ou produits laitiers : couleur blanche de la caséine masquant le halo révélant la coagulase). Le milieu Baird-Parker + RPF nécessite la combinaison d'une source de thrombine et d'une source de plasminogène. Ceux-ci sont obtenus à partir du sang d'animaux, ce qui pose des problèmes de fiabilité 20 d'approvisionnement (qualité, quantité, ...). De plus la lecture d'un halo n'est pas possible en bouillon (milieu liquide) et le contraste entre le halo et le milieu peut être réduit. Enfin en cas de colonies confluentes, il est difficile de déterminer celles qui produisent le halo de celles qui ne le produisent pas.

En second lieu, il peut également exister des problèmes de spécificité : en présence d'une flore annexe abondante (comme par exemple *Bacillus spp*), des résultats faussement positifs peuvent apparaître avec ce type de milieu. C'est par exemple le cas pour le 25 dénombrement de *S. aureus* dans certains produits carnés (saucissons secs) et laitiers (fromages type Munster) dans lesquels *Staphylococcus xylosus* est utilisé comme ferment. Ainsi, des colonies noires entourées d'un halo apparaissent sur le milieu Baird-Parker + RPF, colonies normalement caractéristiques de *S. aureus* sur ce milieu, mais qui sont en réalité 30 consécutives à une croissance contiguë de souches de *S. xylosus* (produisant des colonies noires sans halo) et de certaines souches de *Bacillus* possédant une coagulase (générant un halo) sur la gélose.

On comprend donc que cette révélation avec les milieux Baird-Parker, Baird-Parker + RPF et Chapman, ne donnent qu'un diagnostic présomptif et nécessitent d'autres tests de

confirmation. Or, les manipulations supplémentaires, nécessaires à l'identification de *S. aureus*, augmentent la durée et le coût des analyses. Elles nécessitent une multitude de réactifs et l'intervention d'un personnel qualifié.

5 Il est également possible d'utiliser des milieux à base de substrats enzymatiques.

Dans un article : « Evaluation of CHROMagar Staph. aureus, a new chromogenic medium, for isolation and presumptive identification of *S. aureus* from human clinical specimens. » de Gaillot O. *et al.* 2000. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4, 1587-1591, on décrit et évalue un milieu de culture chromogène CHROMagar (marque déposée) Staph. aureus permettant 10 l'isolement des staphylocoques et l'identification de *S. aureus* à l'aide de substrats chromogènes qui procurent une coloration mauve de cette dernière espèce. Les autres espèces du même genre sont alors détectées par la coloration bleue ou incolore, en théorie. On utilise essentiellement les activités  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -galactosidase et phosphatase, ainsi qu'un inhibiteur, la Déféroxamine, qui permet la différenciation de *S. aureus* et 15 *S. epidermidis*. Toutefois, la différenciation *S. aureus* des *S. epidermidis* est difficile, les deux espèces produisant des colonies de la même couleur sur le milieu CHROMagar (marque déposée). Ceci est dû au manque de spécificité des substrats de phosphatase qui sont positifs pour les *S. aureus* et les *S. epidermidis* et au fait que l'inhibition de ces derniers par la Déféroxamine n'est que partielle.

20 On peut citer également la demande WO02079486 qui décrit l'utilisation d'un substrat d' $\alpha$ -glucoside pour l'identification des différentes espèces de staphylocoques, qui peut être en combinaison avec un substrat d'une autre activité enzymatique. Toutefois, dans certaines conditions comme par exemple avec des souches à activité  $\alpha$ -glucosidase réduite et en faible quantité (2 à 50 unités formant colonies), la détection de l'activité peut être tardive et 25 nécessiter plus de 24 heures d'incubation.

L'invention se propose de résoudre les lacunes de l'état de la technique en présentant un nouveau milieu de culture sensible, spécifique, et rapide pour isoler et identifier des *S. aureus*.

30 Avant d'aller plus avant, les définitions suivantes, nullement limitatives, permettront de mieux comprendre l'invention.

Au sens de la présente invention, on entend par milieu réactionnel, un milieu comprenant tous les éléments nécessaires à la survie et/ou à la croissance de microorganismes, telles que les *S. aureus*.

Ce milieu réactionnel peut soit servir uniquement de milieu de révélation, soit de milieu de culture et de révélation. Dans le premier cas, la culture des microorganismes est effectuée avant ensemencement et, dans le deuxième cas, le milieu réactionnel constitue également le milieu de culture.

Le milieu réactionnel peut être solide, semi-solide ou liquide. Par milieu solide, on entend par exemple un milieu gélifié. Préférentiellement, le milieu selon l'invention est un milieu gélifié. 10 L'agar est l'agent gélifiant traditionnel en microbiologie pour la culture des microorganismes, mais il est possible d'utiliser de la gélatine ou de l'agarose. Un certain nombre de préparations sont disponibles dans le commerce, comme par exemple l'agar Columbia, la gélose Trypcase-soja, la gélose Mac Conkey, la gélose Sabouraud ou plus généralement celles décrites dans le Handbook of Microbiological Media (CRC Press). 15 Le milieu réactionnel selon l'invention peut contenir d'éventuels autres additifs comme par exemple : des peptones, un ou plusieurs facteurs de croissance, des hydrates de carbone, un ou plusieurs agents sélectifs, des solutions tampons, un ou plusieurs gélifiants... Ce milieu réactionnel peut se présenter sous forme de liquide, de gel prêt à l'emploi, c'est à dire prêt à l'ensemencement en tube, flacon, ou sur boite de Petri. Lorsque la présentation est sous forme 20 de gel en flacon, on réalise préférentiellement une régénération (passage à 100°C) préalable du milieu avant de couler en boîte de Pétri.

Préférentiellement, le milieu selon l'invention est un milieu sélectif, c'est à dire un milieu comprenant des inhibiteurs qui privilégient la croissance des bactéries *Staphylococcus aureus*. On peut citer notamment le Chlorure de Lithium (LiCl), Azide de sodium (NaN3), Colistine, 25 Amphotéricine, Aztréonam, Colimicine, Chlorure de Sodium (NaCl), Déféroxamine, composé vibriostatique O/129.

Ce milieu peut également être adapté à la détection des *S. aureus* résistants à la méticilline (MRSA), et comprendre un ou plusieurs antibiotiques, contre le(s)quel(s) les MRSA sont résistantes, tels que une céphalosporine ou une carbapénème, préférentiellement choisi parmi : 30

- une céphalosporine de première génération, telle que : Cefalexine, Cefaloridine, Cefalotine, Cefazoline, Cefadroxil, Cefazedone, Cefatrizine, Cefapirine, Cefradine, Cefacetrile, Cefrodaxine, Ceftezole

- une Céphalosporine de deuxième génération, telle que : Cefoxitine, Cefuroxime, Cefamandole, Cefaclor, Cefotetan, Cefonicide, Cefotiam, Loracarbef, Cefmetazole, Cefprozil, Ceforanide
- une céphalosporine de troisième génération, telle que : Cefotaxime, Ceftazidime, 5 Cefsulodine, Ceftriaxone, Cefmenoxime, Latamoxef, Ceftizoxime, Cefixime, Cefodizime, Cefetamet, Cefpiramide, Cefoperazone, Cefpodoxime, Ceftibuten, Cefdinir, Cefditoren, Ceftriaxone, Cefoperazone
- une céphalosporine de quatrième génération, telle que Cefepime, Cefpirome
- Meropeneme, Ertapeneme, Imipeneme.

10

Au sens de la présente invention, le substrat d'une activité enzymatique (ou substrat enzymatique) est choisi parmi tout substrat pouvant être hydrolysé en un produit qui permet la détection, directe ou indirecte d'une activité enzymatique alpha glucosidase.

Il peut s'agir d'un substrat naturel ou synthétique. Le métabolisme du substrat provoque une 15 variation des propriétés physico-chimiques du milieu réactionnel ou des cellules d'organismes. Cette variation peut être détectée par des méthodes physico-chimiques, notamment des méthodes optiques par l'œil de l'opérateur ou à l'aide d'instruments, spectrométriques, électriques, magnétiques, ... Préférentiellement, il s'agit d'une variation des propriétés optiques, telles qu'une modification d'absorption, de fluorescence ou de luminescence.

20 Comme substrat chromogène, on peut citer notamment les substrats à base d'indoxyl, flavone, alizarine, naphtolbenzeine, nitrophénol, naphtol, catéchol, hydroxyquinoline, coumarine.

Préférentiellement, le(s) substrat utilisé(s) dans la présente invention est à base d'indoxyl. Comme substrat fluorescent, on peut citer notamment les substrats à base d'umbelliférone ou 25 de coumarine, à base de résorufine, phénoxazine, naphtol, naphtylamine, 2'-hydroxyphényl-hétérocycle ou encore à base de fluorescéïne.

Comme substrat d'activité enzymatique alpha glucosidase, on peut citer plus particulièrement les substrats 5-Bromo-6-chloro-3-indoxyl-alpha-glucoside; Dihydroxyflavone-alpha-glucoside; 3,4-Cyclohexénoesculétine-alpha-glucoside; 8-Hydroxyquinoline-alpha-glucoside; 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-glucoside; 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-méthyl-alpha-glucoside; 6-Chloro-3-indoxyl-alpha-glucoside; 5-Bromo-3-indoxyl-alpha-glucoside; 5-Iodo-3-indoxyl-alpha-glucoside; 6-Fluoro-3-indoxyl-alpha-glucoside; Alizarine-alpha-glucoside; Nitrophényl-alpha-glucoside; 4-Méthylumbelliferyl-alpha-glucoside; Naphtholbenzein-alpha-glucoside;

Indoxyl-N-méthyl-alpha-glucoside; Naphtyl-alpha-glucoside; Aminophényl-alpha-glucoside; Dichloroaminophényl-alpha-glucoside, Résorufine-alpha-glucoside.

Préférentiellement, le substrat utilisé dans la présente invention est le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-glucoside en combinaison avec le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-méthyl-alpha-glucoside.

Les substrats de l'invention sont utilisables dans une large gamme de pH, notamment entre pH 5,5 et 10 préférentiellement entre pH 6,5 et 10.

La concentration en substrat est préférentiellement comprise entre 0,01 et 2 g/l, encore plus préférentiellement entre 0,02 et 0,2 g/l, et, avantageusement, elle est de 0,1 g/l. En effet, à cette concentration de substrat, on obtient un meilleur contraste de coloration.

Par échantillon biologique, on entend un échantillon clinique, issu d'un prélèvement d'aspiration bronchique, trachéale ou pulmonaire, de liquide pleural, d'un lavage broncho-alvéolaire, d'expectorations, du sang ou d'une biopsie pulmonaire, de liquide articulaire ou péricardique ; liquide biologique ou un échantillon alimentaire, issu de tout type d'aliment. Cet échantillon peut être ainsi liquide ou solide et on peut citer d'une manière non limitative, un échantillon clinique de sang, de plasma, d'urines, de féces, de prélèvements de nez, de périnée, de gorges, de peaux, de plaies, de liquide céphalo-rachidien, un échantillon alimentaire.

A ce titre, l'invention concerne un milieu réactionnel pour la détection et/ou l'identification de bactéries *S. aureus* comprenant une combinaison de deux substrats enzymatiques d'alpha glucosidase.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'un des deux substrats est un substrat indoxyl-alpha-glucoside, préférentiellement le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-methyl-alpha-glucoside (X-N-méthyl-alpha-glucoside) ou le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-glucoside (X-alpha-glucoside).

Préférentiellement, ledit substrat indoxyl-alpha-glucoside est présent dans le milieu à une concentration comprise entre 0,01 et 2 g/l, préférentiellement entre 0,05 et 0,3 g/l.

Préférentiellement, ladite combinaison de deux substrats enzymatiques d'alpha glucosidase comprend le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-methyl-alpha-glucoside et le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-glucoside.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, ledit milieu comprend, en outre, un mélange d'inhibiteurs qui privilégie la croissance des bactéries *Staphylococcus aureus*, préférentiellement le chlorure de lithium (LiCl), l'azide de sodium (NaN3), la colistine, le

composé vibriostatique O/129, l’Aztréonam, l’Amphotéricine, la colimicine, le chlorure de sodium (NaCl), Déféroxamine.

Selon un mode préféré de réalisation de l’invention, le milieu comprend, en outre, un mélange d’inhibiteurs, comprenant quatre inhibiteurs, qui privilégie la croissance des bactéries du genre

5 *Staphylococcus*, qui sont LiCl, composé vibriostatique O/129, Aztréonam, et. Amphotéricine.

L’invention concerne également l’utilisation *in vitro* d’un milieu réactionnel tel que défini ci avant pour isoler et identifier des bactéries *S. aureus*.

L’invention concerne enfin un procédé de détection et/ou d’identification de bactéries 10 *S. aureus* dans un échantillon biologique selon lequel

- a) on ensemence l’échantillon biologique susceptible de contenir des bactéries *S. aureus* sur un milieu réactionnel tel que défini ci avant
- b) on incube
- c) on identifie les colonies de *S. aureus*.
- d) on identifie les colonies de MRSA.

L’incubation est préférentiellement réalisée à une température comprise entre 30°C et 42°C.

Les *S. aureus* sont détectées par une activité  $\alpha$ -glucosidase spécifique qui permet d’obtenir des colonies colorées ou fluorescentes. Les autres espèces de *Staphylococcus* apparaissent incolores ou d’une couleur ou fluorescence différente de celle des colonies de *S. aureus*.

20

L’invention concerne également un milieu réactionnel pour la détection et/ou l’identification de bactéries MRSA comprenant une combinaison de deux substrats enzymatiques d’alpha glucosidase et un antibiotique, contre lequel les MRSA sont résistants, préférentiellement une céphalosporine, telle que la Cefoxitine. Cet antibiotique peut être en combinaison avec un 25 autre antibiotique. Une telle combinaison est préférentiellement choisie parmi Cefoxitine / Cefotaxime ou Cefoxitine / Ertapenem. Un tel milieu est particulièrement adapté pour la détection des MRSA.

Selon un mode préféré de réalisation de l’invention, l’un des deux substrats est un substrat indoxyl-alpha-glucoside, préférentiellement le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-methyl-alpha-glucoside (X-N-méthyl-alpha-glucoside) ou le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- alpha-glucoside (X-alpha-glucoside).

Préférentiellement, ledit substrat indoxyl-alpha-glucoside est présent dans le milieu à une concentration comprise entre 0,01 et 2 g/l, préférentiellement entre 0,05 et 0,3 g/l.

Préférentiellement, ladite combinaison de deux substrats enzymatiques d'alpha glucosidase comprend le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-methyl-alpha-glucoside et le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- alpha-glucoside.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, ledit milieu comprend, en outre, un mélange d'inhibiteurs qui privilégie la croissance des bactéries *Staphylococcus aureus*, préférentiellement le chlorure de lithium (LiCl), l'azide de sodium (NaN3), la colistine, le composé vibriostatique O/129, l'Aztréonam, l'Amphotéricine, la colimicine, le chlorure de sodium (NaCl), Déféroxamine.

L'invention concerne également l'utilisation *in vitro* d'un milieu réactionnel tel que défini ci avant pour isoler et identifier des bactéries MRSA.

L'invention concerne enfin un procédé de détection et/ou d'identification de bactéries MRSA dans un échantillon biologique selon lequel

- a) on ensemence l'échantillon biologique susceptible de contenir des bactéries MRSA sur un milieu réactionnel tel que défini ci avant
- 15 b) on incube
- c) on identifie les colonies de MRSA.

L'incubation est préférentiellement réalisée à une température comprise entre 30°C et 42°C.

Les MRSA sont détectées par une activité  $\alpha$ -glucosidase spécifique qui permet d'obtenir des colonies colorées ou fluorescentes. Les autres espèces apparaissent incolores ou d'une couleur 20 ou fluorescence différente de celle des colonies de MRSA.

Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif et n'ont aucun caractère limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

## 25 1. Préparation du milieu selon l'invention

Les milieux testés dans les expériences ci après étaient des milieux comprenant comme milieu de base le milieu chromID MRSA (bioMérieux réf. 43 451), et comprenant les éléments suivants

**Milieu T** : milieu témoin chromID MRSA (réf. 43 451), comprenant notamment un substrat X-N-méthyl-glucoside à une concentration de 0,1 g/l et de la Cefoxitine à 4 mg/l.

**Milieu S** : milieu T, comprenant en outre, un substrat X-alpha-Glucoside, à une concentration de 25, 37, 45 ou 50 mg/l.

**Milieu F** : milieu S (concentration X-alpha-glucoside : 45 mg/l), la Cefoxitine étant substituée par une combinaison Cefoxitine/Cefotaxime aux concentrations ci-dessous

[Cefoxitine] en mg/l	0,5	0,5	1	1
[Cefotaxime] en mg/l	0,5	1	0,5	1

**Milieu G** : milieu S (concentration X-alpha-glucoside : 45 mg/l), la Cefoxitine étant substituée par une combinaison Cefoxitine/ Ceftriaxone aux concentrations ci-dessous

[Cefoxitine] en mg/l	0,5	0,5	1	1
[Ceftriaxone] en mg/l	0,5	1	0,5	1

**Milieu H** : milieu S (concentration X-alpha-glucoside : 45 mg/l), la Cefoxitine étant substituée par une combinaison Cefoxitine/ Ertapenem aux concentrations ci-dessous

[Cefoxitine] en mg/l	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75
[Ertapenem] en mg/l	0,25	0,5	0,75	1	0,25	0,5	0,75	1

**Milieu I** : milieu S (concentration X-alpha-glucoside : 45 mg/l), la Cefoxitine étant substituée par une combinaison Cefoxitine/ Cefpodoxime aux concentrations ci-dessous

[Cefoxitine] en mg/l	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75
[Cefpodoxime] en mg/l	0,5	1	1,5	2	0,5	1	1,5	2

**Milieu J** : milieu S (concentration X-alpha-glucoside : 45 mg/l), la Cefoxitine étant substituée par une combinaison Cefoxitine/ Cefoperazone aux concentrations ci-dessous

[Cefoxitine] en mg/l	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75
[Cefoperazone] en mg/l	0,5	0,75	1	1,5	0,5	0,75	1	1,5

**Milieu K** : milieu S (concentration X-alpha-glucoside : 45 mg/l), la Cefoxitine étant substituée par une combinaison Cefoxitine/Cefotaxime, aux concentrations ci-dessous, comprenant en outre un mélange d'inhibiteurs des microorganismes n'appartenant pas au genre *Staphylococcus*, privilégiant la croissance des *S. aureus*.

[Cefoxitine] en mg/l	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
[Cefotaxime] en mg/l	0,5	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75

## 2. Ensemencement et lecture des milieux

Différentes souches de bactéries, toutes issues de la collection de la Demanderesse, mises en suspension dans de l'eau physiologique, ont été ensemencées pour donner des colonies isolées sur le milieu. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 48 heures. Les colonies formées ont

5 été examinées visuellement après 18h ou 24 heures d'incubation. L'intensité de coloration était également observée selon une échelle de 0 à 4 (0 : absence de coloration, 4 : coloration très intense).

Les souches détectées correspondent aux souches formant des colonies colorées sur le milieu.

10 3. Résultats :

### 3.1 Milieu pour détecter des MRSA comprenant 2 substrats d'alpha-glucosidase

Les résultats obtenus lors de l'utilisation de un ou deux substrats d'alpha-glucosidase sont présentés dans le tableau 1.

15 *Tableau 1 – Intensité de coloration des colonies lors de l'utilisation de 2 substrats d'alpha glucosidase*

		Milieu T	Milieu S [X α Glu] = 25 mg/l	Milieu [X α Glu] = 37 mg/l	Milieu [X α Glu] = 50 mg/l
Souches	Incubatio n	Intensité de coloration verte	Intensité de coloration verte	Intensité de coloration verte	Intensité de coloration verte
MRSA	18h	2	2	2,5	3
	24h	2	2	3	3
	> 40h	2	2,5	3	3
MRSA	18h	0	0	0	0
	24h	2	2	2,5	3
	> 40h	3	3	4	4
MRSA	18h	1,5	1,5	2	3
	24h	2	2	4	4
	> 40h	2	3	4	4
MRSA	18h	2	2	3	3
	24h	2	2	4	4
	> 40h	2,5	2,5	4	4
MRSA	18h	0,5	0,5	0	0
	24h	1	0,5	1,5	2,5
	> 40h	2,5	3	4	4
MRSA	18h	2	2	2,5	3
	24h	2,5	2,5	2,5	2,5
	> 40h	2,5	3	4	4
MRSA	18h	0	0	0	0
	24h	1	1	3	4
	> 40h	2	3	4	4
MRSA	18h	0	0	0	0
	24h	0	0	0	0
	> 40h	3	3	4	4
MRSA	18h	1,5	1,5	3	2,5
	24h	2	2	4	4
	> 40h	2,5	3	4	4
MRSA	18h	0	0	0	0

	24h	0	0	2	3
	> 40h	2,5	3	4	4

L'ajout d'un deuxième substrat d'alpha-glucosidase permet d'intensifier fortement la coloration des colonies, permettant ainsi de mieux repérer les colonies de MRSA.

5 3.2 - Milieu pour détecter des MRSA comprenant deux substrats alpha-glucosidase et une combinaison d'antibiotiques choisi parmi les couples Cefoxitine/Ceftriaxone, Cefoxitine/Cefotaxime, Cefoxitine/Ertapenem, Cefoxitine/Cefoperazone ou Cefoxitine/Cefpodoxime

Les résultats obtenus lors de l'utilisation de combinaisons d'antibiotiques sont présentés dans le tableau 2.

**Tableau 2 – Détection de colonies MRSA lors de l'utilisation d'une combinaison d'antibiotiques (détection exprimée en nombre de souches détectées par nombre de souches totales)**

Milieu	T	F				T	G				T	H										
Antibiotique 1	Cefoxitine	Cefoxitine				Cefoxitine	Cefoxitine				Cefoxitine	Cefoxitine										
Concentration Antibiotique 1 (mg/l)	4	0,5	1	0,5	1	4	0,5	1	0,5	1	4	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Antibiotique 2	Aucun	Cefotaxime				Au-cun	Ceftriaxone				Au-cun	Ertapenem										
Concentration Antibiotique 2 (mg/l)	0	0,5	0,5	1	1	0	0,5	0,5	1	1	0	1	0,25	0,5	0,75	1	0,25	0,5	0,75	1	0,25	1
MRSA	Lecture 18h	6/10	9/10	8/10	6/10	5/10	6/10	9/10	8/10	9/10	8/10	6/10	7/10	8/10	7/10	7/10	6/10	7/10	7/10	7/10	7/10	2/10
MRSA	Lecture 24h	8/10	10/10	8/10	6/10	6/10	8/10	10/10	10/10	10/10	8/10	6/10	8/10	8/10	8/10	8/10	7/10	7/10	8/10	8/10	8/10	4/10
MSSA	Lecture 18h		4/10	1/10	1/10			6/10	4/10	4/10	3/10			3/10	9/10	6/10	2/10		7/10	3/10	10/10	
MSSA	Lecture 24h		5/10	2/10	1/10			6/10	5/10	4/10	4/10			5/10	9/10	8/10	5/10		10/10	6/10	10/10	

Milieu	T	I										T	J									
Antibiotique 1	Cefoxitine	Cefoxitine											Cefoxitine									
Concentration Antibiotique 1 (mg/l)	4	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	4	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Antibiotique 2	Au-cun	Cefpodoxime										Au-cun	Cefoperazone									
Concentration Antibiotique 2 (mg/l)	0	2	0,5	1	1,5	2	0,5	1	1,5	2	0	1,5	0,5	0,75	1	1,5	0,5	0,75	1	1,5		
MRSA	Lecture 18h	5/10	5/10	8/10	5/10	5/10	1/10	6/10	5/10	4/10	1/10	5/10	5/10	6/10	5/10	5/10	2/10	5/10	5/10	5/10	5/10	1/10
MRSA	Lecture 24h	5/10	5/10	8/10	5/10	5/10	5/10	7/10	5/10	5/10	3/10	5/10	7/10	9/10	5/10	5/10	4/10	6/10	6/10	6/10	5/10	2/10
MSSA	Lecture 18h		4/10	6/10			2/10						6/10	4/10	3/10	2/10		4/10	3/10	1/10		
MSSA	Lecture 24h		4/10	7/10	1/10		5/10						7/10	5/10	4/10	3/10	1/10	4/10	4/10	2/10	1/10	

Des combinaisons d'antibiotiques ci-dessus permettent d'obtenir des performances supérieures à celles d'un milieu avec Céfoxitine seule à 4 mg/l.

**3.3 - Milieu pour détecter des MRSA comprenant une combinaison d'antibiotiques Céfoxitine/Cefotaxime et un mélange d'inhibiteurs privilégiant la croissance des *S. aureus*.**

Les résultats obtenus lors de l'utilisation de combinaisons d'antibiotiques sont présentés dans le tableau 3.

*Tableau 3 – Détection de colonies MRSA lors de l'utilisation d'une combinaison d'antibiotiques Céfoxitine/Cefotaxime et un mélange d'inhibiteurs (détection exprimée en nombre de souches détectées par nombre de souches totales)*

Milieu	T	K					
		Céfoxitine					
Antibiotique 1	Céfoxitine	Cefotaxime					
		4	0,5	0,55	0,6	0,65	0,7
Concentration Antibiotique 1 (mg/l)	Aucun	Cefotaxime					
		0	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Antibiotique 2	Aucun	Cefotaxime					
		0	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Concentration Antibiotique 2 (mg/l)		5/10	5/10	5/10	5/10	5/10	5/10
		9/10	8/10	9/10	8/10	8/10	9/10
MRSA	Lecture 18h	—	—	—	—	—	—
	Lecture 24h	—	—	—	—	—	—
MSSA	Lecture 18h	—	—	—	—	—	—
	Lecture 24h	—	3/10	2/10	1/10	—	—

La combinaison d'antibiotiques Céfoxitine/Cefotaxime associée à un mélange d'inhibiteurs privilégiant la croissance des *S. aureus* permettait d'obtenir une excellente spécificité et sensibilité, en particulier lors de l'utilisation d'une concentration en Céfoxitine et en Cefotaxime de 0,75 mg/l.

## REVENDICATIONS

- 1) Milieu réactionnel pour la détection et/ou l'identification de bactéries *Staphylococcus aureus* comprenant une combinaison de deux substrats enzymatiques d'alpha glucosidase.
- 2) Milieu réactionnel selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'un des deux substrats est un substrat indoxyl alpha glucoside, préférentiellement le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-methyl-alpha-glucoside ou le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-glucoside.
- 3) Milieu réactionnel selon la revendication 2 caractérisé en ce que ledit substrat indoxyl alpha glucoside est présent dans le milieu à une concentration comprise entre 0,01 et 2 g/l, préférentiellement entre 0,05 et 0,3 g/l.
- 4) Milieu réactionnel selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que ladite une combinaison de deux substrats enzymatiques d'alpha glucosidase comprend le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-methyl-alpha-glucoside et le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- alpha-glucoside.
- 5) Milieu réactionnel selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisée en ce qu'il comprend, en outre, un mélange d'inhibiteurs qui privilégie la croissance des bactéries *Staphylococcus aureus*.
- 6) Utilisation *in vitro* d'un milieu réactionnel tel que dans l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour isoler et identifier des bactéries *S. aureus*.
- 7) Procédé de détection et/ou d'identification de bactéries *S. aureus* dans un échantillon biologique selon lequel
  - a) on ensemence l'échantillon biologique susceptible de contenir des bactéries *S. aureus* sur un milieu réactionnel tel que défini ci avant
  - b) on incube
  - c) on identifie les colonies de *S. aureus*.

- 8) Milieu réactionnel pour la détection et/ou l'identification de bactéries MRSA comprenant une combinaison de deux substrats enzymatiques d'alpha glucosidase et un antibiotique, contre lequel les MRSA sont résistants, préférentiellement une céphalosporine, telle que la Cefoxitine.
- 9) Milieu réactionnel selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il comprend un deuxième antibiotique, contre lequel les MRSA sont résistants.
- 10) Milieu réactionnel selon la revendication 8 ou 9 caractérisé en ce qu'un des deux substrats est un substrat indoxyl alpha glucoside, préférentiellement le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-methyl-alpha-glucoside ou le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- alpha-glucoside.
- 11) Milieu réactionnel selon la revendication 10 caractérisé en ce que ledit substrat indoxyl alpha glucoside est présent dans le milieu à une concentration comprise entre 0,01 et 2 g/l, préférentiellement entre 0,02 et 0,3 g/l.
- 12) Milieu réactionnel selon l'une quelconque des revendications 8 à 11 caractérisé en ce que ladite une combinaison de deux substrats enzymatiques d'alpha glucosidase comprend le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-methyl-alpha-glucoside et le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- alpha-glucoside.
- 13) Milieu réactionnel selon l'une quelconque des revendications 8 à 12 caractérisé en ce qu'il comprend, en outre, un mélange d'inhibiteurs qui privilégie la croissance des bactéries *Staphylococcus aureus*, préférentiellement le LiCl, composé vibriostatique O/129, Aztréonam, et. Amphotéricine.
- 14) Utilisation *in vitro* d'un milieu réactionnel selon l'une quelconque des revendications 8 à 13 pour isoler et identifier des bactéries MRSA.
- 15) Procédé de détection et/ou d'identification de bactéries MRSA dans un échantillon biologique selon lequel
  - a) on ensemence l'échantillon biologique susceptible de contenir des

bactéries MRSA sur un milieu réactionnel tel que défini dans les revendications 8 à 13

- b) on incube
- c) on identifie les colonies de MRSA.