

Objectifs

Les infections à *Staphylococcus aureus* producteurs de Leucocidine de Pantone Valentine (PVL) sont rares mais graves : leur détection rapide est nécessaire pour introduire une antibiothérapie adaptée. Le but de ce travail était de mettre en place une PCR triplex maison en temps réel pour la détection de *S. aureus*, de la résistance à la méticilline et de la production de PVL au sein du Laboratoire de Bactériologie du CHU Amiens Picardie.

Matériels et Méthodes

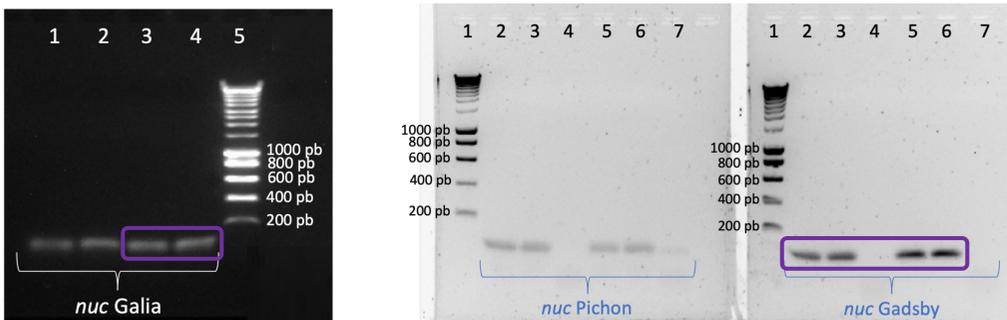
46 souches cliniques de Staphylocoques ainsi que 3 souches de collection ont été utilisées. Les résultats obtenus par notre PCR triplex étaient confrontés aux résultats des techniques de référence (identification par MALDI-ToF pour *nuc*, étude de la résistance à la méticilline par réalisation d'un antibiogramme ou par détection rapide de la PLP2a par immunochromatographie sur membrane pour *mecA* et recherche de PVL par PCR au Centre National de Référence des Staphylocoques aux Hospices Civils de Lyon pour *lukS*). Différents couples d'amorces ont été testés par PCR en point final puis les couples retenus ont été évalués par PCR triplex en temps réel. Enfin, une validation de méthode en portée B a été entamée selon les exigences de la norme NF EN ISO 15189.

Résultats

1/ Mise en place de la PCR triplex sur souche

1. PCR en point final

Trois couples d'amorces ont été testés pour *nuc* : Pichon *et al.*¹, Galia *et al.*² et Gadsby *et al.*³



(1) SASM, (2) SARM, (3) *S. saprophyticus*, (4) eau, (5) marqueur de poids moléculaire

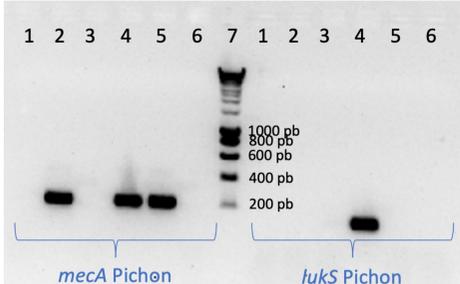
→ amplification **non spécifique** pour les amorces de Galia *et al.*²

(1) marqueur de poids moléculaire, (2) SASM, (3) SARM, (4) *S. saprophyticus*, (5) SARM-PVL+, (6) SARM, (7) eau

→ bandes **plus nettes et plus intenses** pour les amorces de Gadsby *et al.*³

Un seul couple d'amorces a été testé pour *mecA* et *lukS* : Pichon *et al.*¹

→ bandes nettes et intenses pour les souches attendues



(1) SASM, (2) SARM, (3) *S. saprophyticus*, (4) SARM-PVL+, (5) SARM, (6) eau, (7) marqueur de poids moléculaire

Pour le gène *nuc* le couple d'amorces de Gadsby *et al.*³ a été retenu.
Pour les gènes *mecA* et *lukS* les couples d'amorces de Pichon *et al.*¹ ont été retenus.

2. PCR en temps réel triplex

Une gamme de dilution de 10^8 à 10^2 UFC/mL d'une souche SARM-PVL+ est passée 6 fois.

Réalisation de **droites de calibration**
→ calcul de l'efficacité de la PCR

Détermination du **seuil de fluorescence** pour chaque gène

critère d'acceptabilité	droite de calibration	R ²	Efficacité (E)
		> 0,98 ⁴	90 < E < 110% ⁵
<i>nuc</i>	$y = -3,602x + 49,899$	0,9977	91,6%
<i>mecA</i>	$y = -3,4362x + 48,073$	0,9989	89,5%
<i>lukS</i>	$y = -3,5401x + 49,022$	0,9994	95,4%

nuc : $\Delta Rn = 0,1$
mecA : $\Delta Rn = 0,15$
lukS : $\Delta Rn = 0,08$

Les résultats obtenus pour l'efficacité et le coefficient de détermination (R²) sont **conformes aux données de la littérature**, excepté pour l'efficacité de *mecA*. Cela ne constitue pas un obstacle à l'utilisation de notre PCR car l'étude de la résistance à la méticilline est possible par d'autres méthodes.

2/ Validation de méthode

Selon les exigences de la norme NF EN ISO 15189

1. Fidélité intermédiaire

4 souches (3 souches de référence, 1 souche clinique) sont passées en duplicate, sur 5 jours différents.

Les valeurs obtenues diffèrent de +/- 1 CT par rapport à la moyenne
=> **CONFORME**

2. Contamination

Une souche SARM-PVL+ est déposée 6 fois en alternance avec de l'eau.

Absence de contamination inter-échantillon
=> **CONFORME**

3. Exactitude

→ Évaluation Externe de la Qualité

	Recherche	Résultat attendu	<i>nuc</i>	<i>mecA</i>	<i>lukS</i>	Interprétation
Enquête 2211	<i>mecA</i>	SARM	+	+	+	CONFORME
	toxines	SARM-PVL+	+	+	+	CONFORME
Enquête 2231	<i>mecA</i>	SARM	+	+	-	CONFORME
	toxines	SA-PVL-	+	-	-	CONFORME
Enquête 2321	<i>mecA</i>	SASM + SCN mR	+	+	-	CONFORME
	toxines	SA-PVL-	+	-	-	CONFORME

SCN : Staphylocoque à Coagulase Négative, mS / mR : sensible / résistant à la méticilline, SASM : *S. aureus* sensible à la méticilline, SARM : *S. aureus* résistant à la méticilline, SA : *S. aureus*

4. Limite de détection (LOD)

Une souche SARM-PVL+ est passée 11 fois à 10^3 UFC/mL et à 10^4 UFC/mL.

Estimation de la LOD entre 10^3 et 10^4 UFC/mL,
CONFORME aux données de la littérature.

5. Comparaison de méthodes

46 souches cliniques : comparaison de notre PCR triplex avec les méthodes de référence.

	<i>nuc</i>	<i>mecA</i>	<i>lukS</i>	Concordance
SCN mS n=10	0	0	0	100%
SCN mR n=10	0	10	0	100%
SASM n=10	10	0	0	100%
SARM n=10	10	9	2	90%
SA-PVL+ n=6	6	2	6	100%

La seule discordance observée (SARM mais *mecA* non détecté par PCR) s'est révélée être due à une probable erreur d'utilisation de la méthode de référence.

On observe également une découverte fortuite de deux souches PVL+. La présentation clinique et l'histoire de la maladie pour ces deux patients étaient évocatrices d'une infection à SA-PVL+.

Conclusion

Après finalisation du dossier de validation de méthode, l'utilisation en routine au laboratoire de la PCR développée dans ce travail est tout à fait envisageable et permettrait d'améliorer le délai de rendu des résultats. Nous souhaiterions ensuite évaluer cette PCR directement à partir de prélèvements, dans l'optique de diminuer encore le délai de rendu des résultats et permettre ainsi une meilleure prise en charge du patient.