

RIDA® GENE MRSA

REF PG0605



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Allemagne

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le test RIDA®GENE MRSA, réalisé sur le Roche LightCycler® 480 II, est une PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de l'ADN de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et de *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SASM) dans des écouvillons nasaux/de gorge humains non traités, des écouvillons de plaie et des cultures chez des individus asymptomatiques et chez des individus présentant des signes et des symptômes d'une infection causée par SARM.

Le test RIDA®GENE MRSA est conçu pour étayer le diagnostic des infections à staphylocoques (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SASM)) chez des individus asymptomatiques et chez des individus présentant des symptômes d'infection causée par le SARM en conjonction avec d'autres résultats cliniques et de laboratoire.

Des résultats négatifs n'excluent pas une infection à staphylocoque (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SASM)) et ne doivent pas être utilisés comme seule base de diagnostic.

Ce produit est destiné à un usage professionnel.

2. Résumé et explication du test

Les staphylocoques sont répandus en tant que colonisateurs naturels de la peau et de la muqueuse de l'oropharynx chez l'homme et les animaux. Ils se divisent en staphylocoques à coagulase positive (*S. aureus*) et à coagulase négative (comme *S. epidermidis*). Le *Staphylococcus aureus* est l'un des agents pathogènes les plus importants des infections nosocomiales dans les hôpitaux et autres établissements de santé.^{1,2} L'agent pathogène est transmis par le personnel médical ou d'autres patients. On estime que 30 % de la population saine est colonisée par le *S. aureus* (porteurs asymptomatiques). Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) est l'un des agents pathogènes les plus fréquents des infections nosocomiales dans le monde (SARM acquis dans l'établissement). Outre les infections à SARM acquises dans l'établissement, il existe également des infections communautaires à SARM qui peuvent être contractées en dehors de l'hôpital.^{3,4} Ces dernières années, les infections à SARM associées au bétail sont apparues dans le contexte des animaux d'élevage, en particulier chez les éleveurs de porcs.^{5,6} La résistance de *S. aureus* à la méticilline (oxacilline) est médiée par la protéine de liaison à la pénicilline PLP2a, qui est codée par le gène chromosomique *mecA*. Le gène *mecA* est localisé sur la cassette génétique variable et instable *SCCmec* (staphylococcal cassette chromosome mec). À ce jour, 14 types de cassettes *SCCmec* ont été décrits, dont les types I à V sont les plus fréquents.^{3,7,8} La cassette *SCCmec* de type XI (*SCCmec XI*), qui contient un autre homologue de *mecA* (également appelé *mecC* ou *meCLGA251*), a été décrite pour la première fois en

2011. Le gène *mecC* n'a qu'une homologie nucléotidique de 70 % avec le gène *mecA* et n'est pas détectable à l'aide des PCR normales *spécifiques du mecA* et des tests d'agglutination du PLP2a. Il a été décrit dans des isolats de *S. aureus* issus de l'homme et du bétail.⁹

Contrairement aux infections à SASM (*Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline), les infections à SARM sont associées à une morbidité et une mortalité élevées, à des séjours hospitaliers prolongés et à des coûts de traitement plus importants.^{10,11} Les facteurs de risque d'infection à SARM dans les établissements de santé sont le contact avec des patients atteints d'une infection à SARM, des antécédents connus de SARM, la durée du séjour hospitalier et une antibiothérapie de longue durée.¹²

Chaque infection à SARM génère jusqu'à 10 000 dollars de coûts supplémentaires.¹³ Au sein de l'Union européenne, plus de 150 000 patients hospitalisés sont atteints d'une infection à SARM. Les coûts hospitaliers qui en résultent pour le système de santé européen sont estimés à 380 millions d'euros.¹⁴

Un dépistage précoce, rapide et systématique du SARM permet de traiter spécifiquement les patients infectés et de mettre en place des méthodes d'hygiène appropriées pour prévenir la transmission et la propagation du SARM.

Avec les méthodes de culture classiques, 48 à 72 heures sont nécessaires pour détecter le SARM. Les tests PCR en temps réel permettent un dépistage précoce et rapide du SARM le jour de l'admission à l'hôpital dans le cadre du programme de prévention des infections (stratégie « rechercher et éliminer »).¹⁵

3. Principe du test

RIDA[®]GENE MRSA est une PCR multiplex en temps réel pour la détection qualitative directe et la différenciation entre le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et le *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SASM) dans les échantillons de culture de nez humain et les frottis nasaux/de gorge. Après avoir isolé l'ADN, les fragments de gènes spécifiques (s'ils sont présents) du SARM (le gène *mecA/mecC*, la jonction *SCCmec/orfX* et le gène *SA442*) sont amplifiés. Les séquences cibles amplifiées sont détectées à l'aide de sondes d'hydrolyse qui sont marquées avec un extincteur à une extrémité et avec un colorant fluorescent indicateur (fluorophore) à l'autre extrémité. Les sondes s'hybrident avec l'amplicon en présence d'une séquence cible. Pendant l'extension, la **Taq-Polymerase** sépare l'indicateur de l'extincteur. L'indicateur émet un signal fluorescent qui est détecté par l'unité optique d'un dispositif de PCR en temps réel. Le signal fluorescent augmente avec la quantité d'amplicons formés. Le test RIDA[®]GENE MRSA contient **Internal Control DNA** (ICD) pour contrôler la préparation de l'échantillon et/ou toute inhibition potentielle de la PCR.

4. Contenu du paquet

Tableau 1: Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations.)

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	2x	1100 µl	Jaune
2	Taq-Polymerase	1x	11 µl	Rouge
D	Internal Control DNA	2x	1800 µl	Brun
L	Lysis Buffer 1	2x	12 ml	incolore
N	PCR Water	1x	500 µl	Blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	Bleu

5. Instructions de conservation

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -16 °C et -28 °C. S'ils ne sont pas ouverts, tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Tous les réactifs doivent être soigneusement décongelés avant leur utilisation (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- Il est possible de congeler/décongeler les produits jusqu'à 15 fois sans altérer la propriété du test (au besoin, créer des aliquotes après la première décongélation et recongeler immédiatement les réactifs).
- Refroidir correctement tous les réactifs pendant la préparation de la PCR (2 à 8 °C).

6. Réactifs requis, mais non fournis

Le test de PCR multiplex en temps réel RIDA®GENE MRSA peut être utilisé avec les instruments de PCR en temps réel suivants:

Tableau 2: Matériel nécessaire

Dispositifs de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™

Si vous devez utiliser d'autres instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse pcr@r-biopharm.de pour en vérifier la compatibilité.

- Système de prélèvement sur écouvillons stériles (p. ex., eSwab®, Copan Diagnostic Inc.)
- RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001) lors de l'utilisation avec l'appareil LightCycler® 480II
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, flacons de réaction, films)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons ou les plaques de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Agitateur chauffant
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes pour pipette dotées de filtres
- Gants jetables non poudrés
- Eau de PCR (sans nucléase)

7. Mesures de précaution

- Ce test doit uniquement être réalisé par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.
- Les instructions d'exécution du test doivent être respectées à la lettre.
- Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec les plaies et les membranes muqueuses.
- Lors de la manipulation des réactifs et des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test.
- Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons sont manipulés.
- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être effectuées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux, de même que tous les réactifs et le matériel exposés à des échantillons potentiellement infectieux, et doivent être éliminés comme il se doit.
- Éliminer le kit de test à l'échéance de la date de péremption.
- Après utilisation, les utilisateurs sont responsables de la mise au rebut appropriée de tous les réactifs et matériaux. Pour la mise au rebut, respecter les règlements nationaux.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Préparation de l'ADN à partir de frottis

La méthode d'isolement suivante est recommandée pour isoler l'ADN des écouvillons: Ajouter 200 µl de **Lysis Buffer 1** dans un flacon de préparation. Plonger l'embout de l'écouvillon dans le tampon de lyse 1 pré-pipeté et casser ou couper le bâtonnet. Lors de l'utilisation d'écouvillons avec milieu, 100 µl du milieu de l'écouvillon peuvent être ajoutés aux 200 µl de tampon de lyse et traités ensuite. Fermer hermétiquement les flacons de préparation et agiter vigoureusement pendant 60 secondes. Chauffer pendant 10 minutes à 95 °C dans un bloc chauffant tout en agitant. Centrifuger pendant 1 min à 13 000 x g et recueillir le surnageant en tant qu'échantillon.

Remarque: Recommencer si la préparation devient très opaque pendant la centrifugation.

Le test RIDA®GENE MRSA comprend un **Internal Control DNA** qui indique une éventuelle inhibition de la PCR, vérifie l'intégrité des réactifs et confirme la réussite de l'extraction d'acides nucléiques. Le **Internal Control DNA** peut être utilisé

uniquement comme un contrôle de l'inhibition ou comme un contrôle de l'extraction pour la préparation des échantillons en plus d'un contrôle de l'inhibition.

Si le **Internal Control DNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître pour chaque réaction (voir Tableau 4).

Si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en utiliser 20 µl pendant l'extraction. Le **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange échantillon/tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est recommandé de pipeter 1 µl de **Internal Control DNA** par réaction au mélange pour la PCR pour le contrôle négatif et le contrôle positif.

8.2 Préparation de l'ADN à partir d'échantillons de culture

La méthode d'isolement suivante est recommandée pour isoler l'ADN des échantillons de culture: Ajouter 200 µl de **Lysis Buffer 1** dans un flacon de préparation. À l'aide d'une anse d'inoculation, prélever plusieurs colonies et les mettre en suspension dans le tampon de lyse 1 pré-pipeté. Casser ou couper le bâtonnet de la boucle d'inoculation. Fermer hermétiquement les flacons de préparation et agiter vigoureusement pendant 60 secondes. Chauffer pendant 10 minutes à 95 °C dans un bloc chauffant tout en agitant. Centrifuger pendant 1 min à 13 000 x g et recueillir le surnageant en tant qu'échantillon.

Remarque: Recommencer si la préparation devient très opaque pendant la centrifugation.

Le test RIDA®GENE MRSA comprend un **Internal Control DNA** qui indique une éventuelle inhibition de la PCR, vérifie l'intégrité des réactifs et confirme la réussite de l'extraction d'acides nucléiques. Le **Internal Control DNA** peut être utilisé uniquement comme un contrôle de l'inhibition ou comme un contrôle de l'extraction pour la préparation des échantillons en plus d'un contrôle de l'inhibition.

Si le **Internal Control DNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître pour chaque réaction (voir Tableau 4).

Si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en utiliser 20 µl pour chaque échantillon pendant l'extraction. Le **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange échantillon/tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est recommandé de pipeter 1 µl de **Internal Control DNA** par réaction au mélange pour la PCR pour le contrôle négatif et le contrôle positif.

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions (échantillons et réactions de contrôle) nécessaires à la PCR. Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus à chaque exécution du test.

Il est recommandé d'ajouter 10 % de volume de mélange maître de plus afin de compenser la perte au pipetage (voir tableaux 3 et 4). Avant utilisation, décongeler, mélanger et centrifuger brièvement le **Reaction Mix**, le **Taq-Polymerase**, le **Positive Control**, le **PCR Water** et le **Internal Control DNA**. Toujours refroidir les réactifs correctement pendant les étapes de travail (2 °C à 8 °C).

Tableau 3: Exemple de calcul et de production du mélange maître pour 10 réactions (ICD pour extraction et contrôle de l'inhibition)

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq-Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

Tableau 4: Exemple de calcul et de production du mélange maître pour 10 réactions (ICD uniquement comme contrôle de l'inhibition)

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq-Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11,0 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (flacon/plaque).

Contrôle négatif: Ajouter 5 µl de **PCR Water** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque: Il est recommandé de pipeter 1 µl de **Internal Control DNA** dans le mélange pour PCR pour le contrôle négatif lorsque celui-ci est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition.

Échantillons: Ajouter 5 µl d'éluat au mélange maître pipeté au préalable.

Contrôle positif: Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque: Il est recommandé de pipeter 1 µl de **Internal Control DNA** dans le mélange pour PCR pour le contrôle positif lorsque celui-ci est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition.

Fermer hermétiquement les flacons ou les plaques de réaction, les centrifuger brièvement à faible vitesse et les transférer vers un dispositif de PCR en temps réel. Démarrer la PCR selon la configuration de l'instrument de PCR (voir Tableaux 5 et 6).

9.3 Configuration du dispositif de PCR

9.3.1 Profil de PCR en temps réel de l'ADN

Tableau 5: Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour le LightCycler® 480II

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
PCR Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ vitesse de montée de température	Durée de conservation

Remarque: L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 6: Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour Mx3005P, ABI 7500 et CFX96™

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ vitesse de montée de température	Durée de conservation

Remarque: L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

9.4 Réglage du canal de détection

Tableau 7: Sélection des canaux de détection adéquats

Dispositif de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Commentaire
Roche LightCycler® 480 II	Jonction SCCmec/orfX	465/510	Le kit RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001) est nécessaire.
	ICD	533/580	
	SA442 (<i>S.aureus</i>)	533/610	
	mecA/mecC	618/660	
Agilent Technologies Mx3005P	Jonction SCCmec/orfX	FAM	Régler le colorant de référence sur aucun.
	ICD	HEX	
	SA442 (<i>S.aureus</i>)	ROX	
	mecA/mecC	Cy5	
ABI 7500	Jonction SCCmec/orfX	FAM	Régler le colorant de référence passif ROX sur aucun.
	ICD	VIC	
	SA442 (<i>S.aureus</i>)	ROX	
	mecA/mecC	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	Jonction SCCmec/orfX	FAM	-
	ICD	VIC	
	SA442 (<i>S.aureus</i>)	ROX	
	mecA/mecC	Cy5	

10. Contrôle qualité

Les échantillons sont évalués à l'aide du logiciel d'analyse du dispositif de PCR en temps réel correspondant conformément aux instructions du fabricant. Les contrôles négatif et positif doivent afficher des résultats corrects (voir Tableau 8, Figures 1, 2 et 3).

Le contrôle positif **Positive Control** possède une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque analyse par PCR utilise une quantité totale de 5×10^3 copies.

Tableau 8: Pour être valide, une exécution de PCR doit remplir les conditions suivantes:

Échantillon	Résultat	Ct ICD	Gène Ct cible
Contrôle positif	Positif	SO *1	Voir Certificate of Analysis
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	Non détectable

**1 Aucune valeur de Ct n'est requise pour obtenir un résultat positif de l'ICD pour le contrôle positif.*

Les contrôles positif et négatif sont valides lorsqu'ils satisfont les conditions indiquées dans le tableau. La plage de Ct pour le contrôle positif est indiquée dans le Certificat d'assurance qualité inclus avec le produit. Si l'un des deux contrôles ne satisfait pas les conditions pour valider une analyse, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées, y compris les contrôles.

Si les valeurs spécifiées ne sont pas obtenues, vérifier les points suivants avant de renouveler le test:

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé
- Réalisation correcte du test

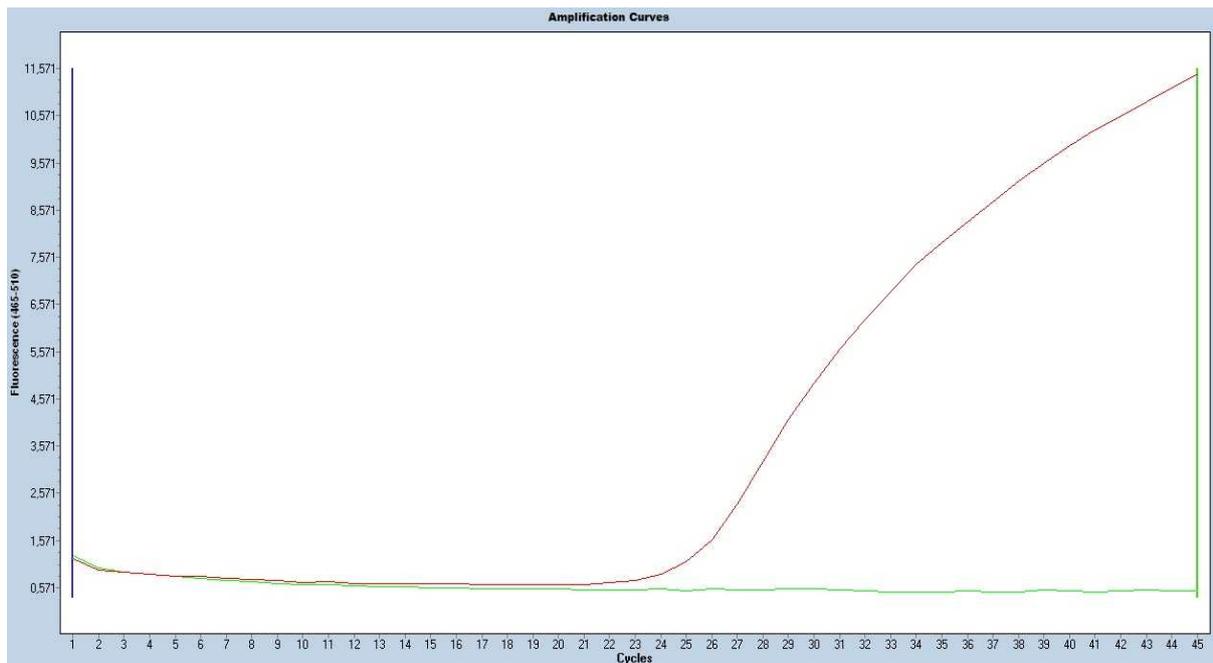


Figure 1: Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (jonction SCCmec / orfX) sur le LightCycler® 480II

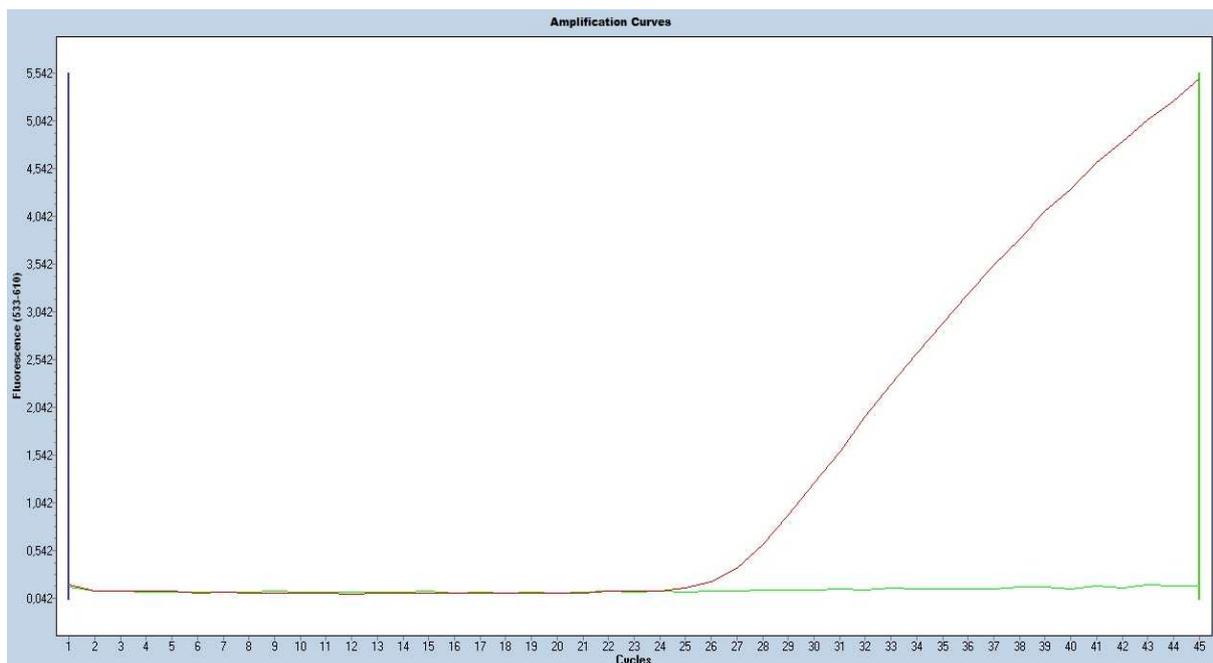


Figure 2: Exécution correcte des contrôles SA442 positif (rouge) et négatif (vert) (SA442 (S.aureus)) sur le LightCycler® 480II

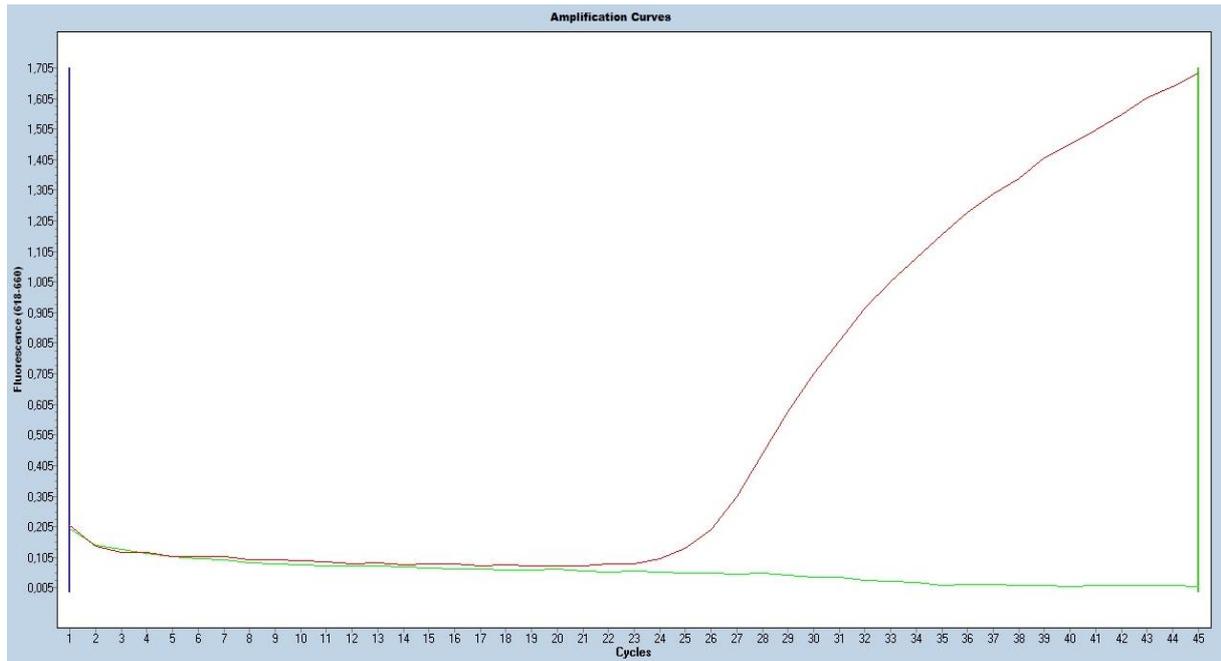


Figure 3: Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (mecA/mecC) sur le LightCycler® 480II

11. Interprétation des échantillons

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 9.

Tableau 9: Interprétation des échantillons

Détection			ICD	Résultat
Jonction SCCmec/orfX	SA442 (<i>S.aureus</i>)	mecA/mecC		
positif	positif	positif	positif / négatif	SARM* détectable (voir Limites de la méthode au point 8)
positif	positif	négatif	positif / négatif	SARM non détectable ; SASM** détectable (voir Limites de la méthode au point 7)
négatif	positif	négatif	positif / négatif	SASM détectable
négatif	négatif	positif	positif / négatif	SARM non détectable (voir Limites de la méthode au point 9)
négatif	positif	positif	positif / négatif	SARM non détectable ; SASM détectable (voir Limites de la méthode au point 8)
positif	négatif	positif	positif / négatif	SARM non détectable (voir Limites de la méthode au point 7)
négatif	négatif	négatif	positif	Gène cible non détectable
négatif	négatif	négatif	négatif	Non valide
positif	négatif	négatif	positif / négatif	Ni le SARM ni le SASM ne sont détectables (voir les limites de la méthode au point 7)

* SARM = *S. aureus* résistant à la méticilline

** SASM = *S. aureus* sensible à la méticilline

Un échantillon est estimé positif si l'ADN de l'échantillon et le Internal Control DNA présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Un échantillon est aussi estimé positif si l'ADN de l'échantillon présente un signal d'amplification, mais que le signal d'amplification n'est pas présent dans le système de détection pour le Internal Control DNA. La détection du Internal Control DNA n'est

pas indispensable dans ce cas, car les concentrations élevées d'amplicons peuvent provoquer un signal faible ou absent du Internal Control DNA.

Un échantillon est estimé négatif si l'ADN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification, mais en présente un pour le Internal Control DNA dans le système de détection. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection du Internal Control DNA.

Un échantillon est non valide si l'ADN de l'échantillon et le Internal Control DNA ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. Des inhibiteurs de la PCR sont présents dans l'échantillon ou une erreur est survenue pendant le processus d'extraction. L'échantillon extrait doit être dilué selon un rapport 1:10 avec de l'eau de PCR et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

12. Limites de la méthode

1. Ce test ne convient qu'aux échantillons d'écouvillonnage et de culture décrits.
2. Un prélèvement, échantillonnage, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique du test peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
3. L'utilisation de méthodes de dépistage du SARM basées sur la PCR est soumise à des directives spécifiques à chaque pays. L'utilisateur est responsable de l'utilisation et de la mise en œuvre de ces directives. Par exemple, selon KRINKO en Allemagne, les méthodes de dépistage basées sur la PCR doivent être considérées comme provisoires jusqu'à ce que les résultats définitifs de la culture soient obtenus. Elles peuvent néanmoins servir de base provisoire à une politique d'hygiène hospitalière.
4. Dans la littérature, 14 types de SCCmec sont décrits. La PCR multiplex en temps réel RIDA®GENE MRSA peut détecter les SCCmec de types I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, X et XI. RIDA®GENE MRSA peut ne pas détecter d'autres types de SCCmec et peut présenter des résultats négatifs.
5. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut empêcher l'évaluation des résultats.
6. Des mutations ou polymorphismes au niveau des sites de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants ou de variants inconnus et entraîner des résultats faux négatifs avec le test RIDA®GENE MRSA.
7. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* basés sur la PCR, des concentrations extrêmement faibles des séquences cibles sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectées, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
8. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Un résultat positif indique l'existence des gènes cibles

correspondants (le gène *mecA/mecC*, la jonction *SCCmec/orfX* et le gène *SA442*).

9. Il se peut qu'un signal ne se produise pas dans tous les canaux pour les échantillons LD, même avec un échantillon qui est positif au SARM.
10. Compte tenu de la mise en évidence du gène de résistance, il peut exister une infection mixte de SASM (*S. aureus* sensible à la méticilline) et de SCN (staphylocoques à coagulation négative).
11. Si seul le gène de résistance *mecA/mecC* est détecté, le SARM n'est pas détectable. Cependant, si le gène de résistance est détecté, il peut également y avoir une infection par un staphylocoque à coagulase négative puisqu'il peut également posséder le gène de résistance *mecA/mecC*.
12. À une concentration testée de 2,1 % et plus, le bain de bouche ProntOral (polyhexaméthylène biguanide) présente un effet inhibiteur.
13. À une concentration testée de 2,1 % et plus, le gel nasal Prontoderm (polyhexaméthylène biguanide) présente un effet inhibiteur.
14. À une concentration testée de 1,5 % et plus, le sang humain présente un effet inhibiteur.
15. A partir d'une quantité testée de 6 mg, la gélose COS a un effet inhibiteur.

13. Performances

13.1 Sensibilité analytique

La PCR multiplex en temps réel RIDA®GENE MRSA possède une limite de détection de ≥ 10 copies d'ADN/réactions pour la jonction SCCmec/orfX, le gène mecA/mecC et le gène SA442 (*S. aureus*).

Les figures 4, 5, 6 et 7 ci-dessous montrent des séries de dilution de la jonction SCCmec/orfX, du gène mecA/mecC et du gène SA442 (*S. aureus*)

(Dans chaque cas, 10^5 à 10^1 copies d'ADN/ μ l) avec le LightCycler 480II.

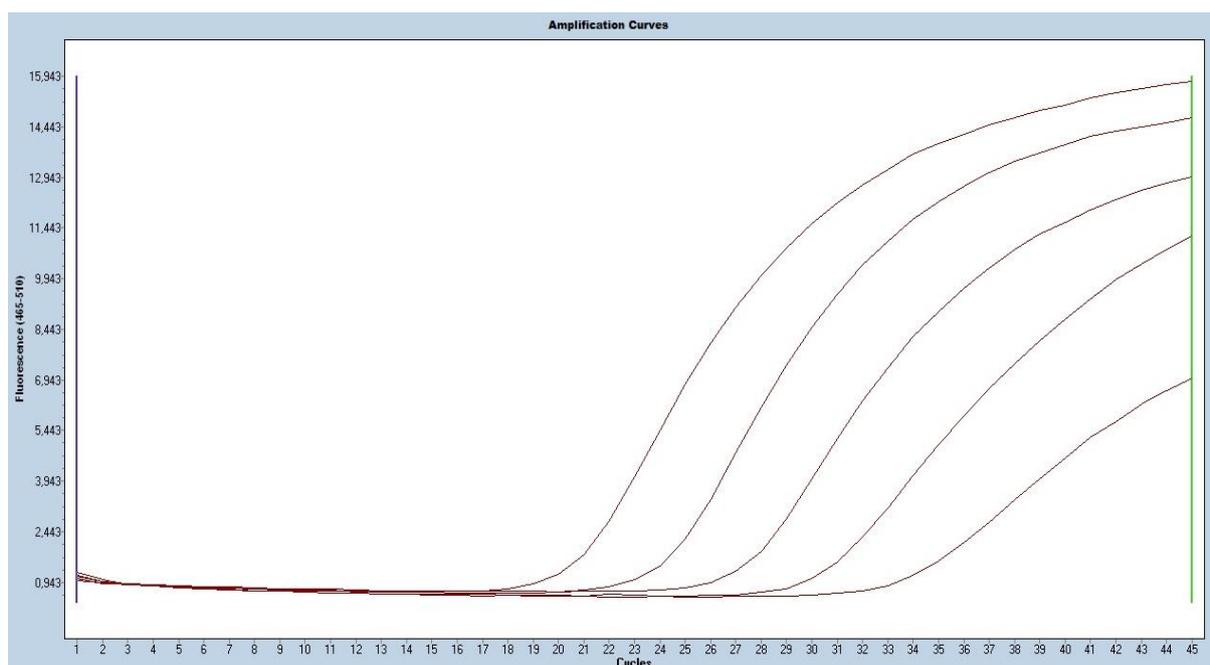


Figure 4: Série de dilutions pour la jonction SCCmec/orfX (10^5 à 10^1 copies d'ADN/ μ l) avec le LightCycler® 480II

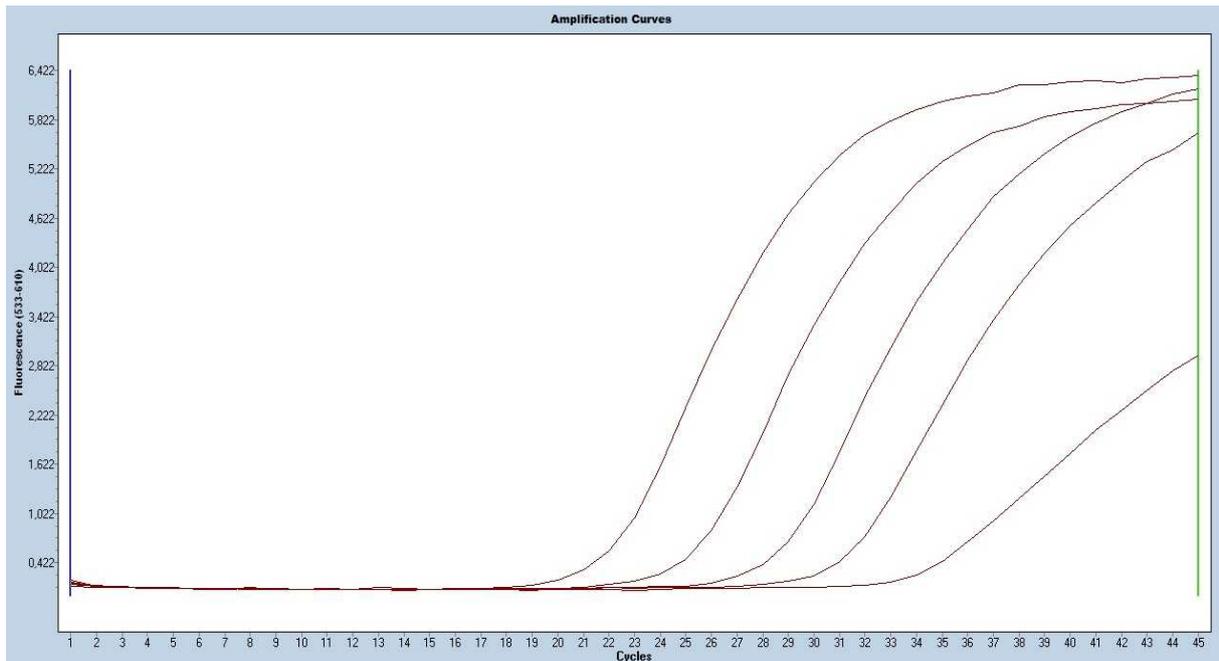


Figure 5: Série de dilutions du gène SA442 spécifique de *S. aureus* (10^5 - 10^1 copies d'ADN/ μ l) avec le LightCycler® 480II

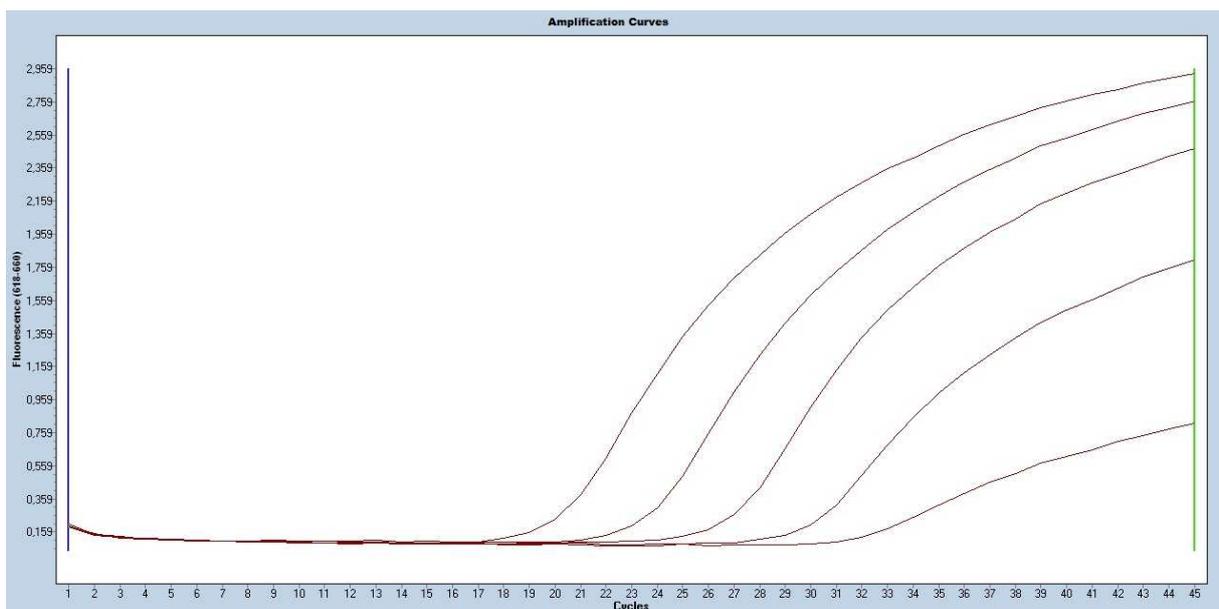


Figure 6: Série de dilutions pour le gène *mecA/mecC* (10^5 à 10^1 copies d'ADN/ μ l) avec le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble du processus dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ADN et de la teneur en ADN.

13.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique des tests RIDA®GENE MRSA a été évaluée en utilisant un panel d'espèces de non-staphylocoques, de staphylocoques à coagulase négative sensibles à la méticilline (SCNSM) et de staphylocoques à coagulase négative résistants à la méticilline (SCNRM). Aucune réactivité croisée avec les espèces suivantes n'a été détectée (voir tableau 10):

Tableau 10: Test de la réactivité croisée

Espèces non staphylococciques					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Acinetobacter iwofii</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>		<i>Candida glabrata</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>E. coli (O157:H7)</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	<i>Streptococcus mitis</i>	-	<i>Streptococcus mutans</i>	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-		
Staphylocoques à coagulase négative sensibles à la méticilline					
<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. hominis</i>	-	<i>S. warneri</i>	-
Staphylocoques coagulase-négatifs résistants à la méticilline					
<i>S. haemolyticus</i>	-	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>	-

13.3. Substances interférentes

La présence d'inhibiteurs de la RT-PCR et de substances interférentes peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides. En conséquence, on a étudié les effets de diverses substances qui peuvent exister compte tenu de leur utilisation répandue pour les infections respiratoires, ou de leur existence répandue dans les échantillons correspondants. Des effets inhibiteurs aux concentrations testées ont été observés (voir Limites de la méthode) pour le bain de bouche ProntOral (lpolyhexaméthylène biguanide), le sang humain, le gel nasal Prontoderm (polyhexaméthylène biguanide) et la gélose COS. Aucune interférence n'a été identifiée pour les autres substances énumérées (tableaux 11 et 12):

Tableau 11: Liste des substances et concentrations utilisées lors du test (frottis)

Substance/additif	Concentration
RatioAllerg (dipropionate de béclométhasone)	10,0% (v/v)
Gel nasal Octenisan (dichlorhydrate d'octénidine)	7,0% (p/v)
Mucine	5,0% (v/v)
Acyclovir (pommade)	0,5 % (p/v)
InfectoPyoderm (Mupirocine)	1,80 % (p/v)
Tobramycine	0,0004 % (p/v)
FeniHydrocort (hydrocortisone)	7,0 % (p/v)

Tableau 12: Liste des substances et concentrations utilisées lors du test (culture)

Substance/additif	Concentration
Gélose au SARM	20 mg

14. Historique des versions

Numéro de version	Section et désignation
2020-11-17	Version précédente
2022-07-21	Révision générale: 1. Application 6. Réactifs requis, mais non fournis 9.4 Réglage du canal de détection 10. Contrôle qualité
2023-03-21	5. Instructions de conservation des réactifs

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour usage diagnostique <i>in vitro</i>
	Consulter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

Reaction Mix

Taq-Polymerase

Internal Control DNA

PCR Water

Positive Control

Lysis Buffer 1

16. Bibliographie

1. Dulon M et al. MRSA prevalence in european healthcare settings: a review. *BMC Infectious Diseases* 2011, 11:138.
2. Köck R et al. The Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 2011, 108(45): 761-7.
3. Robert Koch Institut. *Staphylokokken (MRSA)*. RKI-Ratgeber für Ärzte 2009.
4. Kuehnert MJ et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization in the United States, 2001–2002. *JID* 2006, 193: 172-179.
5. Golding GR et al. Livestock-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 in Humans, Canada. *EID* 2010, 16(4): 587-594.
6. RKI 2011. Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2010. *Epid. Bull.* 26.
7. International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements 2011. http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html.
8. Meng, X et al. Rapid Detection of *mecA* and *femA* Genes by Loop-Mediated Isothermal Amplification in a Microfluidic System for Discrimination of Different Staphylococcal Species and Prediction of Methicillin Resistance. *Frontiers in microbiology*. 2020, 11. Jg.
9. García-Álvarez, L et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2011, 11: 595–603.
10. Cosgrove SE et al. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2003, 36(1):53-59.
11. Cosgrove SE et al. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2005, 26(2):166-174.
12. Jerningan JA et al. Prevalence of and Risk Factors for Colonization with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* at the Time of Hospital Admission. *Infect Control and Hosp Epidemiol*. 2003, 24 (6): 409-414.
13. Diller R et al. Evidence for cost reduction based on pre-admission MRSA screening in general surgery *Int J Hyg Environ Health* 2008; 211 (1-2): 205-212.
14. Köck R, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill*. 2010, 15(41):19688.
15. Robicsek A et al. Universal Surveillance for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in 3 Affiliated Hospitals. *Ann Intern Med*. 2008, 148(6):409-418.