



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2003/09/23

(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2004/04/01

(45) Date de délivrance/Issue Date: 2010/05/18

(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2005/03/16

(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2003/002788

(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2004/027086

(30) Priorité/Priority: 2002/09/23 (FR02/11718)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12Q 1/14* (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:  
RAMBACH, ALAIN, FR;  
LE COUSTUMIER, ALAIN, FR

(73) Propriétaire/Owner:  
RAMBACH, ALAIN, FR

(74) Agent: OGILVY RENAULT LLP/S.E.N.C.R.L.,S.R.L.

(54) Titre : PROCÉDE DE DETECTION DE MICROORGANISMES RESISTANTS A LA METICILLINE

(54) Title: METHOD OF DETECTING METICILLIN-RESISTANT MICRO-ORGANISMS

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention se rapporte à un nouveau milieu solide de détection de microorganismes résistants à la méticilline, dans lequel sont présents un antibiotique choisi dans le groupe des céphalosporines notamment de seconde ou troisième génération, et un agent chromogène portant un chromophore libéré après hydrolyse avec une enzyme active chez lesdits microorganismes.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
1 avril 2004 (01.04.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/027086 A1(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12Q 1/14(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/002788(22) Date de dépôt international :  
23 septembre 2003 (23.09.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/11718 23 septembre 2002 (23.09.2002) FR

(71) Déposant et

(72) Inventeur : RAMBACH, Alain [FR/FR]; 73, boulevard  
Montparnasse, F-75006 Paris (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : LE COUS-  
TUMIER, Alain [FR/FR]; 750, chemin des Junies,  
F-46000 Cahors (FR).(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet  
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17  
(FR).(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,  
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

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

## Publiée :

— avec rapport de recherche internationale  
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çuesEn ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD OF DETECTING METICILLIN-RESISTANT MICRO-ORGANISMS

(54) Titre : PROCEDE DE DETECTION DE MICROORGANISMES RESISTANTS A LA METICILLINE

(57) Abstract: The invention relates to a novel solid medium for detecting meticillin-resistant micro-organisms, containing an anti-  
biotic selected from the cephalosporin group, particularly second and third generation, and a chromogenic agent bearing a chromophore  
which is released after hydrolysis with an active enzyme in said micro-organisms.(57) Abrégé : L'invention se rapporte à un nouveau milieu solide de détection de microorganismes résistants à la méticilline, dans  
lequel sont présents un antibiotique choisi dans le groupe des céphalosporines notamment de seconde ou troisième génération, et un  
agent chromogène portant un chromophore libéré après hydrolyse avec une enzyme active chez lesdits microorganismes.

WO 2004/027086 A1

## PROCEDE DE DETECTION DE MICROORGANISMES RESISTANTS A LA METICILLINE

L'invention se rapporte à un nouveau milieu gélifié de détection de  
5 microorganismes résistants à la méticilline, dans lequel sont présents un  
antibiotique choisi dans le groupe des céphalosporines notamment de seconde ou  
troisième génération, et un agent chromogène portant un chromophore libéré après  
hydrolyse avec une enzyme active chez lesdits microorganismes.

La détection systématique des *Staphylococcus aureus* résistants à la  
10 méticilline (aussi écrite méthicilline) (MRSA) est importante.

En effet, bien que les MRSA ne semblent pas plus virulents que les MSSA,  
(Staphylocoques dorés sensibles à la méticilline), leurs infections sont plus difficiles  
et onéreuses à traiter. Ceci est dû à ce que la méti-résistance confère la résistance à  
15 résistances à de nombreux autres antibiotiques antistaphylococciques majeurs (Lyon  
et Skurry, Microbiol. Rev. 51 ; 88 – 134)

Pour cette détection on a parfois utilisé des milieux de croissance gélosés  
supplémentés à la méticilline. Cette méthode est maintenant souvent abandonnée  
car elle détecte mal certaines souches MRSA, en particulier des souches  
20 hétérogènes dans lesquelles des populations bactériennes contiennent une  
proportion très faible de bactéries franchement résistantes à la méticilline (dans  
lesquelles 1 bactérie sur  $10^4$  ou  $10^8$  exprime la résistance). Cette méthode donne un  
nombre important de résultats faux négatifs.

L'utilisation de milieux de croissance gélosés supplémentés à l'oxacilline est  
25 fréquente mais, comme avec la méticilline, certaines souches sont difficiles à  
détecter.

De plus, pour que ces antibiotiques (méticilline, oxacilline) fonctionnent à  
peu près efficacement comme suppléments sélectifs, on est contraint de n'employer  
que certains milieux de croissance. En conséquence les milieux proposés à  
30 l'utilisateur sont par exemple des dérivés du Muller Hinton Agar ou du Mannitol  
Salt Agar. Malheureusement pour l'utilisateur ces milieux sont souvent peu  
discriminants pour l'espèce *S. aureus* ce qui diminue encore la sensibilité et la  
spécificité.

On a proposé des milieux de croissance gélosés supplémentés à la tobramycine ou l'ofloxacine, soit dans des bases peu discriminantes (dérivées du Mannitol salt Agar par exemple), soit dans la base très discriminante du CHROMagar Staph aureus, mais la corrélation avec la résistance à la méticilline est  
5 médiocre d'où un excès de faux positifs et de faux négatifs.

On utilise aussi la méthode de diffusion sur gélose, par exemple la gélose Mueller Hinton, qui consiste à déposer des disques de papier imprégnés d'antibiotiques sur une géloseensemencée avec la bactérie à étudier. Il s'établit dans la gélose un gradient de concentration d'antibiotique autour de chaque disque. Après  
10 incubation, il se produit un halo d'inhibition autour de chaque disque qui permet de mesurer un diamètre, qui reflète la valeur de la CMI (concentration minimale d'inhibition, concentration minimale pour laquelle aucune croissance des microorganismes n'est détectée).

La présente invention se rapporte à un milieu de culture gélosé permettant  
15 de détecter les microorganismes résistants à la méticilline, et en particulier les staphylocoques, notamment les staphylocoques dorés, avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité.

Ainsi, dans le cadre de la présente invention, on utilise les capacités discriminantes des milieux chromogènes, en combinaison avec les propriétés des  
20 antibiotiques de la famille des céphalosporines de 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> génération, qui permettent de détecter les microorganismes résistants à la méticilline.

L'invention se rapporte donc à un milieu pour la détection de microorganismes résistants à la méticilline, comprenant, outre des nutriments permettant la croissance desdits microorganismes, au moins un antibiotique choisi  
25 dans le groupe des céphalosporines de seconde ou troisième génération, et un agent chromogène libérant un chromophore après hydrolyse avec une enzyme active chez lesdits microorganismes.

Les milieux de culture selon l'invention permettent une détection directe des microorganismes résistants à la méticilline, en raison de leur croissance sur le  
30 milieu selon l'invention et de la présence de(s) l'agent(s) chromogène(s), permettant de définir la nature du microorganisme. On n'a donc pas besoin d'étape supplémentaire de confirmation de la nature des microorganismes poussant sur le milieu selon l'invention.

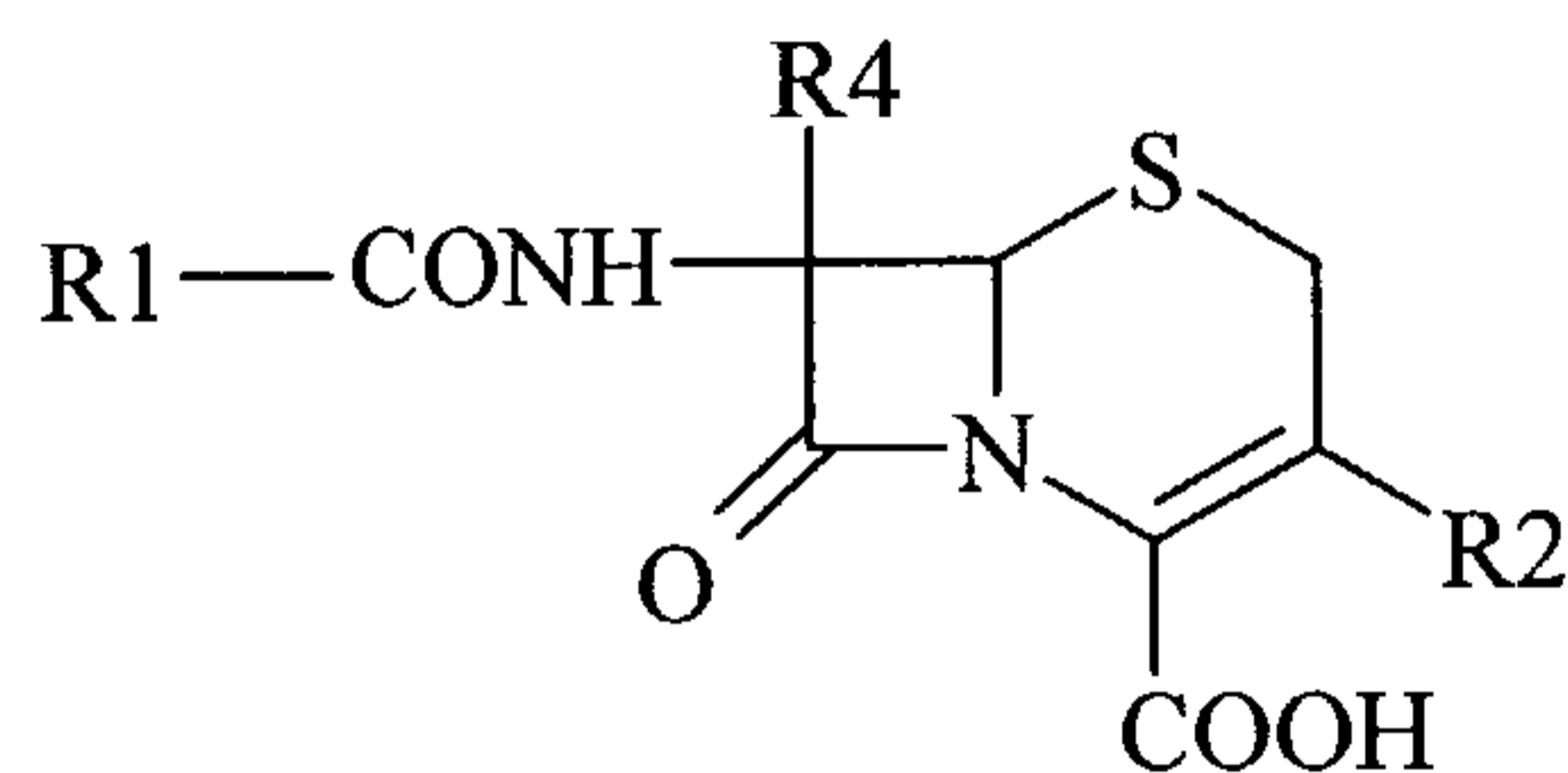
2a

L'invention concerne un milieu de culture gélosé pour la détection des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline, comprenant, outre des nutriments permettant la croissance des *Staphylococcus aureus*, à titre d'antibiotique, une céphalosporine choisie dans le groupe constitué de la cefoxitine, le cefmetazol, le  
5 moxalactam et le flomoxef et au moins un agent chromogène libérant un chromophore après hydrolyse avec une enzyme active chez les *Staphylococcus aureus*.

L'invention concerne également un procédé de détection des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline dans un échantillon, comprenant les étapes consistant à inoculer un milieu tel que décrit avec l'échantillon ou un inoculum issu de l'échantillon,  
10 incuber le milieu dans des conditions permettant la croissance des *Staphylococcus aureus* et détecter, sur le milieu, la présence des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline, par la présence de colonies colorées.

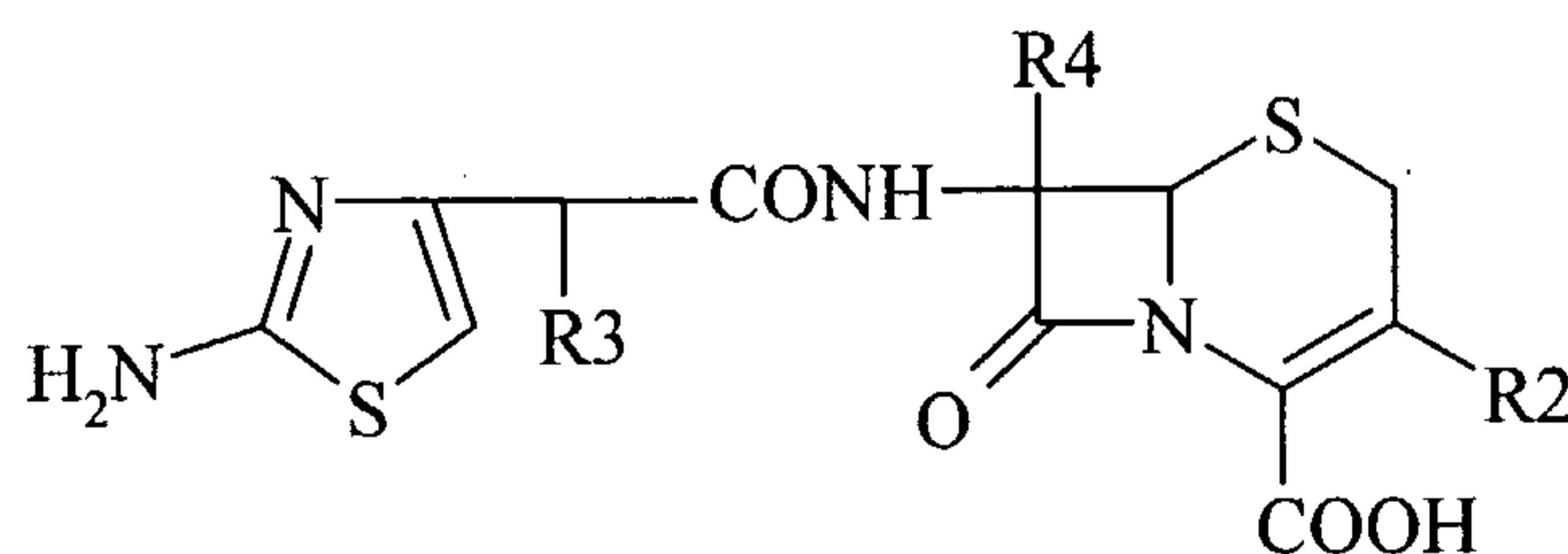
Les milieux selon l'invention permettent la détection de bactéries résistantes à la méticilline, à partir d'un inoculum strié sur boîte, alors que la majorité des méthodes de l'art antérieur utilisent un dépôt d'environ  $10^4$  à  $10^5$  bactéries sur la gélose. On peut utiliser les milieux selon l'invention directement à partir d'un  
5 prélèvement à partir d'un patient, ou après une phase d'enrichissement.

Par céphalosporine de seconde ou troisième génération, on entend désigner les antibiotiques de la famille des céphalosporines présentant une formule dérivée de la formule (I) suivante :



10 dans laquelle R2 est un groupement H, acétoxy-méthyle, méthyl-thiotétrazole, diméthyl-amino-éthyl-thiotétrazole, triazine, acétamino-pyridine (pyridinium), ou pyridinium substitué par un groupement carbamoyl, cyclo-pento-pyridinium, thiométhyl-acétoxy-thiazole, R1 est un hétérocycle amino-2-thiazole, une  $\alpha$ -pipérazine-dione, un  $\alpha$ -sulfo-phényle, et R4 est un groupement H ou un radical  $\alpha$ -  
15 méthoxy.

En particulier, on entend désigner les composés présentant la formule suivante :

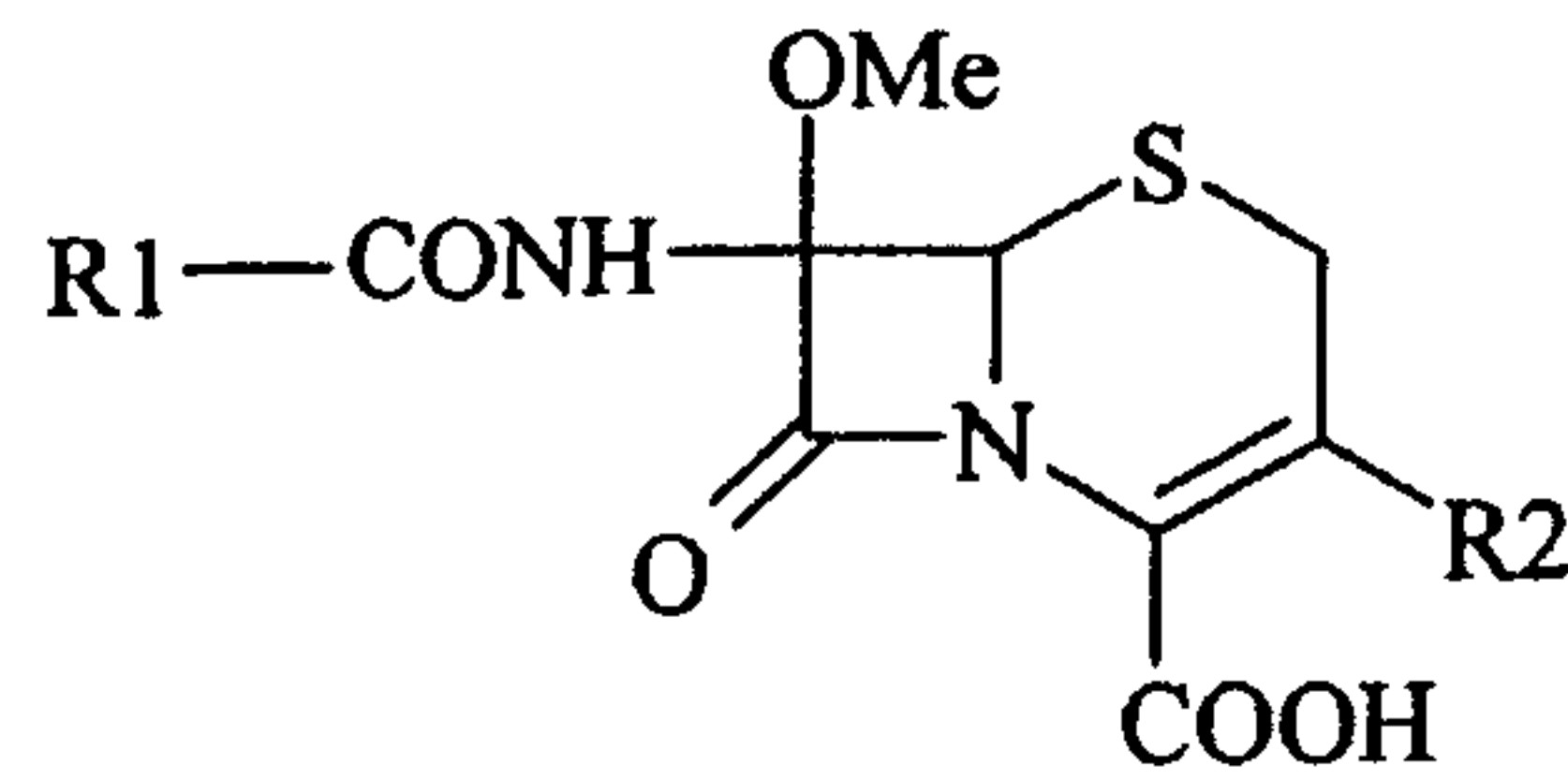


dans laquelle R3 est un groupement H ou un groupement  $\alpha$ -méthoxy-imino.

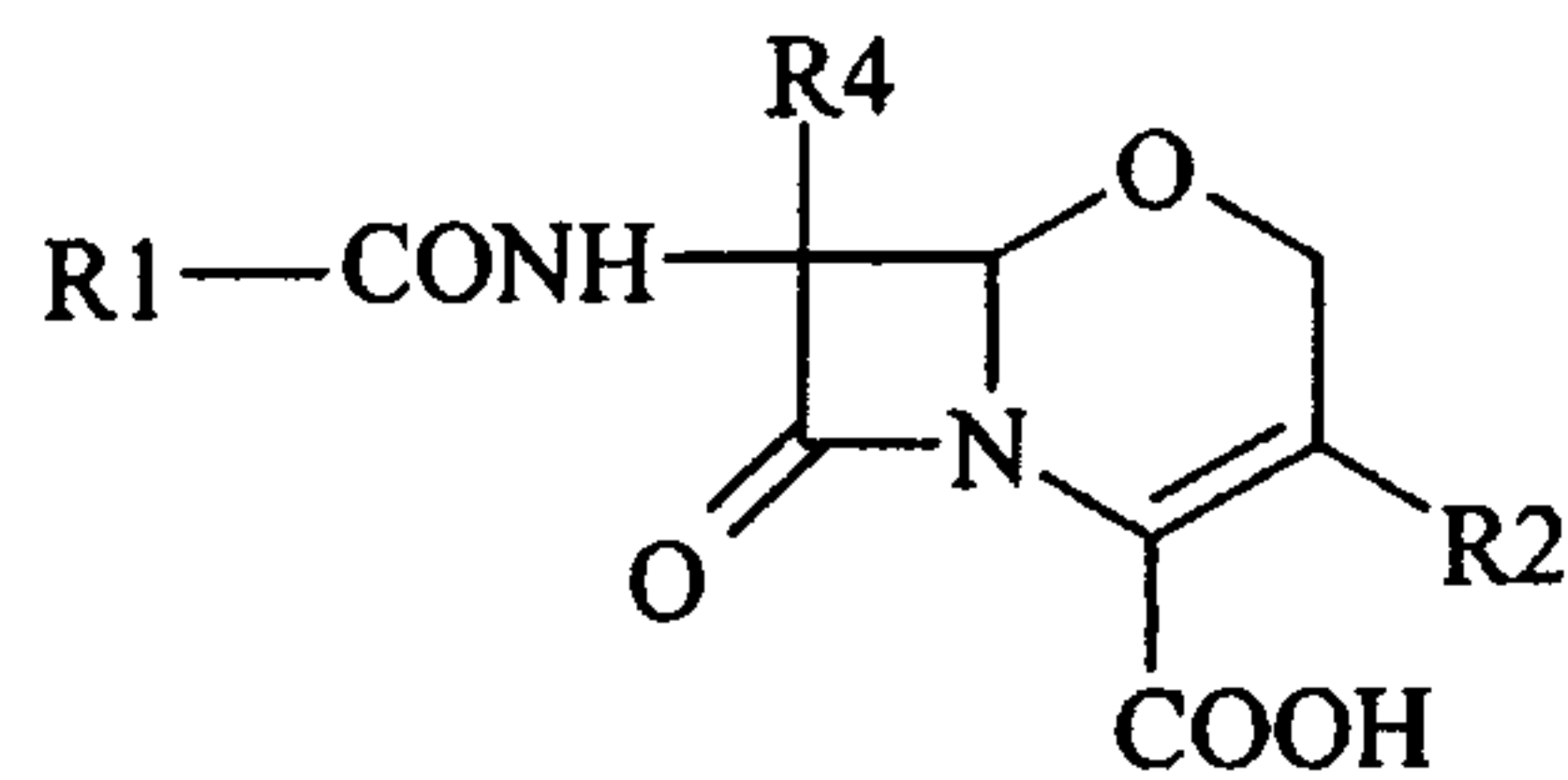
20 Dans un cas particulier, le groupement R4 est un hydrogène.

Les céphamycines sont des composés dans lesquels le groupement R4 est un radical  $\alpha$ -méthoxy, protégeant le noyau  $\beta$ -lactame de l'hydrolyse par les  $\beta$ -lactamases et répondent à la formule suivante :

4



Les oxacephems sont des composés dans lesquels l'atome soufre du noyau céphem est remplacé par un atome d'oxygène, et sont considérés comme dérivés de la formule (I) présentée plus haut.



5

En général, pour ces composés, le groupement R4 est un  $\alpha$ -méthoxy.

Une définition des céphalosporines ainsi envisagées peut être trouvée dans Binger (Mécanisme d'Action des Bêta-lactamines, ( de la structure bactérienne à la structure de la molécule ), 1986 Roussel (Paris) éditeur, chapitre III pages 47-62, et  
 10 chapitre IV pages 63-68), et dans l'ouvrage de Richmond (Beta-lactam antibiotics (the background to their use as therapeutic agents ), Hoechst Aktiengesellschaft, D-6230 Frankfurt (Main) 80 éditeur, 1981, chapitre 3 pages 55-65).

A titre accessoire, on peut noter que les céphalosporines de seconde  
 15 génération présentent un meilleur effet que les céphalosporines de première génération contre les bactéries Gram négatives et résistent mieux à la dégradation par les  $\beta$ -lactamases, les céphalosporines de troisième génération présentant un spectre d'effet encore plus large vis-à-vis des bactéries Gram négatives.

Parmi les céphalosporines de seconde et troisième génération, on peut citer :  
 20 loracarbef, cefaclor, cefuroxime, cefprozil, cefoxitin (cefoxitan), cefamandole, cefotian, cefotetan, cefmetazole, cefocinide, ceforanide, cefpodoxime, cefixime, cefotaxime, ceftizoxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefmenoxime, cefodizime, cefoperazone, cefepime, cefpirome, cefsulfonide, cefetamete, ceftibutene, moxalactam, latamoxef et flomoxef, notamment sous forme de sels (sodiques). L'homme du métier peut obtenir des listes de tels composés.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le cefamandole.

Dans un autre mode de réalisation, ledit antibiotique est choisi dans le groupe des céphamicines (cefoxitine, cefotetan, cefmetazole, cefbupérazone, cefminox) et des oxacephems (moxalactam, latamoxef ou flomoxef).

5 Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est la cefoxitine.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le cefmetazole.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le moxalactam.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit antibiotique est le cefotetan.

10 La concentration en antibiotique dans le milieu selon l'invention est de préférence comprise entre 0,5 et 50 mg/l, de préférence 1,5 et 30 mg/l, en particulier 1,5 et 15 mg/l. Quelques essais de routine permettent à l'homme du métier de l'ajuster en fonction de la CMI (concentration minimale d'inhibition, concentration minimale pour laquelle aucune croissance des microorganismes n'est détectée) des microorganismes considérés pour l'antibiotique considéré.

15 Il est à noter que parmi les antibiotiques susceptibles d'entrer dans la composition d'un milieu de l'invention, certains sont capables de conférer certaines propriétés audit milieu. Par exemple, la cefoxitine ou le cefmetazole confèrent une stabilité particulière, d'au moins 2 mois audit milieu.

20 Par exemple, on a observé une stabilité d'au moins 2 mois pour un milieu conforme à l'invention préparé avec de la cefoxitine à une concentration de 5 mg/l, ajoutée au milieu quand celui-ci est à une température de 48°C. La stabilité du milieu conforme à l'invention a été portée à au moins 5 mois quand celui-ci a été préparé avec du cefmetazole à une concentration de 2,5 mg/l, ajouté au milieu lorsque celui-ci est à une température de 48°C.

25 Par « stabilité du milieu », on entend désigner la capacité du milieu conforme à l'invention à permettre la détection sélective de microorganismes résistants à la méticilline, en particulier des staphylocoques dorés, pendant un temps donné, avec la même fiabilité pendant toute la durée de la période.

30 Il est également à noter qu'une autre céphalosporine, le flomoxef, présente quant à lui la capacité à conserver son activité antibiotique lorsqu'il est soumis à une température supérieure à 100°C (sa résistance ayant même été vérifiée par les inventeurs à 121°C).

Une telle propriété permet de réaliser un milieu conforme à l'invention sous forme d'une unique poudre, ce qui limite considérablement les manipulations nécessaires à effectuer dans des conditions stériles pour la préparation de tout milieu de culture. Le flomoxef peut donc être incorporé au milieu en préparation  
5 avant chauffage ce qui en facilite la préparation. Cet avantage n'est pas négligeable car est de nature à faciliter la tâche de toute personne ayant à préparer de tels milieux, quelle que soit son expérience en la matière.

Dans un mode de réalisation préféré, lesdits microorganismes sont des staphylocoques, et on utilise préférentiellement un agent chromogène choisi dans le  
10 groupe constitué du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside, ainsi que décrit dans la demande WO 00/53799.

Les milieux de culture de *S. aureus* sont connus et décrits notamment dans le manuel "Oxoid Unipath Limited", Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 OPW, Angleterre. Il peut s'agir, par exemple de "Nutrient Agar Oxoid CM3",  
15 milieu essentiellement à base d'extraits de levure, de peptone et d'agar.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit milieu de culture contient à la fois du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside.

Les milieux selon la présente invention contiendront, de préférence, de 0,01  
20 à 0,50 g/l, notamment de 0,05 à 0,40 g/l de 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate, de préférence de 0,01 à 0,20 g/l de 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside, de préférence de 0,01 à 0,20 g/l de 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside, de préférence de 0,01 à 0,20 g/l de 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide.

Dans un mode de réalisation particulier, le milieu de culture selon  
25 l'invention comporte, en outre, au moins l'un des deux agents chromogènes suivants : 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside et 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide.

Dans un mode de réalisation particulier, ledit milieu contient en outre de la déféroxamine. La déféroxamine permet en effet d'inhiber *Staphylococcus epidermis*  
30 sans inhiber *Staphylococcus aureus*, la concentration mise en oeuvre sera de préférence comprise entre 0,01 et 0,10 g/l.

Dans un mode de réalisation, le milieu selon l'invention contient également un antibiotique glycopeptide choisi dans le groupe constitué de la vancomycine, la

teicoplanine et l'avoparcine et leurs mélanges, afin de détecter les microorganismes résistants à la fois à la méticilline et à la vancomycine. On peut utiliser environ de 5 mg/l à 50 mg/l de ces antibiotiques, plus particulièrement de 5 mg/l à 30 mg/l, de 10 mg/l à 30 mg/l, environ 25 mg/l.

5 Dans le cadre de la présente invention, les inventeurs ont montré qu'il n'est pas nécessaire d'avoir une forte charge osmotique dans le milieu de culture. Ainsi, contrairement aux milieux de détection de staphylocoques dorés résistants à la méticilline, utilisant l'oxacilline comme antibiotique, dans lesquels on ajoute du chlorure de sodium, le milieu de culture de l'invention est également fonctionnel  
10 avec une concentration de sodium inférieure à 3 %, et égale à environ 2-2,5 %. Les conditions d'incubation peuvent être adaptées en fonction de la quantité de chlorure de sodium dans le milieu (durée d'incubation, température plus ou moins élevée...).

L'invention se rapporte également à l'utilisation d'un milieu selon l'invention pour la détection de microorganismes résistants à la méticilline.

15 L'invention se rapporte également à un procédé de détection de microorganismes résistants à la méticilline dans un échantillon, comprenant les étapes consistant à :

- inoculer un milieu selon l'invention avec ledit échantillon ou un inoculum issu dudit échantillon,
- 20 - incuber ledit milieu dans des conditions permettant la croissance desdits microorganismes,
- détecter, sur ledit milieu, la présence desdits microorganismes résistants à la méticilline, par la présence de colonies colorées.

Les conditions d'incubation sont connues de l'homme du métier, et on  
25 utilise généralement une incubation à des températures comprises entre 25°C et 42°C, de préférence entre 30°C et 38°C.

Les durées d'incubation sont classiques (environ 24 heures).

Selon le microorganisme considéré, on peut utiliser une durée d'incubation plus courte ou plus longue, travailler dans des conditions aérobies ou anaérobies...

30 Le milieu selon l'invention permet notamment de détecter aisément les staphylocoques résistants à la méticilline, en réduisant le temps d'analyse. La combinaison des antibiotiques choisis dans le cadre de l'invention et des agents

chromogènes permet en effet de réduire le nombre de faux positifs et de faux négatifs, et de diminuer ainsi le besoin de réaliser des analyses complémentaires.

#### EXEMPLES

##### 5 Exemple 1

Composition d'un milieu selon l'invention pour la détection de *S. aureus* résistants à la méticilline :

- Peptone et extrait de levure 40 g/l
- NaCl 25 g/l
- 10 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate 0,10 g/l
- 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside 0,05 g/l
- 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside 0,05 g/l
- 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide 0,05 g/l
- Déféroxamine 0,050 g/l
- 15 Agar 15 g/l

On ajoute, dans ce milieu, de l'oxacilline (6 mg/ml) ou de la cefoxitine (5 mg/l), après autoclavage, avant que le milieu ne soit solide (lorsqu'il est à une température d'environ 45 °C).

- 20 Ce milieu contient du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside, permettant la détection spécifique des staphylocoques dorés (coloration mauve des colonies), ainsi que du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide, pour colorer les autres microorganismes pouvant être présents dans l'inoculum.

##### 25 Exemple 2

Etude de la croissance de souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline sur le milieu CHROMagar Staph aureus (disponible par la société CHROMagar, 4, Place du 18 Juin 1940, 75006 Paris France) :

- AR4295 MetiS : souche sensible à la méticilline
- 30 AR4297 MetiR : souche résistante à la méticilline (homogène)
- MRhet : souche résistante à la méticilline (hétérogène)
- Z252 : souche résistante à la méticilline, homogène, faible niveau de résistance

\* **Marque de commerce**

	AR4295 MetiS	AR4297 MetiR	MRhet	Z252
CHROMagar Staph aureus	+	+	+	+
CHROMagar Staph aureus + oxacilline 6 mg/ml	-	+/-*	-	-
CHROMagar Staph aureus + Cefoxitine 5 mg/l	-	+	+	+

+ = croissance de colonies ; - = pas de croissance ; \* = microcolonies

On inocule les boîtes de Pétri avec des cultures bactériennes en striant les boîtes, pour observer la croissance de bactéries isolées, après incubation à 37°C pendant 24 heures.

Les bactéries qui croissent donnent des colonies mauves sur le milieu de culture, confirmant que les microorganismes sont des staphylocoques dorés.

Ainsi, le milieu selon l'invention permet de détecter directement les staphylocoques dorés résistants à la méticilline, y compris les souches hétérogènes ou à faible niveau de résistance, du fait de la combinaison de la croissance des bactéries et de la coloration des colonies.

**REVENDICATIONS**

1. Milieu de culture gélosé pour la détection des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline, comprenant, outre des nutriments permettant la croissance desdits *Staphylococcus aureus* :

- à titre d'antibiotique : une céphalosporine choisie dans le groupe constitué de la cefoxitine, le cefmetazole, le moxalactam et le flomoxef, et
- au moins un agent chromogène libérant un chromophore après hydrolyse avec une enzyme active chez lesdits *Staphylococcus aureus*.

2. Milieu selon la revendication 1, dans lequel ledit agent chromogène est le 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate.

3. Milieu selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il contient du 5-bromo 6-chloro 3-indoxyl phosphate et du 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucoside.

4. Milieu selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comporte, en outre, au moins l'un des deux agents chromogènes suivants : 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl galactoside et 5-bromo 4-chloro 3-indoxyl glucuronide.

5. Milieu selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la concentration en chlorure de sodium est inférieure à 3 %.

6. Milieu selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la concentration en antibiotique est comprise entre 0,5 et 50 mg/l.

7. Milieu selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la concentration d'un agent chromogène est comprise entre 0,01 et 0,5 g/l.

8. Utilisation d'un milieu selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 pour la détection des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline.

9. Procédé de détection des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline dans un échantillon, comprenant les étapes consistant à :

- inoculer un milieu selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 avec ledit échantillon ou un inoculum issu dudit échantillon,
- incuber ledit milieu dans des conditions permettant la croissance desdits *Staphylococcus aureus*, et
- détecter, sur ledit milieu, la présence desdits *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline, par la présence de colonies colorées.