

(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
15 avril 2010 (15.04.2010)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2010/040951 A1

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

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2009/051908

(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 :
0856814 8 octobre 2008 (08.10.2008) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOMERIEUX [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). **ZAMBARDI, Gilles** [FR/FR]; 7, chemin de Ravanet, F-38460 Trept (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), eurasienn (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 :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))

(54) Title : REACTION MEDIUM FOR METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) BACTERIA

(54) Titre : MILIEU REACTIONNEL POUR LES BACTERIES *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTANTES A LA METICILLINE (MRSA)

(57) Abstract : The present invention relates to a reaction medium for detecting and/or identifying methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteria, comprising a predetermined combination of two antibiotics, a first antibiotic which belongs to the cephalosporin family and a second antibiotic, said first antibiotic and second antibiotic each being at a sub-inhibitory concentration.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un milieu réactionnel pour la détection et/ou l'identification de bactéries *Staphylococcus aureus* résistantes à la Meticilline (MRSA) comprenant une association prédéterminée de deux antibiotiques, un premier antibiotique qui appartient à la famille des céphalosporines et un deuxième antibiotique, ledit premier et deuxième antibiotique étant chacun à une concentration infra-inhibitrice.



WO 2010/040951 A1

Milieu réactionnel pour les bactéries *Staphylococcus aureus* résistantes à la Méticilline (MRSA)

La présente invention concerne un milieu de culture pour la détection des bactéries *Staphylococcus aureus* résistantes à la Méticilline (SARM ou MRSA). L'invention concerne également l'utilisation de ce milieu, ainsi qu'une méthode pour identifier des bactéries MRSA.

Les *Staphylococcus aureus* résistants à la Méticilline sont des souches de *Staphylococcus aureus*, caractérisées par leur résistance à un antibiotique, la Méticilline, et aux antibiotiques apparentés telle que l'Oxacilline. Le plus souvent cette résistance est conférée par l'expression d'un gène, *mecA*, entraînant la production d'une protéine modifiée, PLP2a (également appelée PBP 2a ou PBP 2').

Les bactéries MRSA représentent un fort pourcentage des infections nosocomiales, et sont souvent à l'origine de problèmes de santé graves et potentiellement mortels. Transmis le plus souvent de façon croisée entre les patients via le personnel soignant, les MRSA sont très contagieux et responsables d'infections endémiques très difficiles à contrôler.

Outre un traitement adapté, le dépistage des porteurs de MRSA, et l'isolement des patients colonisés constituent la méthode la plus efficace, aujourd'hui recommandée par des organismes officiels tels que la Society for Healthcare Epidemiology of America (Société Américaine pour l'Epidémiologie Hospitalière). Un dépistage précoce et systématique est donc essentiel.

La détection des MRSA peut se faire par différentes techniques.

Il est ainsi possible de détecter des MRSA par des techniques de biologie moléculaire. A ce titre, on peut citer notamment la demande EP887424. De telles méthodes restent toutefois coûteuses en test de routine, et requièrent un personnel qualifié.

Il est également possible d'utiliser des milieux de culture conventionnels pour détecter les *Staphylococcus aureus*, tel que le milieu décrit dans la demande EP1390524. La détection de MRSA se fait lors d'une étape supplémentaire, par un test d'agglutination spécifique, (Slidex MRSA, bioMérieux) ou par une méthode de diffusion sur gélose en présence d'un disque Oxacilline (recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie).

Il est également possible de mettre en culture les bactéries susceptibles d'être des MRSA sur milieux gélifiés en présence d'antibiotiques. De tels milieux peuvent être également chromogènes, ce qui facilite la lecture et la détection des MRSA. On peut citer notamment le milieu décrit dans la demande EP1543147. Toutefois, la détection d'une activité phosphatase

dans les conditions décrites étant peu spécifique, il est nécessaire de la combiner avec la détection de plusieurs autres activités enzymatiques ce qui réduit la fertilité du milieu et accroît son coût.

5 L'invention se propose de résoudre les lacunes de l'état de la technique en présentant un nouveau milieu de détection sensible, spécifique, et rapide pour isoler et identifier des *Staphylococcus aureus* résistants à la Méricilline (MRSA).

D'une manière surprenante, les inventeurs ont mis en évidence que l'utilisation de combinaison d'antibiotiques, à une concentration faible et prédéterminée, permettait d'obtenir un excellent
10 milieu de détection pour isoler et identifier des *Staphylococcus aureus* résistants à la Méricilline (MRSA). Cet effet est d'autant plus surprenant que les antibiotiques, utilisés séparément, ne permettent nullement de différencier des MRSA aux concentrations selon l'invention.

Avant d'aller plus avant, les définitions suivantes, nullement limitatives, permettront de mieux
15 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 *Staphylococcus aureus*.

Ce milieu réactionnel peut soit servir uniquement de milieu de révélation, soit de milieu de
20 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.

25 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).

30 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 boîte de Petri. Lorsque la présentation est sous forme de gel en flacon, on réalise préférentiellement une régénération (passage à 100°C) préalable du milieu avant de couler en boîte de Petri.

Préférentiellement, le milieu selon l'invention est un milieu sélectif, c'est à dire un milieu
5 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, Amphotéricine, Aztréonam, Colimicine, Chlorure de Sodium (NaCl), Déféroxamine, composé vibriostatique O/129.

Au sens de la présente invention, le substrat d'une activité enzymatique ou métabolique est
10 choisi parmi tout substrat pouvant être hydrolysé en un produit qui permet la détection, directe ou indirecte d'une activité enzymatique ou d'un métabolisme, telle que notamment une activité osidase, préférentiellement une activité alpha glucosidase, estérase, préférentiellement une activité phosphatase, peptidase, préférentiellement une activité coagulase, ou métabolisme d'un hydrate de Carbone, préférentiellement le Mannitol.

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
20 optiques, telles qu'une modification d'absorption, de fluorescence ou de luminescence.

Comme substrat chromogène, on peut citer notamment les substrats à base d'indoxyl, flavone, alizarine, acridine, phénoxazine, nitrophénol, nitroaniline, naphtol, catéchol, hydroxyquinoline, coumarine. Préférentiellement, le(s) substrat(s) utilisé(s) dans la présente invention est(sont) 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 2'-aminophényl-hétérocycle ou encore à base de fluorescéine.

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 ;
30 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.

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

Comme substrat d'activité enzymatique phosphatase, on peut citer plus particulièrement les substrats 5-Bromo-6-chloro-3-indoxyl-phosphate ; 3,4-Cyclohexénoesculétine-phosphate ; 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-phosphate ; 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-méthyl-phosphate ; 6-Chloro-3-indoxyl-phosphate ; 5-Bromo-3-indoxyl-phosphate ; 5-Iodo-3-indoxyl-phosphate ; 6-Fluoro-3-indoxyl-phosphate ; Nitrophényl-phosphate ; 4-Méthylumbelliferyl-phosphate ; Indoxyl-N-méthyl-phosphate ; Naphtyl-phosphate.

Comme substrat de coagulase, on peut citer plus particulièrement les substrats Boc-Val-Pro-Arg-7-amido-4-méthylcoumarine, Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide, Z-Gly-Pro-Arg-4-Méthoxy-beta-naphtylamide, Plasminogène. En général ces substrats sont utilisés en combinaison avec une source de Prothrombine telle que la Prothrombine purifiée ou le Plasma sanguin.

Le substrat utilisé dans la présente invention peut être en combinaison avec d'autres substrats, tels qu'un substrat d'osidase et notamment beta-glucosidase ou beta-ribosidase, estérase et notamment phosphatase ou phospholipase, peptidase et notamment coagulase.

Les substrats de l'invention sont utilisables dans une large gamme de pH, notamment entre pH 5,5 et 10. préférentiellement entre 6,5 et 10. Lorsque le milieu selon l'invention comprend un substrat ou plusieurs substrats d'activité enzymatique alpha glucosidase, la concentration en substrat(s) 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.

Le substrat peut être également un substrat métabolique, telle qu'une source de carbone, couplée à un indicateur produisant une coloration en présence de l'un des produits du métabolisme. Dans le cas du métabolisme d'un hydrate de Carbone, c'est préférentiellement le Mannitol couplé à un indicateur de pH.

Au sens de la présente invention, un antibiotique qui appartient à la famille des céphalosporines est un antibiotique préférentiellement choisi parmi

- Une céphalosporine de première génération, telle que : Cefalexine, Cefaloridine, Cefalotine, Cefazoline, Cefadroxil, Cefazedone, Cefatrizine, Cefapirine, Cefradine, Cefacetile, Cefrodaxine, Ceftezole
- Une Céphalosporine de deuxième génération, telle que : Cefoxitine, Cefuroxime, Cefamandole, Cefaclor, Cefotetan, Cefonicide, Cefotiam, Loracarbef, Cefmetazole, Cefprozil, Ceforanide
- Une céphalosporines de troisième génération, telle que : Cefotaxime, Ceftazidime, Cefsulodine, Ceftriaxone, Cefmenoxime, Latamoxef, Ceftizoxime, Cefixime, Cefodizime, Cefetamet, Cefpiramide, Cefoperazone, Cefpodoxime, Ceftibuten, Cefdinir, Cefditoren, Ceftriaxone, Cefoperazone, Cefbuperazone
- Une céphalosporine de quatrième génération, telle que Cefepime, Cefpirome

Les céphamycines telles que Cefoxitine, Cefotetan, Cefmetazole, Cefbuperazone, Latamoxef sont une sous-famille des céphalosporines.

Dans le cadre de la présente invention, l'antibiotique qui appartient à la famille des céphalosporines est préférentiellement la Cefoxitine, et peut être en combinaison avec la Cefotaxime.

Au sens de la présente invention, un antibiotique qui appartient à la famille des carbapenemes est un antibiotique préférentiellement choisi parmi Meropeneme, Ertapeneme, Imipeneme, Doripeneme, Faropeneme.

Dans le cadre de la présente invention, l'antibiotique qui appartient à la famille des carbapenems est préférentiellement l'Ertapeneme.

Au sens de la présente invention, un antibiotique qui appartient à la famille des aminosides est un antibiotique préférentiellement choisi parmi Amikacine, Gentamicine, Isepamicine, Kanamycine, Netilmicine, Streptomycine, Tobramycine.

25

Par concentration infra-inhibitrice, on entend une concentration inférieure à la concentration en antibiotique nécessaire à l'inhibition des MSSA, en milieu de culture apte a la recherche de *S. aureus* à partir d'un échantillon biologique, tel que le milieu chromID™ *S. aureus* (bioMerieux). Cette concentration est inférieure à environ 3 mg/l dans le cas de la Cefoxitine, environ 2 mg/l dans le cas de Cefotaxime, environ 1 mg/l dans le cas de l'Ertapenem, environ 2 mg/l dans le cas de la Cefoperazone, environ 2 mg/l dans le cas de Cefpodoxime, environ 1 mg/l dans le cas du Cefdinir.

Par association prédéterminée de deux antibiotiques, on entend une association de deux

antibiotiques particuliers, chacun des 2 étant à une concentration infra-inhibitrice particulière. Une telle association peut être déterminée notamment par le test de l'exemple A.

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 fécès, 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 *Staphylococcus aureus* résistantes à la Mécicilline (MRSA) comprenant une association prédéterminée de deux antibiotiques, un premier antibiotique qui appartient à la famille des céphalosporines et un deuxième antibiotique, ledit premier et deuxième antibiotique étant chacun à une concentration infra-inhibitrice.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, ledit premier antibiotique appartient à la sous-famille des céphamycines. Selon un mode encore plus préféré de réalisation de l'invention, ledit premier antibiotique est la Cefoxitine.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, ledit deuxième antibiotique appartient à la famille des carbapénems.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, ledit deuxième antibiotique appartient à la famille des céphalosporines.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, ledit deuxième antibiotique appartient à la famille des aminosides.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le milieu comprend en outre un substrat permettant la détection d'une activité enzymatique, préférentiellement une activité osidase, estérase ou peptidase, ou métabolique, préférentiellement le métabolisme d'un hydrate de Carbone.

Dans le cas d'une activité osidase, c'est préférentiellement une activité alpha-glucosidase. Dans le cas d'une activité estérase, c'est préférentiellement une activité phosphatase. Dans le cas d'une activité peptidase, c'est préférentiellement une activité coagulase. Dans le cas du métabolisme d'un hydrate de Carbone c'est préférentiellement le Mannitol couplé à un

indicateur de pH.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le substrat est un substrat permettant la détection d'une activité enzymatique osidase, préférentiellement alpha-glucosidase.

Ledit substrat d'une activité enzymatique alpha-glucosidase est préférentiellement un indoxyl-
5 alpha-glucoside. Préférentiellement, le substrat utilisé est le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-N-methyl-alpha-glucoside (X-N-méthyl-alpha-glucoside). Préférentiellement, ce substrat 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.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ledit milieu comprend un deuxième
10 substrat enzymatique ou métabolique. Ce substrat peut être un substrat d'alpha-glucosidase ou un autre substrat. Préférentiellement, ce deuxième substrat est un substrat d'alpha glucosidase.

Lorsque ledit milieu comprend un deuxième substrat d'alpha-glucosidase, ce substrat est préférentiellement le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-glucoside (X-alpha-glucoside). Préférentiellement, ce deuxième substrat est présent dans le milieu à une concentration
15 comprise entre 0,01 et 2 g/l, préférentiellement entre 0,02 et 0,3 g/l.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, ledit premier et/ou deuxième antibiotique appartenant à la famille des céphalosporines est choisi parmi

- une céphalosporine de première génération, préférentiellement Cefalexine,
20 Cefaloridine, Cefalotine, Cefazoline, Cefadroxil, Cefazedone, Cefatrizine, Cefapirine, Cefradine, Cefacetrile, Cefrodaxine, Ceftezole
- une céphalosporine de deuxième génération, préférentiellement Cefoxitine, Cefuroxime, Cefamandole, Cefaclor, Cefotetan, Cefonicide, Cefotiam, Loracarbef, Cefmetazole, Cefprozil, Ceforanide
- une céphalosporine de troisième génération, préférentiellement: Cefotaxime, Cefprozil, Cefsulodine, Ceftriaxone, Cefmenoxime, Latamoxef, Ceftizoxime, Cefixime, Cefodizime, Cefetamet, Cefpiramide, Cefoperazone, Cefpodoxime, Ceftributen, Cefdinir, Cefditoren, Ceftriaxone, Cefoperazone, Cefbuperazone
- une céphalosporine de quatrième génération, préférentiellement Cefepime,
30 Cefpirome

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, ledit deuxième antibiotique appartenant à la famille des carbapenems est choisi parmi Meropeneme, Ertapeneme, Imipeneme.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la combinaison de deux antibiotiques est

choisie parmi les combinaisons Cefoxitine - Cefotaxime ou Cefoxitine - Ertapenem.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le milieu peut comprendre, en outre, au moins un inhibiteur qui privilégie la croissance des bactéries *Staphylococcus aureus*, tel que Chlorure de lithium(LiCl), Azide de sodium (NaN₃), Colistine, Amphotéricine, Aztréonam, Colimicine, Chlorure de sodium(NaCl) et 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 *Staphylococcus*, qui sont LiCl, composé vibriostatique O/129, Aztréonam, et. Amphotéricine.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'association de deux antibiotiques comprend la Cefoxitine et la Cefotaxime. Préférentiellement, ladite concentration infra inhibitrice en Cefoxitine est comprise entre 0,25 et 1,5 mg/l, préférentiellement entre 0,5 et 1 mg/l. Préférentiellement, ladite concentration infra inhibitrice en Cefotaxime est comprise entre 0,25 et 1,5 mg/l, préférentiellement entre 0,5 et 1 mg/l.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'association de deux antibiotiques comprend la Cefoxitine et la Ceftriaxone. Préférentiellement, ladite concentration infra inhibitrice en Cefoxitine est comprise entre 0,25 et 1,5 mg/l, préférentiellement entre 0,5 et 1 mg/l. Préférentiellement, ladite concentration infra inhibitrice en Ceftriaxone est comprise entre 0,25 et 1,5 mg/l, préférentiellement entre 0,5 et 1 mg/l.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'association de deux antibiotiques comprend la Cefoxitine et l'Ertapenem. Préférentiellement, ladite concentration infra inhibitrice en Cefoxitine est comprise entre 0,25 et 1,5 mg/l, préférentiellement entre 0,5 et 1 mg/l. Préférentiellement, ladite concentration infra inhibitrice en Ertapenem est comprise entre 0,5 et 0,75 mg/l.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'association de deux antibiotiques comprend la Cefoxitine et la Cefpodoxime. Préférentiellement, ladite concentration infra inhibitrice en Cefoxitine est comprise entre 0,25 et 1,5 mg/l, préférentiellement entre 0,5 et 1 mg/. Préférentiellement, ladite concentration infra inhibitrice en Cefpodoxime est comprise entre 0,75 et 1 mg/l, préférentiellement entre 0,5 et 1 mg/l.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'association de deux antibiotiques comprend la Cefoxitine et la Cefoperazone. Préférentiellement, ladite concentration infra inhibitrice en Cefoxitine est comprise entre 0,25 et 1,5 mg/l, préférentiellement entre 0,5 et 1 mg/. Préférentiellement, ladite concentration infra inhibitrice en Cefoperazone est comprise entre 0,5 et 0,75 mg/l, préférentiellement entre 0,75 et 1 mg/l.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'association de deux antibiotiques comprend la Cefoxitine et le Cefdinir. Préférentiellement, ladite concentration infra inhibitrice en Cefoxitine est comprise entre 0,25 et 1,5 mg/l, préférentiellement entre 0,25 et 0,75 mg/l. Préférentiellement, ladite concentration infra inhibitrice en Cefdinir est comprise entre 0,05 et 0,5 mg/l, préférentiellement entre 0,1 et 0,25 mg/l.

L'invention concerne également l'utilisation *in vitro* d'un milieu réactionnel tel que défini ci avant pour isoler et identifier des bactéries *Staphylococcus aureus* résistantes à la Meticilline (MRSA).

Lors de l'utilisation de ce milieu, les MRSA sont préférentiellement détectés par une activité α -glucosidase spécifique qui permet d'obtenir des colonies colorées ou fluorescentes. Les autres espèces de *Staphylococcus aureus* apparaissent incolores ou d'une couleur ou fluorescence différente de celle des colonies de *S. aureus*.

L'invention concerne enfin un procédé de détection et/ou d'identification de bactéries *Staphylococcus aureus* résistantes à la Meticilline (MRSA) dans un échantillon biologique selon lequel

a) onensemence l'échantillon biologique susceptible de contenir des bactéries *Staphylococcus aureus* résistantes à la Meticilline (MRSA) sur un milieu réactionnel tel que défini ci avant

b) onincube

c) onidentifie les colonies de MRSA.

L'incubation est préférentiellement réalisée à une température comprise entre 30°C et 42°C. Les MRSA sont préférentiellement détectées par une activité α -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*.

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

Exemple A - Test pour déterminer l'association prédéterminée de deux antibiotiques selon l'invention

Le test ci dessous peut être mis en oeuvre pour définir l'association prédéterminée de deux antibiotiques selon l'invention, qui dépend des antibiotiques employés et plus généralement de la formulation du milieu réactionnel.

Pour aider à sa compréhension, ce test est mis en oeuvre ci-dessous dans le cas d'une combinaison Cefoxitine et Cefotaxime, à partir d'un kit de souches de microorganismes, comprenant des MSSA et des MRSA, mais ce test peut bien évidemment être mis en oeuvre pour d'autres antibiotiques.

Dix milieux réactionnels aptes à la recherche de *S aureus* dans un échantillon biologique (tel qu'un milieu chromID™ *S. aureus*, bioMérieux) et différentes concentrations en Cefoxitine (entre 0 et 3 mg/l) et Cefotaxime (entre 0 et 2 mg/l) sont utilisés pour obtenir des concentrations en antibiotiques comprises entre 0 et 5 mg/l. Les différentes concentrations sont espacées de façon régulière, par exemple selon une distribution arithmétique ou géométrique.

Chacun des milieux est aliquoté de façon à ce que chaque souche de microorganisme puisse êtreensemencée en culture pure sur chacun des milieux. Après un temps d'incubation adapté, préférentiellement 18 à 24 heures, à une température appropriée, préférentiellement 30 à 37°C, les milieux sont examinés de façon à sélectionner le milieu comprenant une association en Cefoxitine et Cefotaxime permettant de révéler le plus grand nombre de MRSA tout en les différenciant du plus grand nombre de souches MSSA.

Il peut être nécessaire de répéter l'expérimentation en adaptant les concentrations en chacun des antibiotiques.

Exemple B – Milieu selon l'invention comprenant un substrat alpha glucosidase

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-alpha-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 A : milieu S (concentration X-alpha-glucoside : 45 mg/l), la Cefoxitine étant substituée par le Ceftriaxone, à une concentration de 1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16 ; 32 mg/l

Milieu B : milieu S (concentration X-alpha-glucoside : 45 mg/l), la Cefoxitine étant substituée par le Cefotaxime à une concentration de 1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16 ; 32 mg/l

5 **Milieu C** : milieu S (concentration X-alpha-glucoside : 45 mg/l), la Cefoxitine étant substituée par l'Ertapenem à une concentration de 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 mg/l

Milieu D : milieu S (concentration X-alpha-glucoside : 45 mg/l), la Cefoxitine étant substituée par le Cefoperazone à une concentration de 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 mg/l

10 **Milieu E** : milieu S (concentration X-alpha-glucoside : 45 mg/l), la Cefoxitine étant substituée par le Cefpodoxime à une concentration de 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 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

15 **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

20 **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 privilégiant la croissance des *Staphylococcus 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

5 **Milieu L** : milieu S (concentration X-alpha-glucoside : 45 mg/l), la Cefoxitine étant substituée par le Cefdinir à une concentration de 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 mg/l

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

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

10 2. Ensemencement et lecture des milieux

Différents sets de 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 été examinées visuellement après 18h ou 24 heures d'incubation.

15 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.

3. Résultats :

20 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.

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

Souches	Incubation	Milieu T	Milieu S [X α Glu] = 25 mg/l	Milieu [X α Glu] = 37 mg/l	Milieu [X α Glu] = 50 mg/l
		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 permettait d'intensifier fortement la coloration des colonies, permettant ainsi de mieux repérer les colonies de MRSA.

3.2 Milieu pour détecter des MRSA comprenant un antibiotique choisi parmi la Ceftriaxone, la Cefotaxime, l'Ertapenem, la Cefoperazone, la Cefpodoxime ou le Cefdinir

Les résultats obtenus lors de la substitution de la Cefoxitine par un autre antibiotique sont présentés dans les tableaux 2a à 2f.

Tableau 2a – Substitution de la Cefoxitine par la Ceftriaxone

	Milieu	T	A					
	Antibiotique	Cefoxitine	Ceftriaxone					
	Concentration (mg/l)	4	1	2	4	8	16	32
MRSA (Nb souches détectées / Nb de souches)	Lecture 18h	7/10	9/10	8/10	3/10	—	—	—
	Lecture 24h	8/10	10/10	10/10	6/10	3/10	—	—
MSSA (Nb souches détectées / Nb de souches)	Lecture 18h	3/10	9/10	7/10	3/10	—	—	—
	Lecture 24h	3/10	9/10	7/10	3/10	—	—	—

Tableau 2b – Substitution de la Cefoxitine par la Cefotaxime

	Milieu	T	B					
	Antibiotique	Cefoxitine	Cefotaxime					
	Concentration (mg/l)	4	1	2	4	8	16	32
MRSA (Nb souches détectées / Nb de souches)	Lecture 18h	7/10	6/10	3/10	1/10	—	—	—
	Lecture 24h	9/10	9/10	5/10	3/10	—	—	—
MSSA (Nb souches détectées / Nb de souches)	Lecture 18h	3/10	7/10	3/10	—	—	—	—
	Lecture 24h	3/10	7/10	3/10	—	—	—	—

5

Tableau 2c – Substitution de la Cefoxitine par l'Ertapenem

	Milieu	T	C				
	Antibiotique	Cefoxitine	Ertapenem				
	Concentration (mg/l)	4	0,1	0,25	0,5	0,75	1
MRSA (Nb souches détectées / Nb de souches)	Lecture 18h	7/10	9/10	9/10	8/10	8/10	5/10
	Lecture 24h	7/10	10/10	10/10	10/10	9/10	9/10
MSSA (Nb souches détectées / Nb de souches)	Lecture 18h	—	10/10	10/10	10/10	8/10	4/10
	Lecture 24h	—	10/10	10/10	10/10	9/10	6/10

Tableau 2d – Substitution de la Cefoxitine par la Cefoperazone

	Milieu	T	D			
	Antibiotique	Cefoxitine	Cefoperazone			
	Concentration (mg/l)	4	0,5	1	1,5	2
MRSA (Nb souches détectées / Nb de souches)	Lecture 18h	5/10	8/10	8/10	5/10	4/10
	Lecture 24h	5/10	10/10	8/10	6/10	5/10
MSSA (Nb souches détectées / Nb de souches)	Lecture 18h	—	10/10	9/10	5/10	4/10
	Lecture 24h	—	10/10	9/10	6/10	4/10

Tableau 2e – Substitution de la Cefoxitine par la Cefpodoxime

	Milieu	T	E			
	Antibiotique	Cefoxitine	Cefpodoxime			
	Concentration (mg/l)	4	0,5	1	1,5	2
MRSA (Nb souches détectées / Nb de souches)	Lecture 18h	5/10	9/10	8/10	8/10	5/10
	Lecture 24h	5/10	10/10	9/10	8/10	7/10
MSSA (Nb souches détectées / Nb de souches)	Lecture 18h	—	10/10	10/10	8/10	6/10
	Lecture 24h	—	10/10	10/10	8/10	6/10

Tableau 2f – Substitution de la Cefoxitine par le Cefdinir

	Milieu	T	L					
	Antibiotique	Cefoxitine	Cefdinir					
	Concentration (mg/l)	4	0,25	0,5	1	2	4	8
MRSA (Nb souches détectées / Nb de souches)	Lecture 18h	5/10	3/10	3/10	2/10	—	—	—
	Lecture 24h	6/10	4/10	4/10	4/10	1/10	—	—
MSSA (Nb souches détectées / Nb de souches)	Lecture 18h	—	—	—	—	—	—	—
	Lecture 24h	—	5/10	1/10	—	—	—	—

Les antibiotiques Cefoxatime, Ceftriaxone, Ertapenem, Cefpodoxime, Cefoperazone et
 5 Cefdimir ne permettaient pas d'obtenir seuls une sensibilité et une spécificité permettant la
 discrimination des MRSA et des MSSA.

**3.3 - Milieu pour détecter des MRSA comprenant une combinaison
 d'antibiotiques choisi parmi les couples Cefoxitine/Ceftriaxone, Cefoxitine/Cefotaxime,
 10 Cefoxitine/Ertapenem, Cefoxitine/Cefoperazone ou Cefoxitine/Cefpodoxime**

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 (détection exprimée en nombre de souches détectées par nombre de souches totales)

Milieu	T	F					T	G					T	H									
Antibio- tique 1	Cefo- xitine	Cefoxitine					Cefo- xitine	Cefoxitine					Cefo- xitine	Cefoxitine									
Concen- tration Antibio- tique 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	0,75
Antibio- tique 2	Aucun	Cefotaxime					Au-cun	Ceftriaxone					Aucun	Ertapenem									
Concen- tration Antibio- tique 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	0,75	1	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	
	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	8/10	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			
	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									
Antibio- tique 1	Cefo- xitine	Cefoxitine											Cefoxitine									
Concen- tration Antibio- tique 1 (mg/l)																						
	4	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	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
Antibio- tique 2	Aucun	Cefpodoxime										Aucun	Cefoperazone									
Concen- tration Antibio- tique 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	1,5	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	1/10	
	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	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		
	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	

Milieu		T	M								
Antibiotique 1		Cefoxitine	Cefoxitine								
Concentration Antibiotique 1 (mg/l)		4	0,25	0,5	0,75	0,25	0,5	0,75	0,25	0,5	0,75
Antibiotique 2		Aucun	Cefdinir								
Concentration Antibiotique 2 (mg/l)		0	0,1	0,1	0,1	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5
MRSA	Lecture 18h	6/10	7/10	6/10	6/10	4/10	4/10	5/10	4/10	3/10	2/10
	Lecture 24h	7/10	8/10	7/10	7/10	4/10	5/10	5/10	4/10	4/10	4/10
MSSA	Lecture 18h	—	4/10	1/10	—	—	—	—	1/10	1/10	—
	Lecture 24h	—	5/10	1/10	1/10	—	—	—	1/10	1/10	—

Les associations d'antibiotiques ci dessus permettaient d'obtenir une spécificité et une sensibilité supérieure à celles obtenues lors de l'utilisation d'un seul antibiotique.

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

Les résultats obtenus lors de l'utilisation de combinaisons d'antibiotiques sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 – Détection de colonies MRSA lors de l'utilisation d'une combinaison d'antibiotiques Cefoxitine/Cefotaxime et un mélange d'inhibiteurs (détection exprimée en nombre de souches détectées par nombre de souches totales)

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

La combinaison d'antibiotiques Cefoxitine/Cefotaxime associée à un mélange d'inhibiteurs privilégiant la croissance des *Staphylococcus aureus* permettait d'obtenir une excellente spécificité et sensibilité.

Exemple C – Milieu selon l'invention comprenant un substrat phosphatase

Les expériences similaires à celles présentées dans l'exemple B ont été réalisées, le substrat alpha glucosidase étant substitué par un substrat de phosphatase 6-Chloro-3-Indoxyl phosphate (Rose-Phosphate), l'association en antibiotiques étant cefoxitine et cefotaxime

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 – Détection de colonies MRSA lors de l'utilisation d'un substrat de phosphatase et d'une combinaison d'antibiotiques cefoxitine / cefotaxime.

Milieu		T	M					
Antibiotique 1		Cefoxitine	Cefoxitine					
Concentration Antibiotique 1 (mg/l)		4	0,75	0,75	0,75	0,75	1	1
Antibiotique 2		Aucun	Cefotaxime					
Concentration Antibiotique 2 (mg/l)		0	0	0,5	0,75	1	0,5	0,75
MRSA	Lecture 18h	10/10	10/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Lecture 24h	10/10	10/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10
MSSA	Lecture 18h	—	10/10	—	—	—	—	—
	Lecture 24h	—	10/10	2/10	—	—	—	—

La combinaison d'antibiotiques Cefoxitine/Cefotaxime associée au substrat 6-Chloro-3-Indoxyl phosphate (Rose-Phosphate) permettait d'obtenir une excellente spécificité et sensibilité.

REVENDICATIONS

- 1) Milieu réactionnel pour la détection et/ou l'identification de bactéries *Staphylococcus aureus* résistantes à la Mécilline (MRSA) comprenant une association prédéterminée de deux antibiotiques, un premier antibiotique qui appartient à la famille des céphalosporines et un deuxième antibiotique, ledit premier et deuxième antibiotique étant chacun à une concentration infra-inhibitrice.
- 2) Milieu réactionnel selon la revendication 1 selon lequel ledit premier antibiotique appartient à la sous-famille des céphamycines.
- 3) Milieu réactionnel selon la revendication 1 ou 2 selon lequel ledit deuxième antibiotique appartient à la famille des carbapénems.
- 4) Milieu réactionnel selon la revendication 1 ou 2 selon lequel ledit deuxième antibiotique appartient à la famille des céphalosporines.
- 5) Milieu réactionnel selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 selon lequel il comprend en outre un substrat permettant la détection d'une activité enzymatique ou métabolique.
- 6) Milieu réactionnel selon la revendication 5, selon lequel ladite activité enzymatique est une activité osidase, estérase ou peptidase.
- 7) Milieu réactionnel selon la revendication 6, selon lequel ladite activité enzymatique osidase est une activité alpha-glucosidase.
- 8) Milieu réactionnel selon la revendication 5, selon lequel ladite activité métabolique est le métabolisme d'un hydrate de Carbone.
- 9) Milieu réactionnel selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 selon lequel il comprend, en outre, un deuxième substrat d'une activité enzymatique ou métabolique.

10) Milieu réactionnel selon la revendication 9 selon lequel ledit un deuxième substrat est un substrat d'une activité enzymatique alpha-glucosidase.

11) Milieu réactionnel selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 selon lequel ledit premier et/ou deuxième antibiotique appartenant à la famille des céphalosporines est choisi parmi :

- Une céphalosporine de première génération préférentiellement choisi parmi Cefalexine, Cefaloridine, Cefalotine, Cefazoline, Cefadroxil, Cefazedone, Cefatrizine, Cefapirine, Cefradine, Cefacetrile, Cefrodaxine, Ceftezole ;
- Une Céphalosporine de deuxième génération, préférentiellement choisi parmi Cefoxitine, Cefuroxime, Cefamandole, Cefaclor, Cefotetan, Cefonicide, Cefotiam, Loracarbef, Cefmetazole, Cefprozil, Ceforanide ;
- Une céphalosporines de troisième génération, préférentiellement choisi parmi Cefotaxime, Ceftazidime, Cefsulodine, Ceftriaxone, Cefmenoxime, Latamoxef, Ceftizoxime, Cefixime, Cefodizime, Cefetamet, Cefpiramide, Cefoperazone, Cefpodoxime, Ceftibuten, Cefdinir, Cefditoren, Ceftriaxone, Cefoperazone, Cefbuperazone ;
- Une céphalosporine de quatrième génération, préférentiellement choisi parmi Cefepime, Cefpirome.

12) Milieu réactionnel selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 selon lequel ledit deuxième antibiotique appartenant à la famille des carbapenems est choisi parmi Meropeneme, Ertapeneme, Imipeneme.

13) Milieu réactionnel selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 selon lequel la combinaison de deux antibiotiques est choisie parmi la combinaison Cefoxitine - Cefotaxime ou Cefoxitine - Ertapenem.

14) Utilisation *in vitro* d'un milieu réactionnel selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 pour isoler et identifier des bactéries *Staphylococcus aureus* résistantes à la Mécilline (MRSA).

15) Procédé de détection et/ou d'identification de bactéries *Staphylococcus aureus* résistantes à la Mécilline (MRSA) dans un échantillon biologique selon lequel

- a) on ensemence l'échantillon biologique susceptible de contenir des bactéries *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline MRSA sur un milieu réactionnel selon l'une quelconque des revendications 1 à 13
- b) on incube
- c) on identifie les colonies comme étant des colonies de MRSA.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/051908

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/04 C12Q1/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2004/063391 A (BECTON, DICKINSON AND COMPANY [US]) 29 July 2004 (2004-07-29) abstract paragraphs [0009] - [0019] claims 1-16 ----- -/-	1-7, 10-15 9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 March 2010

Date of mailing of the international search report

09/03/2010

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Giry, Murielle

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/051908

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WERTHEIM H. ET AL.: "Improved detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using phenyl mannitol broth containing aztreonam and ceftizoxime" J. CLIN. MICROBIOL., vol. 39, no. 7, July 2001 (2001-07), pages 2660-2662, XP002281097 abstract page 2660, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, paragraph 2 page 2661, left-hand column, last paragraph - right-hand column, last paragraph</p>	1,5,8, 11,14-15
Y	<p>FR 2 881 755 A (BIOMERIEUX SA [FR]) 11 August 2006 (2006-08-11) abstract claims 2,3</p>	9
A	<p>WO 2007/096639 A (NEWCASTLE UPON TYNE HOSPITALS NHS [GB]) 30 August 2007 (2007-08-30) abstract pages 3-4 claims 1-18</p>	1-15
A	<p>VELASCO D. ET AL.: "Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in Staphylococcus aureus" J. ANTIMICR. CHEMOTHER., vol. 55, no. 3, March 2005 (2005-03), pages 379-382, XP002519822 abstract</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT*Information on patent family members*

International application No

PCT/FR2009/051908

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004063391	A	29-07-2004	AU 2004204446 A1	29-07-2004
			CA 2504056 A1	29-07-2004
			EP 1581651 A1	05-10-2005
			JP 2006515184 T	25-05-2006
FR 2881755	A	11-08-2006	EP 1846568 A2	24-10-2007
			WO 2006085027 A2	17-08-2006
			JP 2008529514 T	07-08-2008
			US 2008145879 A1	19-06-2008
WO 2007096639	A	30-08-2007	CA 2642815 A1	30-08-2007
			EP 1987155 A2	05-11-2008
			GB 2435475 A	29-08-2007
			US 2010047852 A1	25-02-2010

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/051908

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12Q1/04 C12Q1/14

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X Y	WO 2004/063391 A (BECTON, DICKINSON AND COMPANY [US]) 29 juillet 2004 (2004-07-29) abrégé alinéas [0009] - [0019] revendications 1-16	1-7, 10-15 9
X	WERTHEIM H. ET AL.: "Improved detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using phenyl mannitol broth containing aztreonam and ceftizoxime" J. CLIN. MICROBIOL., vol. 39, no. 7, juillet 2001 (2001-07), pages 2660-2662, XP002281097 abrégé page 2660, colonne de gauche, alinéa 1 - colonne de droite, alinéa 2 page 2661, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, dernier alinéa -/--	1,5,8, 11,14-15

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 mars 2010

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/03/2010

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Giry, Murielle

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/051908

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	FR 2 881 755 A (BIOMERIEUX SA [FR]) 11 août 2006 (2006-08-11) abrégé revendications 2,3 -----	9
A	WO 2007/096639 A (NEWCASTLE UPON TYNE HOSPITALS NHS [GB]) 30 août 2007 (2007-08-30) abrégé pages 3-4 revendications 1-18 -----	1-15
A	VELASCO D. ET AL.: "Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in Staphylococcus aureus" J. ANTIMICR. CHEMOTHER., vol. 55, no. 3, mars 2005 (2005-03), pages 379-382, XP002519822 abrégé -----	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2009/051908

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2004063391 A	29-07-2004	AU 2004204446 A1	29-07-2004
		CA 2504056 A1	29-07-2004
		EP 1581651 A1	05-10-2005
		JP 2006515184 T	25-05-2006
FR 2881755 A	11-08-2006	EP 1846568 A2	24-10-2007
		WO 2006085027 A2	17-08-2006
		JP 2008529514 T	07-08-2008
		US 2008145879 A1	19-06-2008
WO 2007096639 A	30-08-2007	CA 2642815 A1	30-08-2007
		EP 1987155 A2	05-11-2008
		GB 2435475 A	29-08-2007
		US 2010047852 A1	25-02-2010