

BIO MED 2024

LES JOURNÉES POUR L'AVENIR DE LA BIOLOGIE MÉDICALE

JEUDI 23 &
VENDREDI 24
MAI 2024

Mise en place d'une PCR triplex en temps réel
pour la détection de *Staphylococcus aureus* :
nuc, *mecA* et Leucocidine de Panton Valentine

Pauline Voisin
Interne en Biologie médicale
CHU Amiens-Picardie

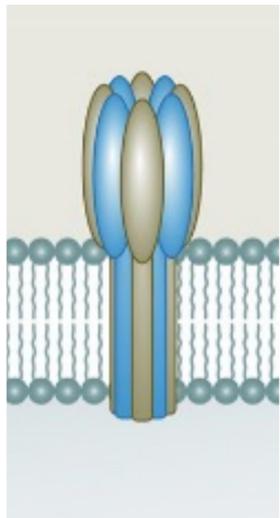


Introduction

Leucocidine de Panton Valentine

2 à 5% des souches
de *S. aureus*

D'après Kuehnert et al., 2006



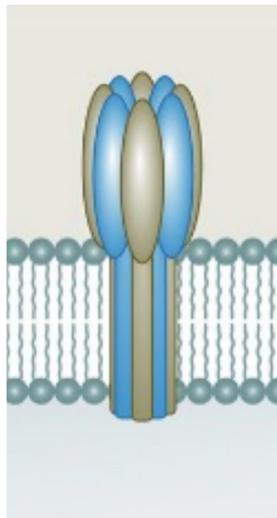
D'après Whitby et al.

Introduction

Leucocidine de Panton Valentine

2 à 5% des souches de *S. aureus*

D'après Kuehnert et al., 2006



D'après Whitby et al.

CLINIQUE

Infections de la peau et des tissus mous



D'après Shallcross et al., 2013



Pneumonie hémorragique nécrosante

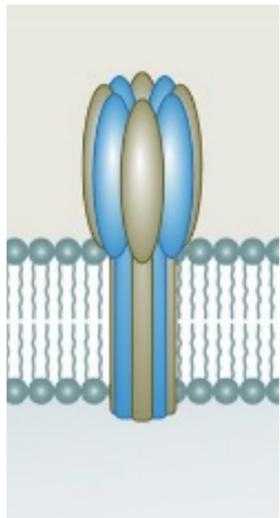
D'après Gillet et al., 2002

Introduction

Leucocidine de Panton Valentine

2 à 5% des souches de *S. aureus*

D'après Kuehnert et al., 2006



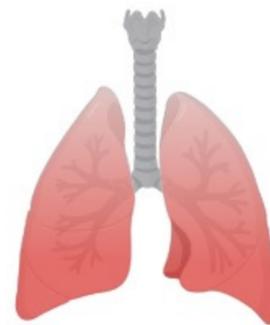
D'après Whitby et al.

CLINIQUE

Infections de la peau et des tissus mous



D'après Shallcross et al., 2013



Pneumonie hémorragique nécrosante

D'après Gillet et al., 2002

DIAGNOSTIC

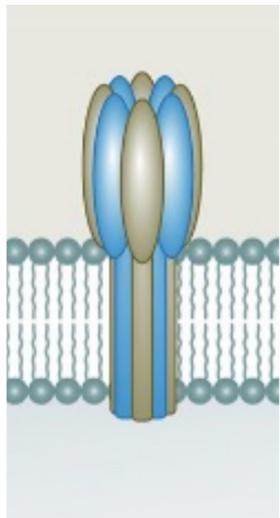


Introduction

Leucocidine de Panton Valentine

2 à 5% des souches de *S. aureus*

D'après Kuehnert et al., 2006



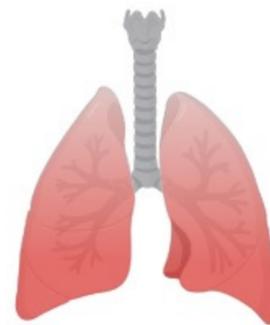
D'après Whitby et al.

CLINIQUE

Infections de la peau et des tissus mous



D'après Shallcross et al., 2013



Pneumonie hémorragique nécrosante

D'après Gillet et al., 2002

DIAGNOSTIC



TRAITEMENT

Anti-toxinique :

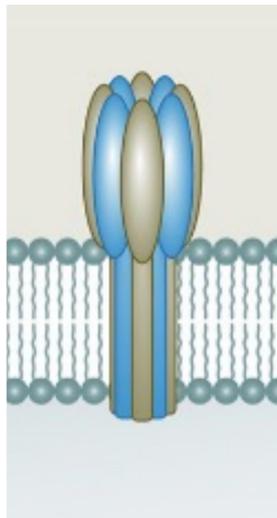
- Clindamycine
- Linézolide

Introduction

Leucocidine de Panton Valentine

2 à 5% des souches de *S. aureus*

D'après Kuehnert et al., 2006



D'après Whitby et al.

CLINIQUE

Infections de la peau et des tissus mous



D'après Shallcross et al., 2013



Pneumonie hémorragique nécrosante

D'après Gillet et al., 2002

DIAGNOSTIC

Recherche par **PCR** du gène *lukS* ou *lukF*



TRAITEMENT

Anti-toxinique :

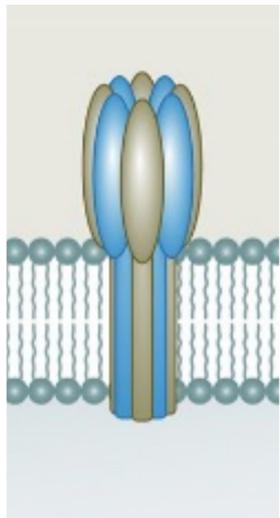
- Clindamycine
- Linézolide

Introduction

Leucocidine de Panton Valentine

2 à 5% des souches de *S. aureus*

D'après Kuehnert et al., 2006



D'après Whitby et al.

CLINIQUE

Infections de la peau et des tissus mous



D'après Shallcross et al., 2013



Pneumonie hémorragique nécrosante

D'après Gillet et al., 2002

DIAGNOSTIC

Recherche par **PCR** du gène *lukS* ou *lukF*



TRAITEMENT

Anti-toxinique :

- Clindamycine
- Linézolide

STAPHYLOCOQUES
Centre National de Référence

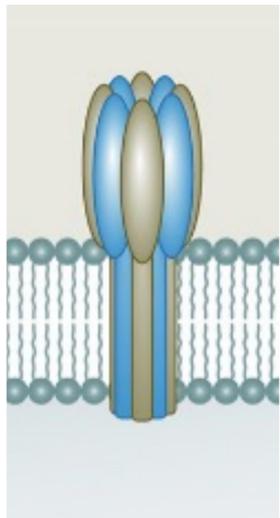
+ : 9 jours
- : 24 jours

Introduction

Leucocidine de Panton Valentine

2 à 5% des souches de *S. aureus*

D'après Kuehnert et al., 2006



D'après Whitby et al.

CLINIQUE

Infections de la peau et des tissus mous



D'après Shallcross et al., 2013



Pneumonie hémorragique nécrosante

D'après Gillet et al., 2002

DIAGNOSTIC

Recherche par PCR du gène *lukS* ou *lukF*



TRAITEMENT

Anti-toxinique :

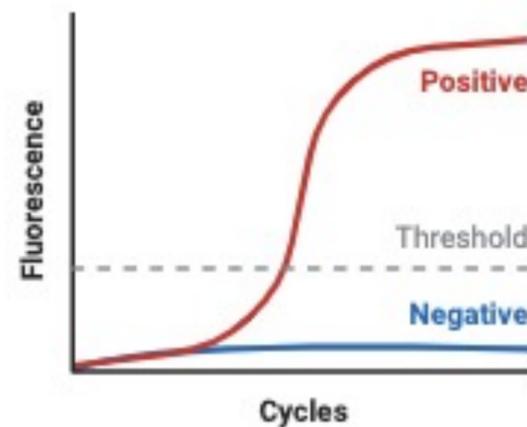
- Clindamycine
- Linézolide

STAPHYLOCOQUES
Centre National de Référence

+ : 9 jours
- : 24 jours

1. Mise en place d'une PCR triplex sur souche

pour la détection de *Staphylococcus aureus* → *nuc*
caractériser sa résistance à la méticilline → *mecA*
la production de PVL → *lukS*



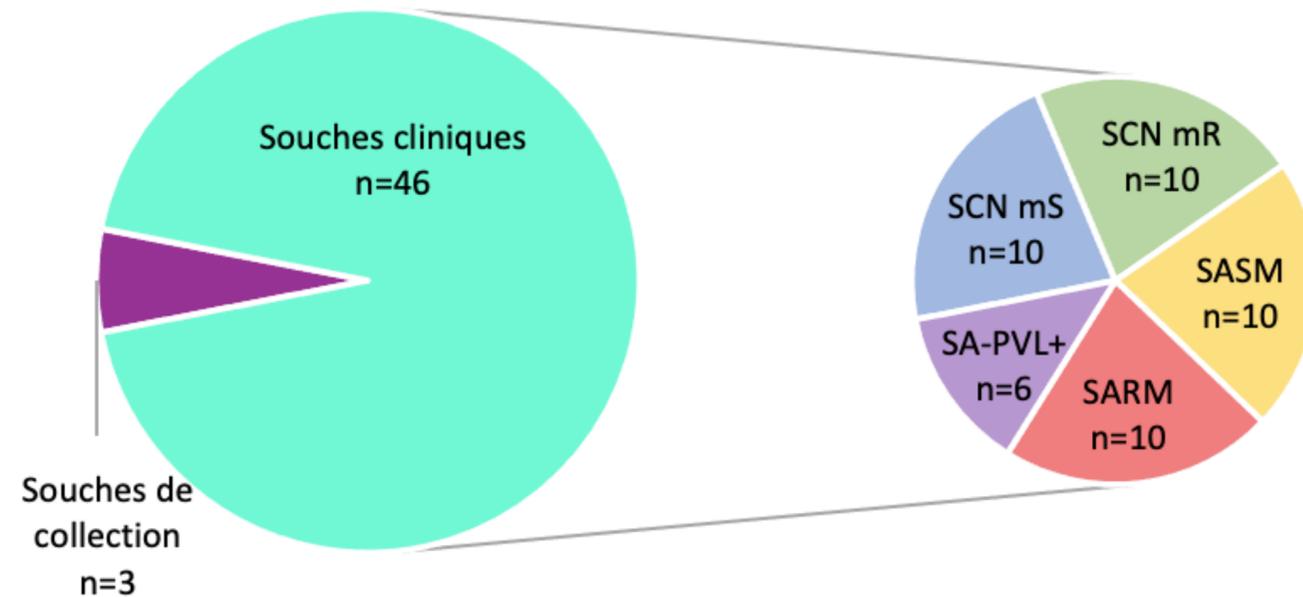
2. Validation de méthode

Pour une application en routine au sein
du laboratoire de Bactériologie
du **CHU Amiens Picardie**

- Fidélité intermédiaire
- Contamination
- Exactitude
- Limite de détection
- Comparaison de méthodes



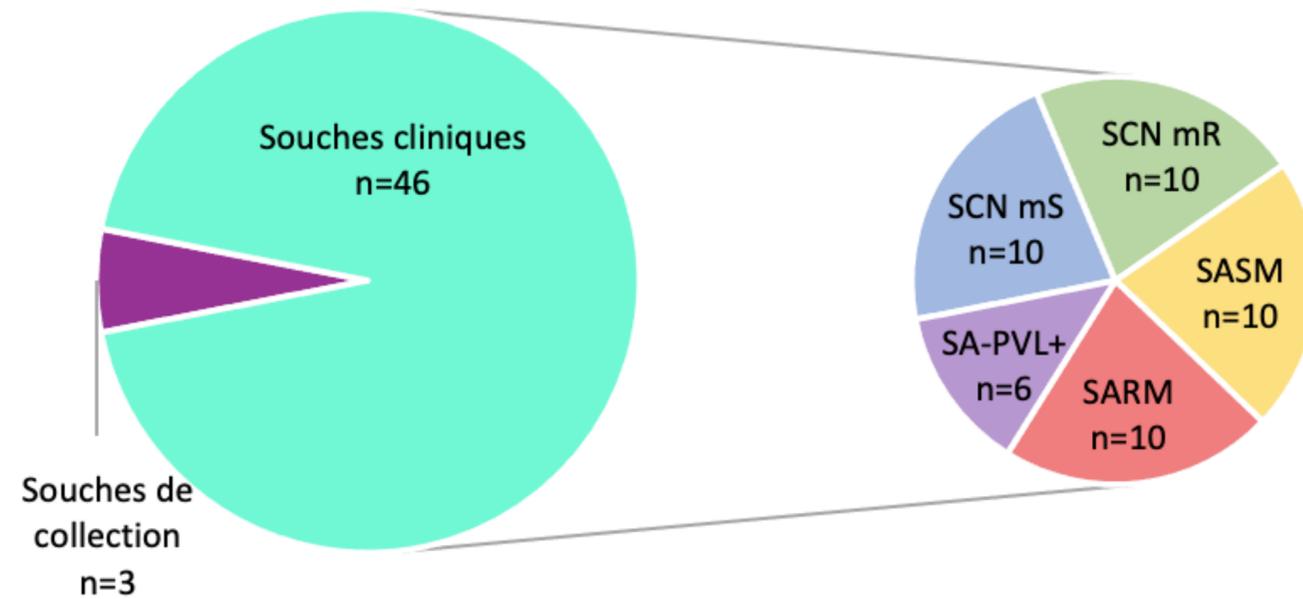
Souches bactériennes et méthodes de référence



Souche n°49 :
SARM-PVL+
nuc + , *mecA* + , *lukS* +

SCN mS : Staphylocoque à coagulase négative sensible à la métiline
SCN mR : Staphylocoque à coagulase négative résistante à la métiline
SASM : *S. aureus* sensible à la métiline
SARM : *S. aureus* résistante à la métiline
SA-PVL+ : *S. aureus* producteur de PVL

Souches bactériennes et méthodes de référence

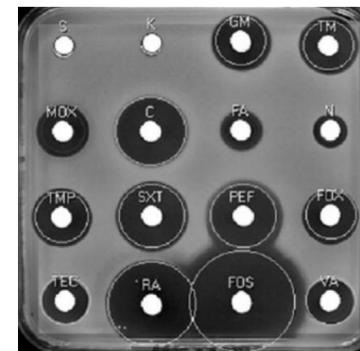


Identification



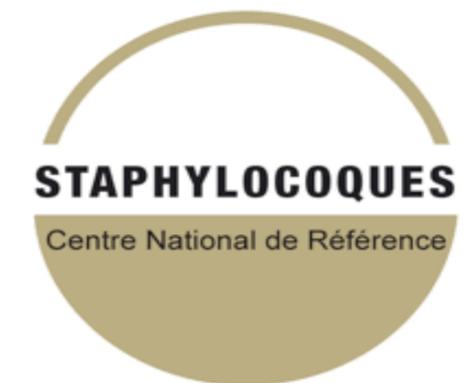
MALDI-ToF

Étude de la sensibilité à la méticilline



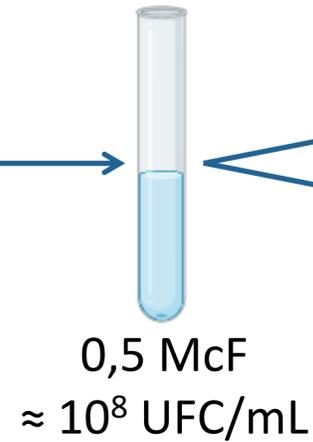
D'après CASFM - 2022

PVL



Mise au point de la PCR

1. Extraction



Extraction automatisée
Emag®



Extraction manuelle
Thermolyse

2. Amplification

PCR en point final

→ Spécificité des amorces

→ **nuc** : Pichon *et al.*, Galia *et al.*, Gadsby *et al.*

→ **mecA** : Pichon *et al.*

→ **lukS** : Pichon *et al.*

PCR en temps réel

→ Triplex

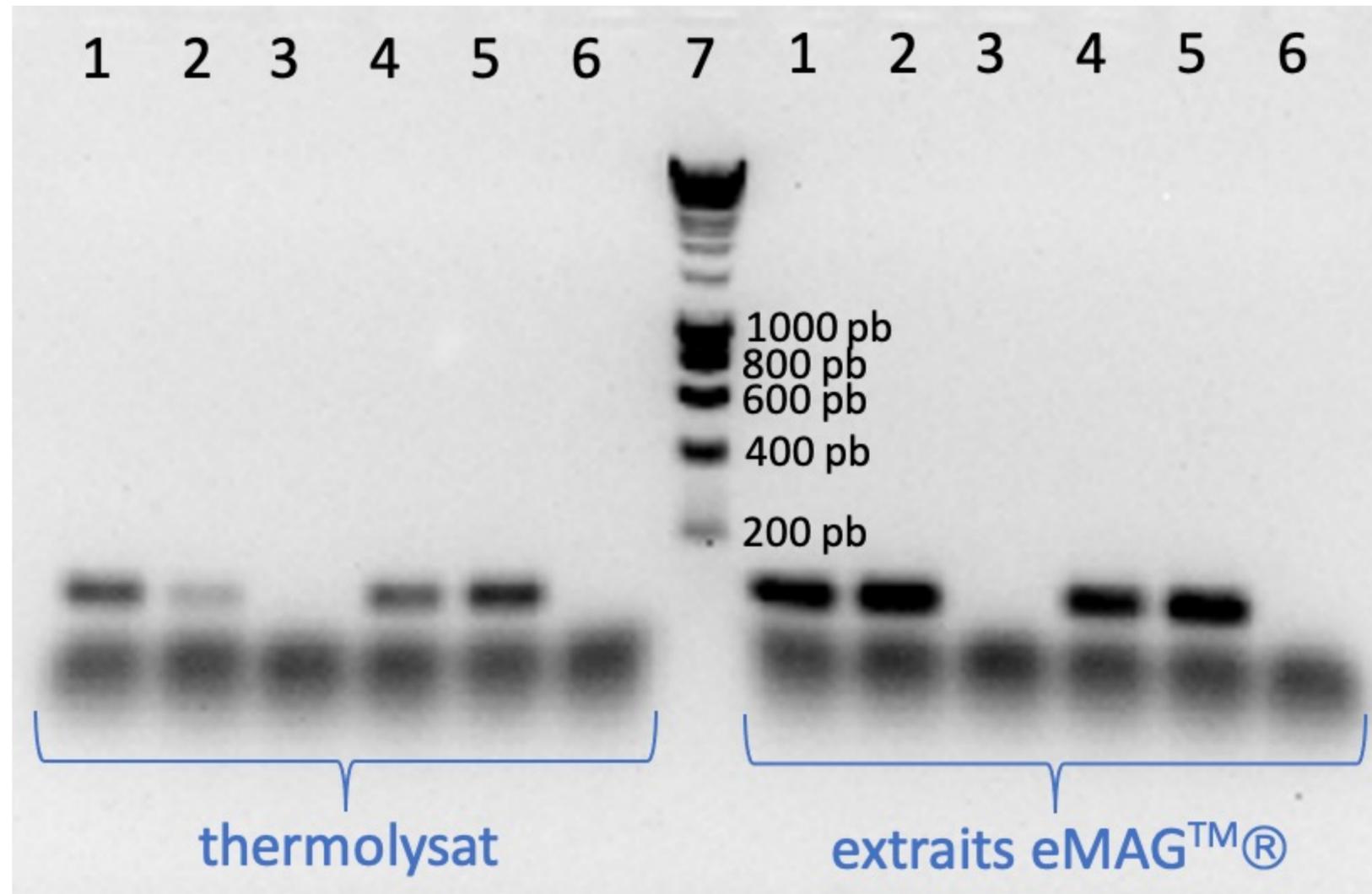
→ Seuil de fluorescence (ΔRn)

$$E = 10^{-\left(\frac{1}{n}\right)} - 1$$

n : pente de la courbe de calibration

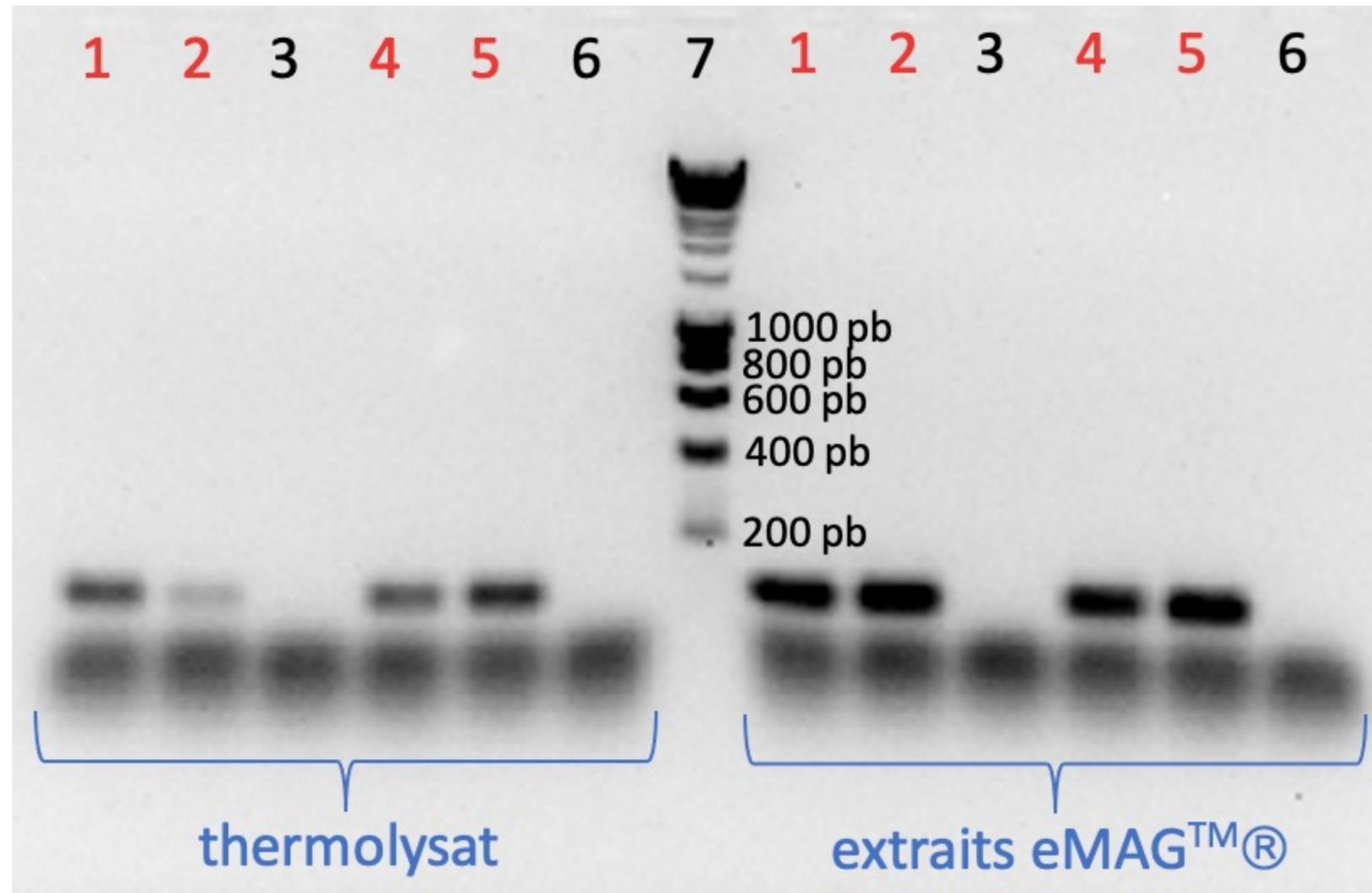
3. Validation de méthode

Choix de la méthode d'extraction



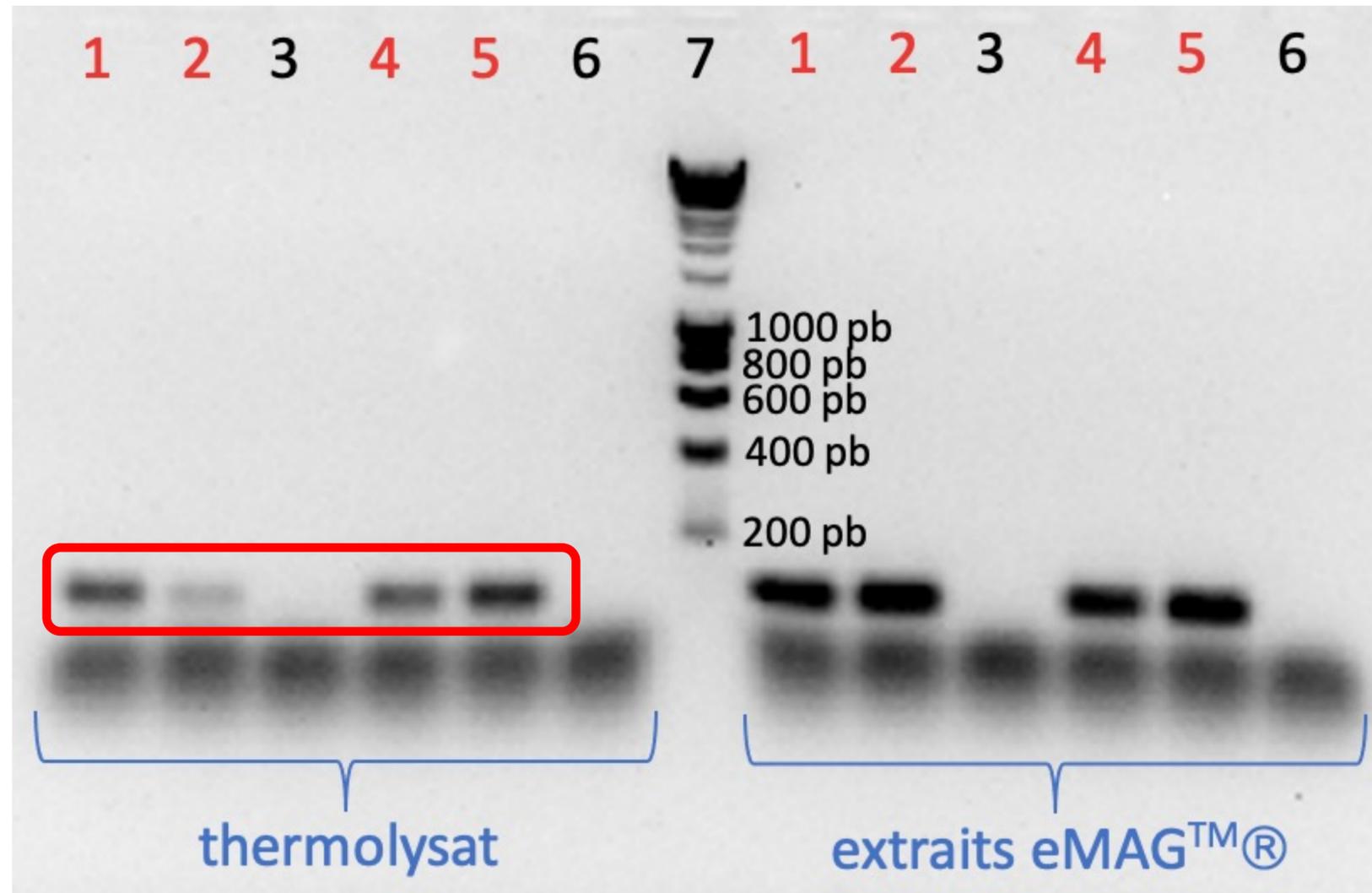
- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 5 : SARM (souche n°24)
- 6 : eau
- 7 : marqueur de poids moléculaire

Choix de la méthode d'extraction



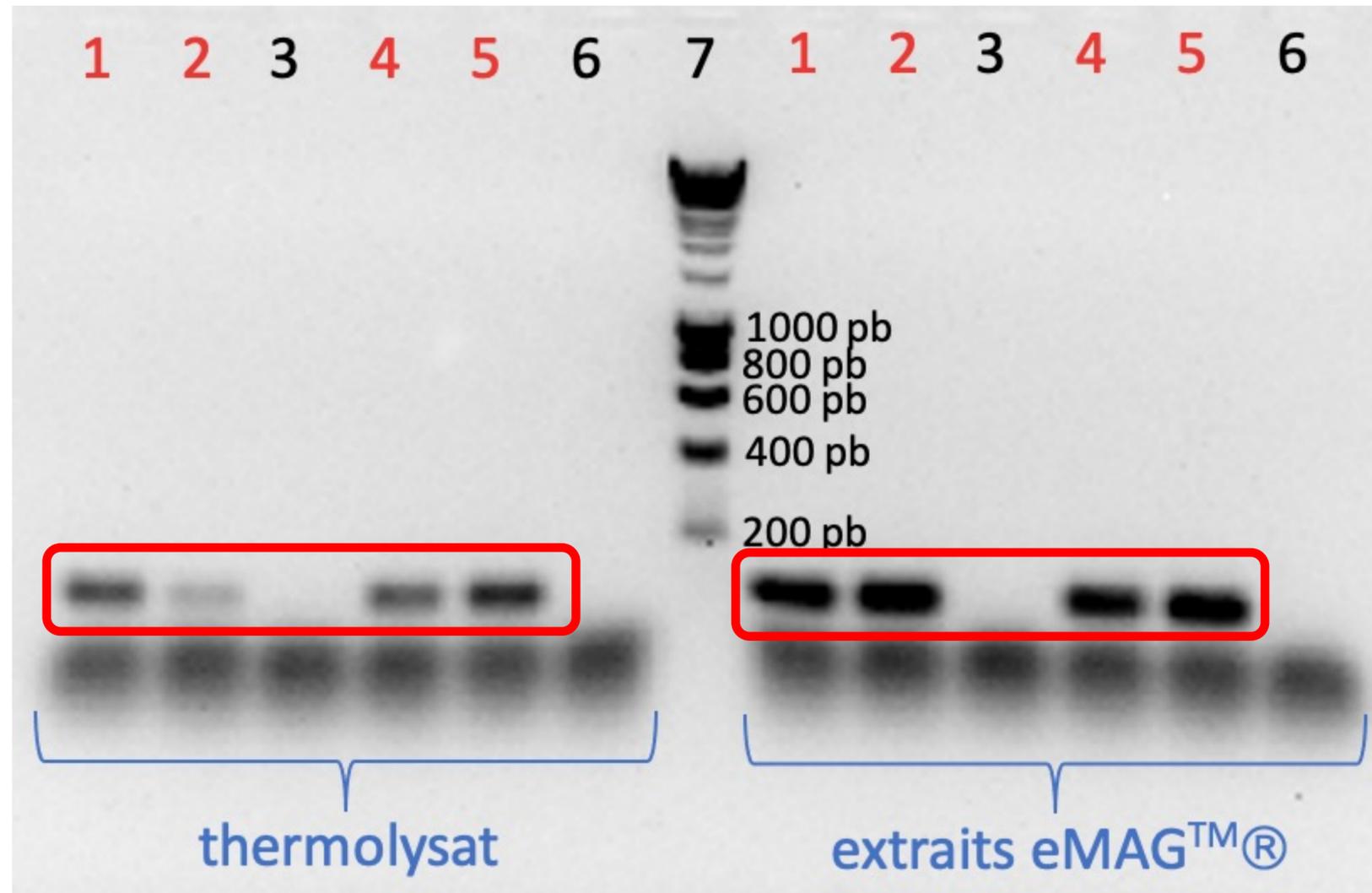
- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 5 : SARM (souche n°24)
- 6 : eau
- 7 : marqueur de poids moléculaire

Choix de la méthode d'extraction



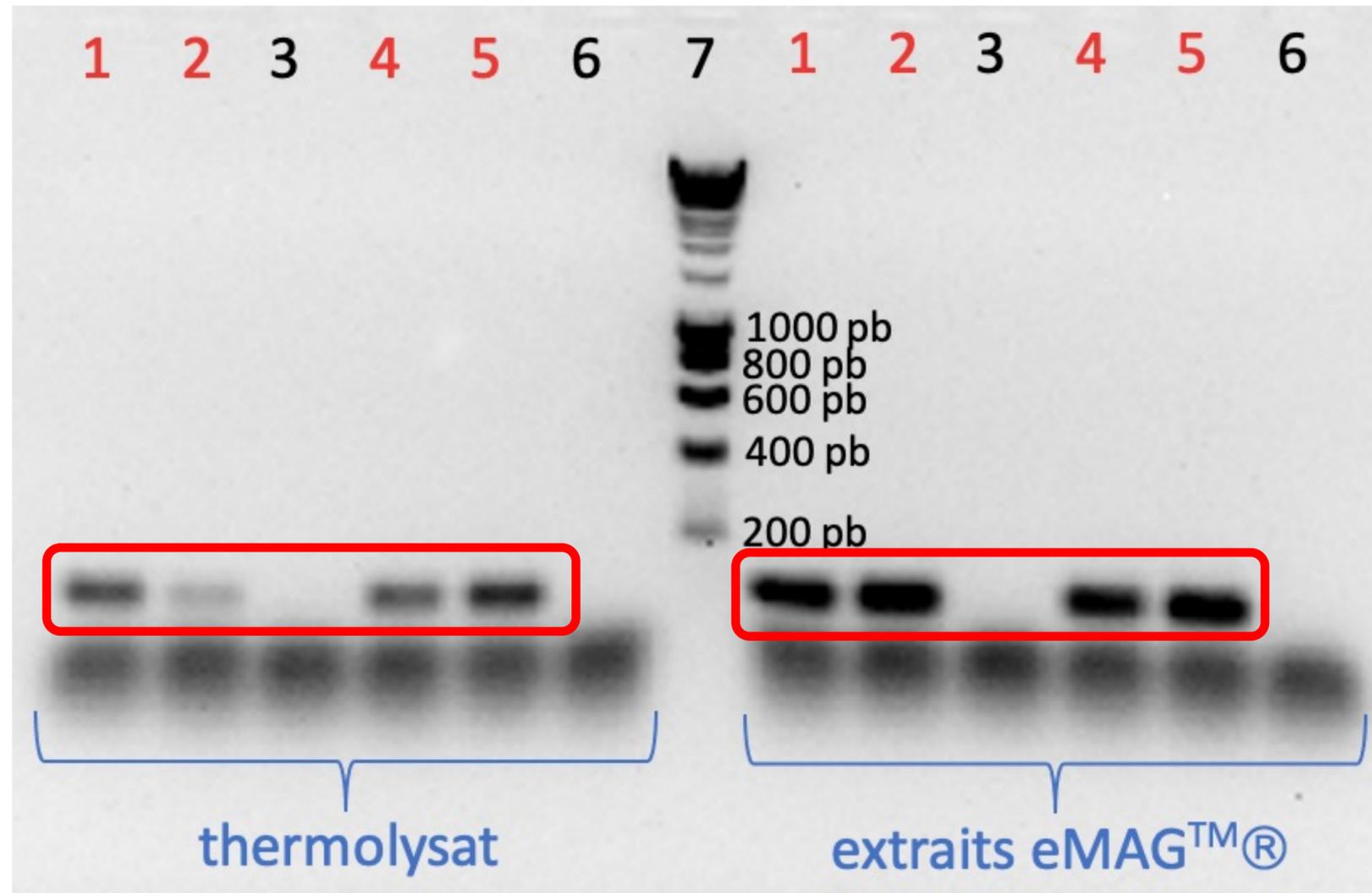
- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 5 : SARM (souche n°24)
- 6 : eau
- 7 : marqueur de poids moléculaire

Choix de la méthode d'extraction



- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 5 : SARM (souche n°24)
- 6 : eau
- 7 : marqueur de poids moléculaire

Choix de la méthode d'extraction

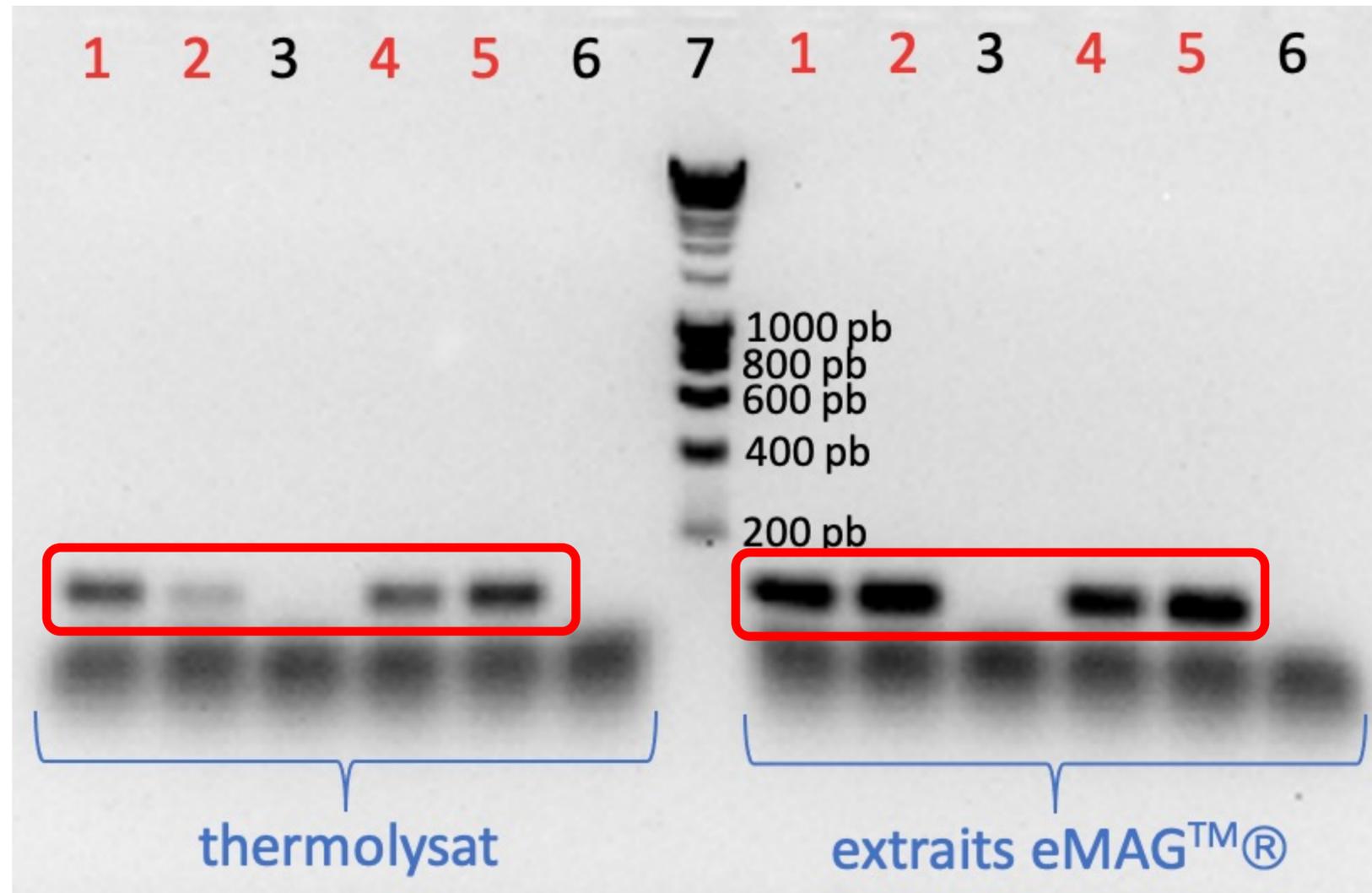


- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 5 : SARM (souche n°24)
- 6 : eau
- 7 : marqueur de poids moléculaire



Bandes plus nettes et plus intenses pour les extraits eMAG™®

Choix de la méthode d'extraction



- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 5 : SARM (souche n°24)
- 6 : eau
- 7 : marqueur de poids moléculaire

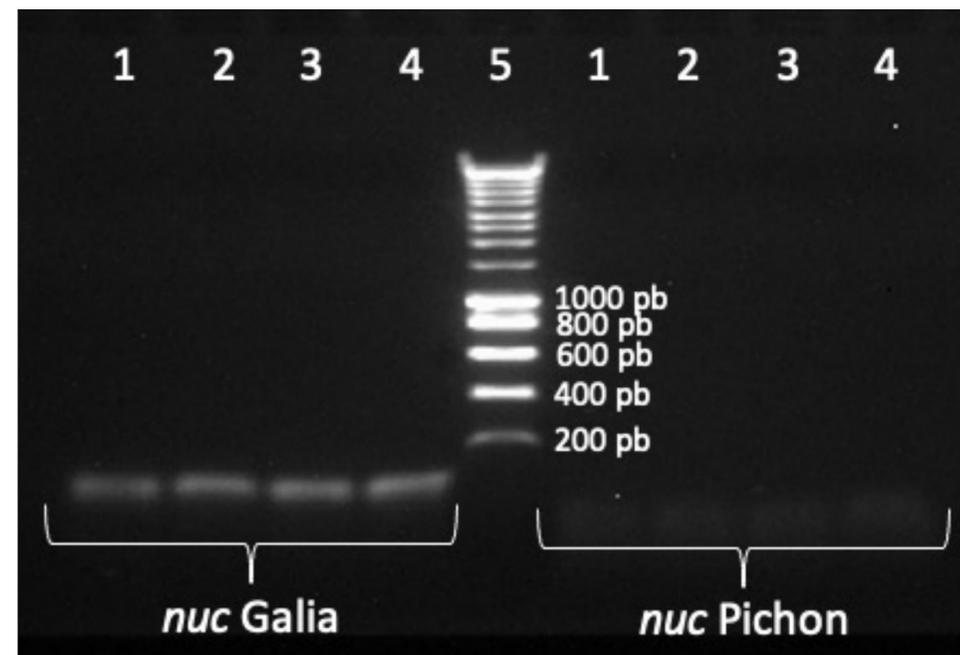


Bandes plus nettes et plus intenses pour les extraits eMAG™®

Choix en accord avec
la littérature (Pichon *et al.*,
Galia *et al.*, Renwivk *et al.*)

PCR en point final

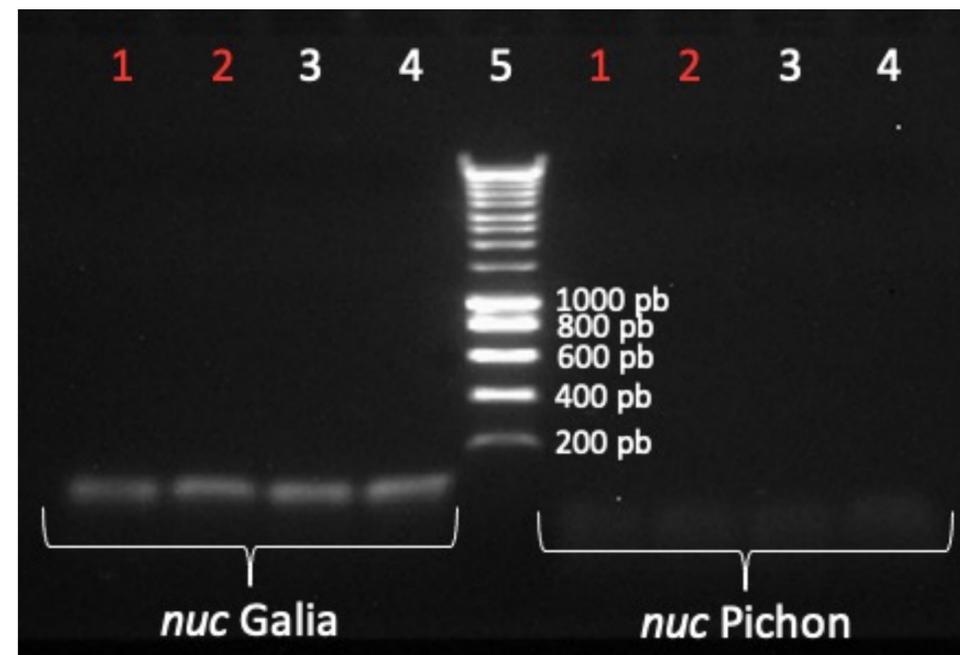
Gène *nuc*



- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : eau
- 5 : marqueur de poids moléculaire

PCR en point final

Gène *nuc*



1 : SASM (CIP 103429)

2 : SARM (CIP 110856)

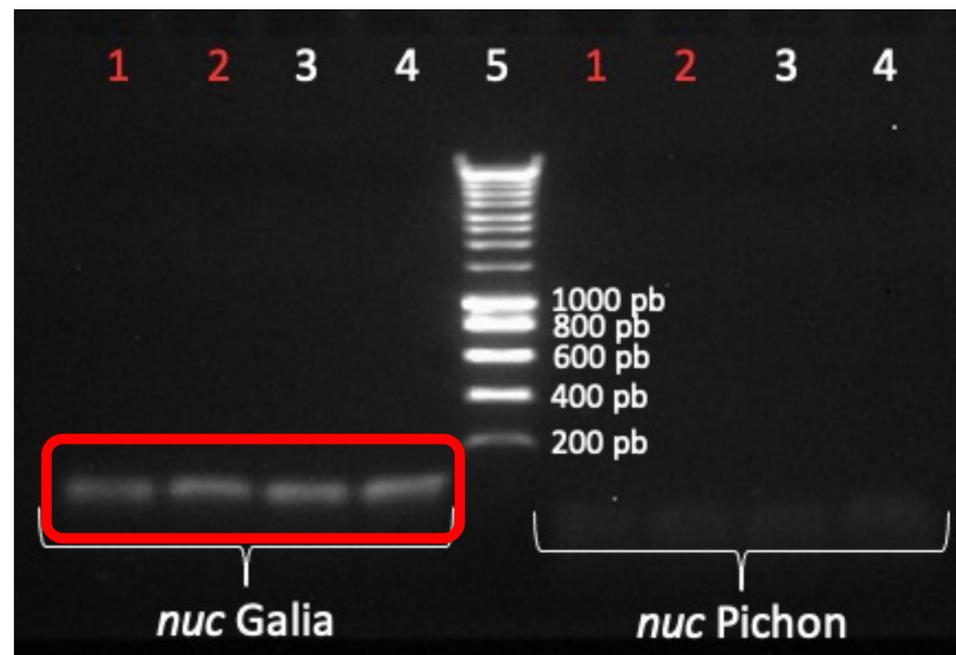
3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)

4 : eau

5 : marqueur de poids moléculaire

PCR en point final

Gène *nuc*



1 : SASM (CIP 103429)

2 : SARM (CIP 110856)

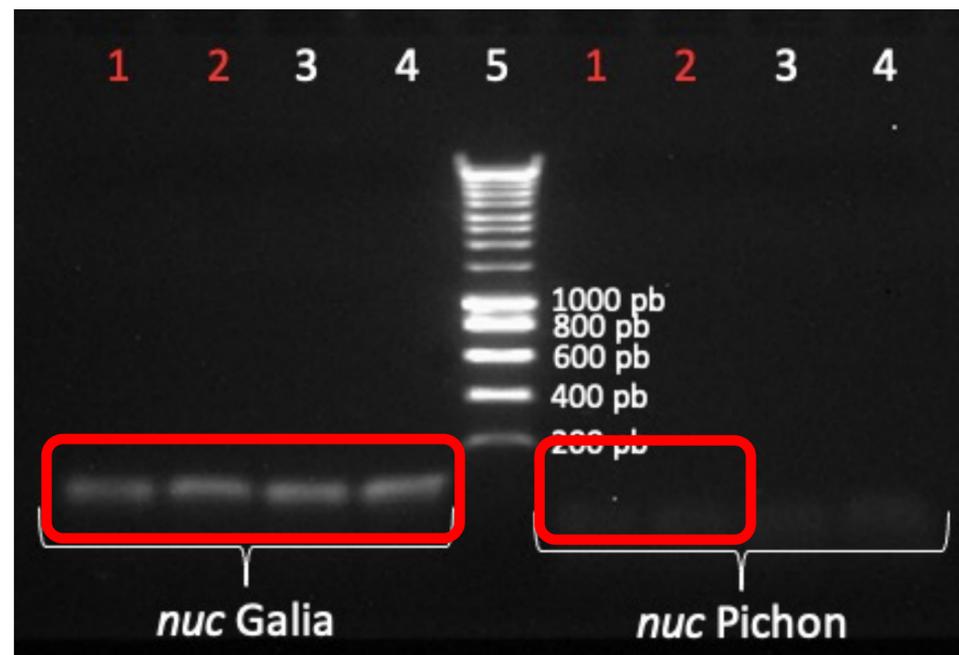
3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)

4 : eau

5 : marqueur de poids moléculaire

PCR en point final

Gène *nuc*



1 : SASM (CIP 103429)

2 : SARM (CIP 110856)

3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)

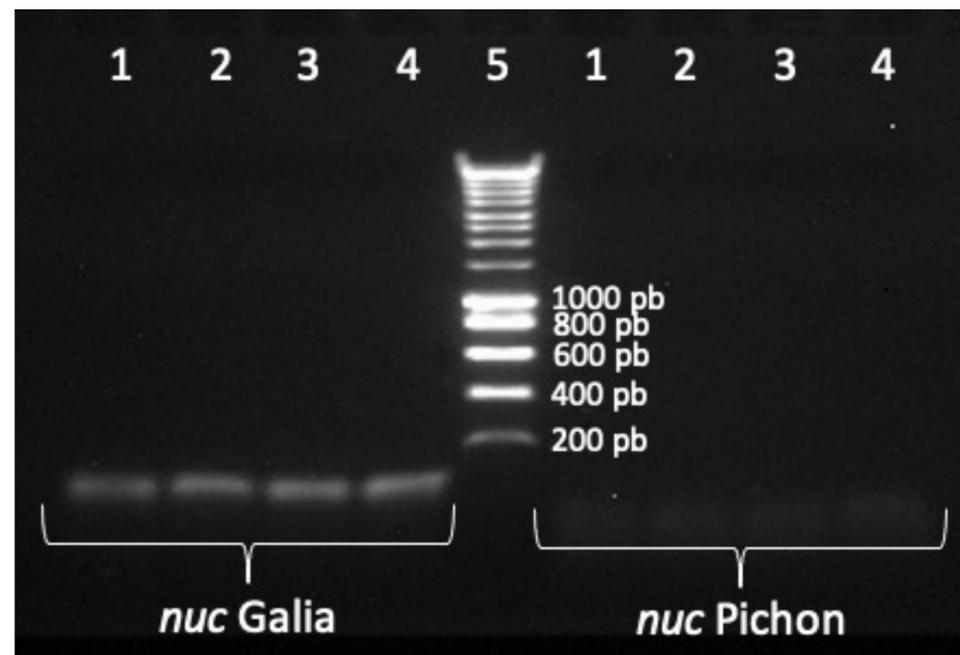
4 : eau

5 : marqueur de poids moléculaire

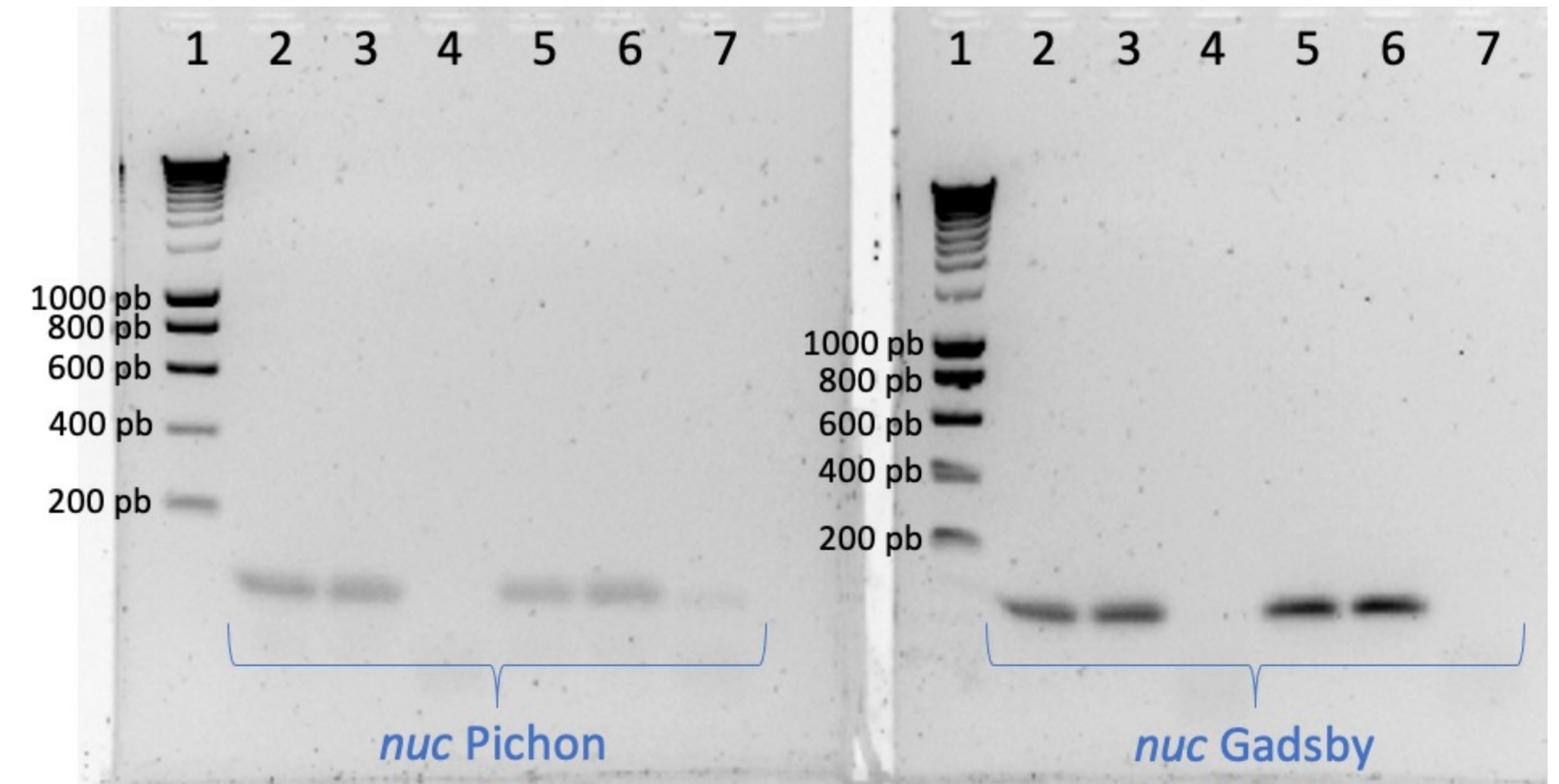
⇒ Amplification non spécifique pour les amorces de Galia *et al.*,
bandes fines mais présentes pour les amorces de Pichon *et al.*

PCR en point final

Gène *nuc*



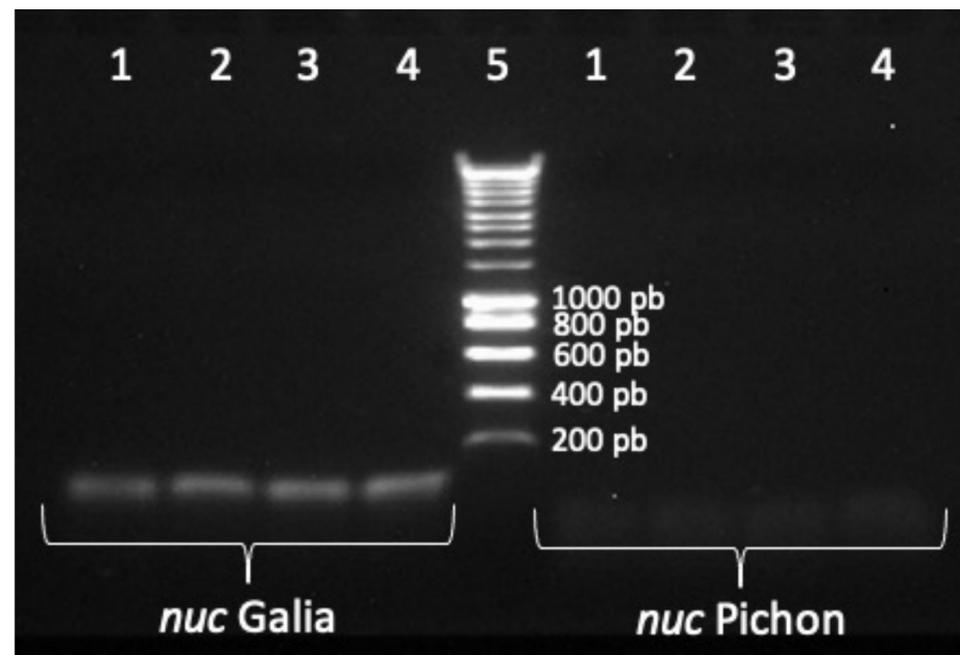
- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : eau
- 5 : marqueur de poids moléculaire



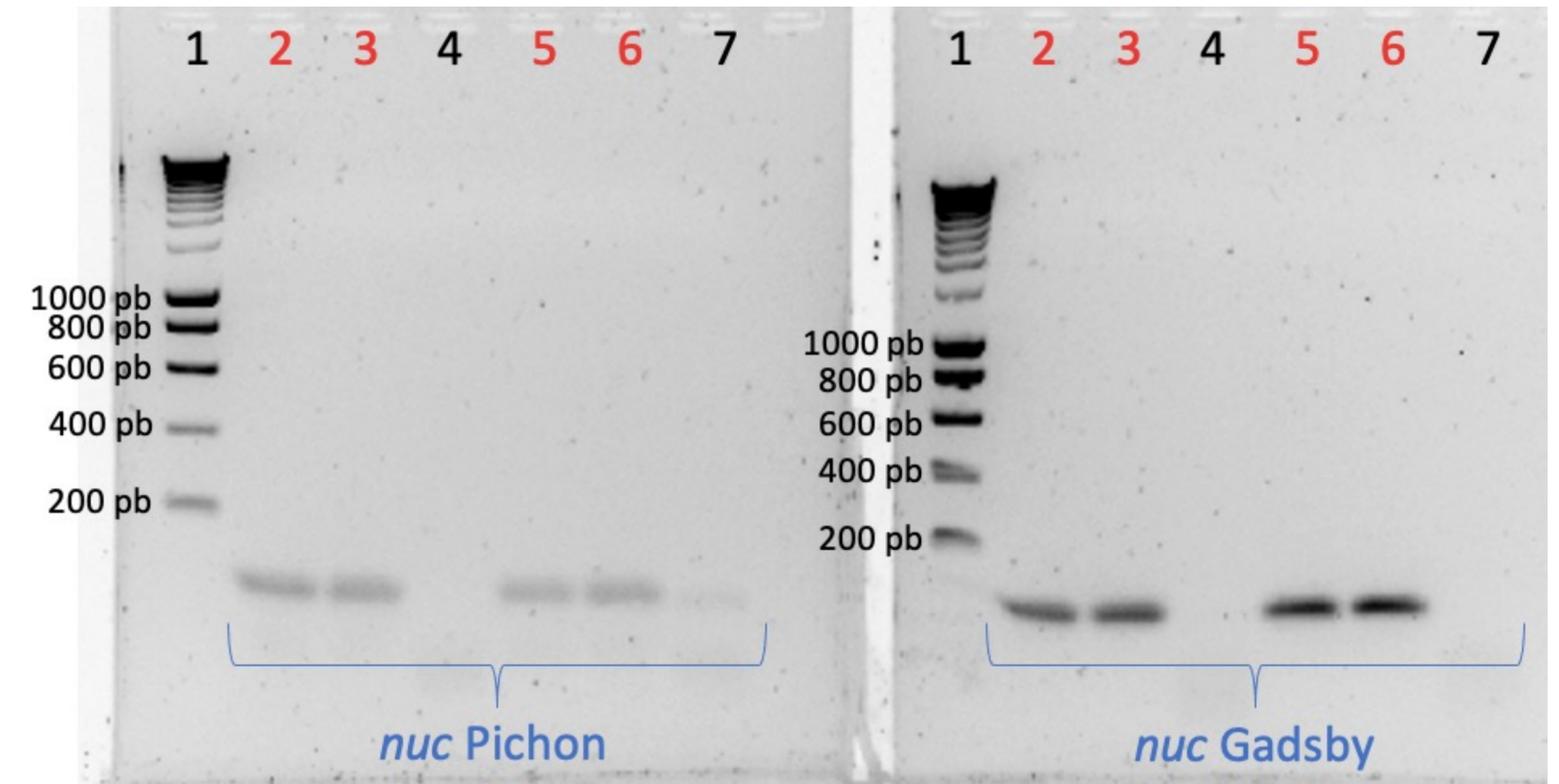
- 1 : marqueur de poids moléculaire
- 2 : SASM (CIP 103429)
- 3 : SARM (CIP 110856)
- 4 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 5 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 6 : SARM (souche n°24)
- 7 : eau

PCR en point final

Gène *nuc*



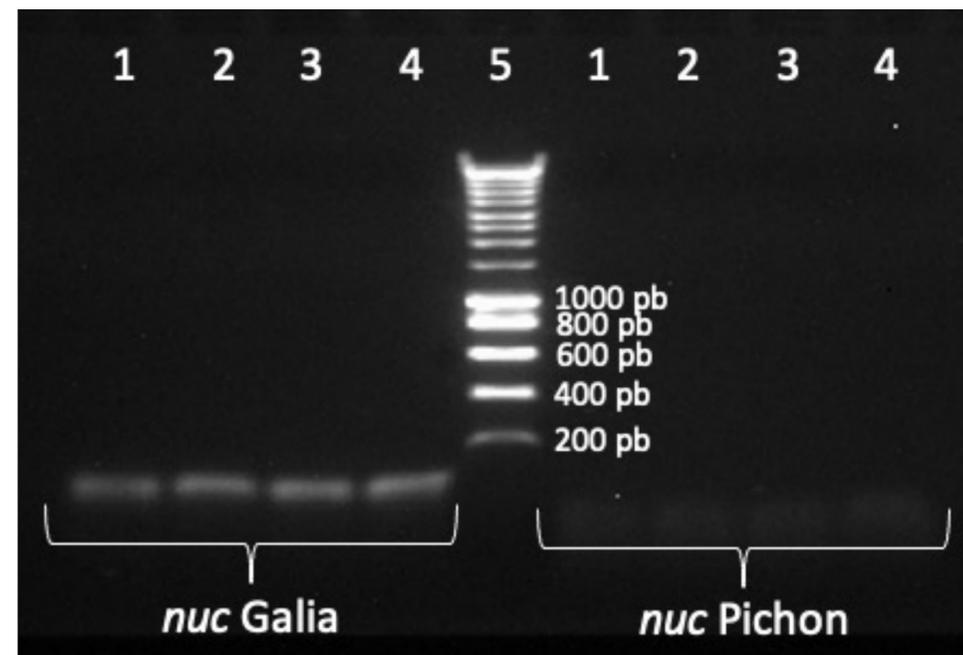
- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : eau
- 5 : marqueur de poids moléculaire



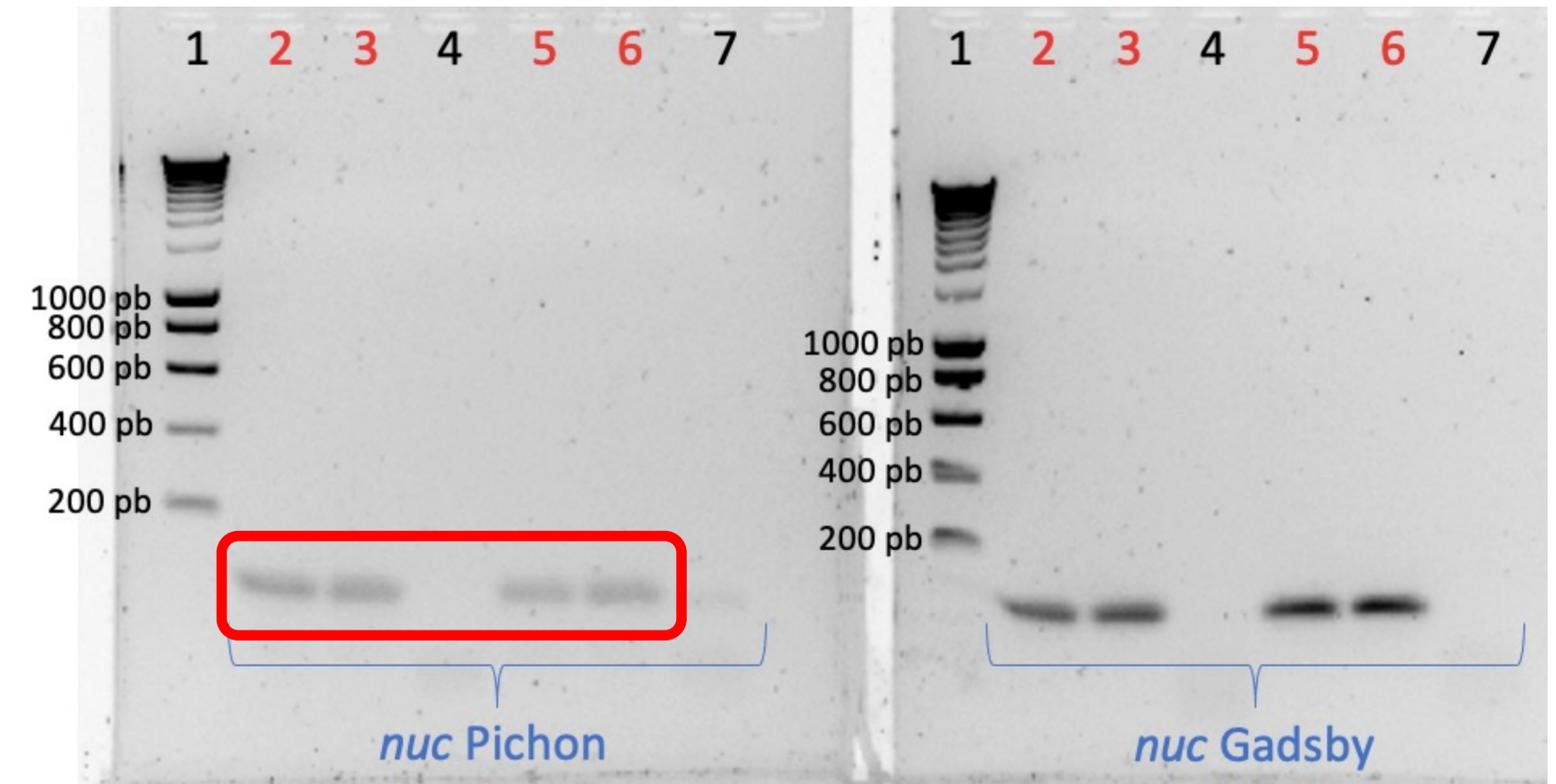
- 1 : marqueur de poids moléculaire
- 2 : SASM (CIP 103429)
- 3 : SARM (CIP 110856)
- 4 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 5 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 6 : SARM (souche n°24)
- 7 : eau

PCR en point final

Gène *nuc*



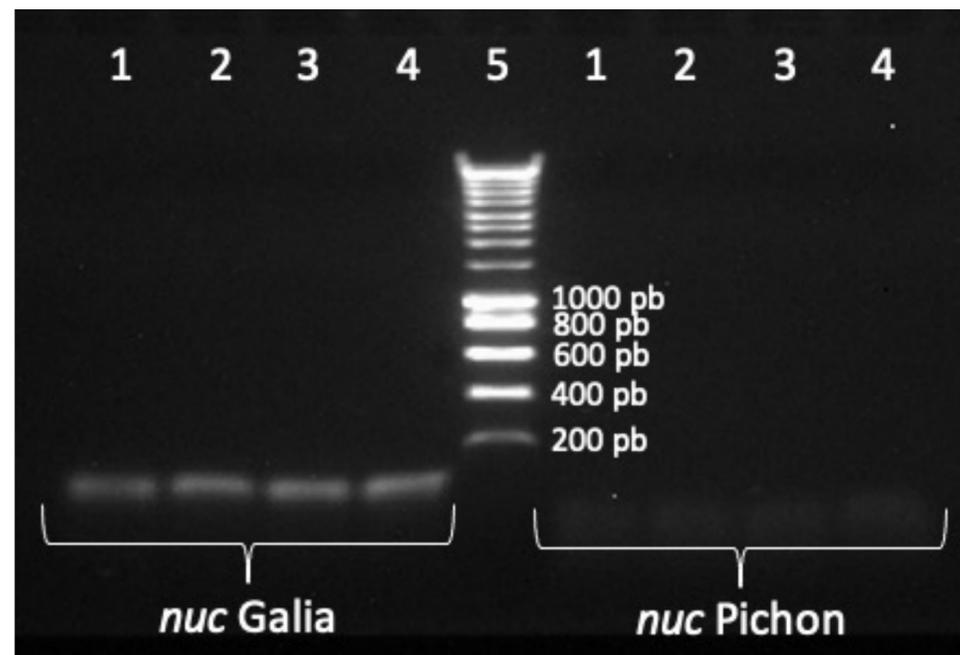
- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : eau
- 5 : marqueur de poids moléculaire



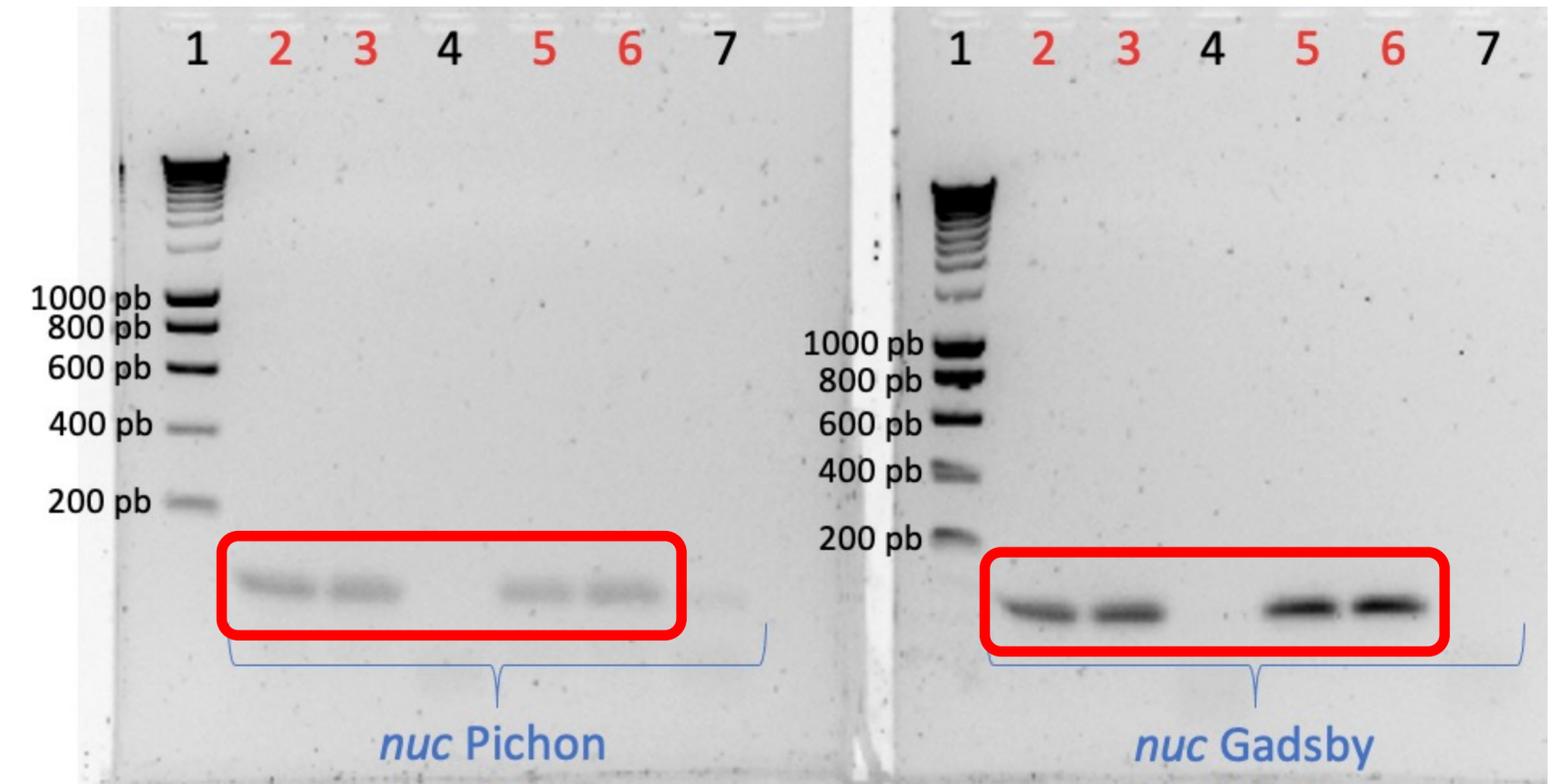
- 1 : marqueur de poids moléculaire
- 2 : SASM (CIP 103429)
- 3 : SARM (CIP 110856)
- 4 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 5 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 6 : SARM (souche n°24)
- 7 : eau

PCR en point final

Gène *nuc*



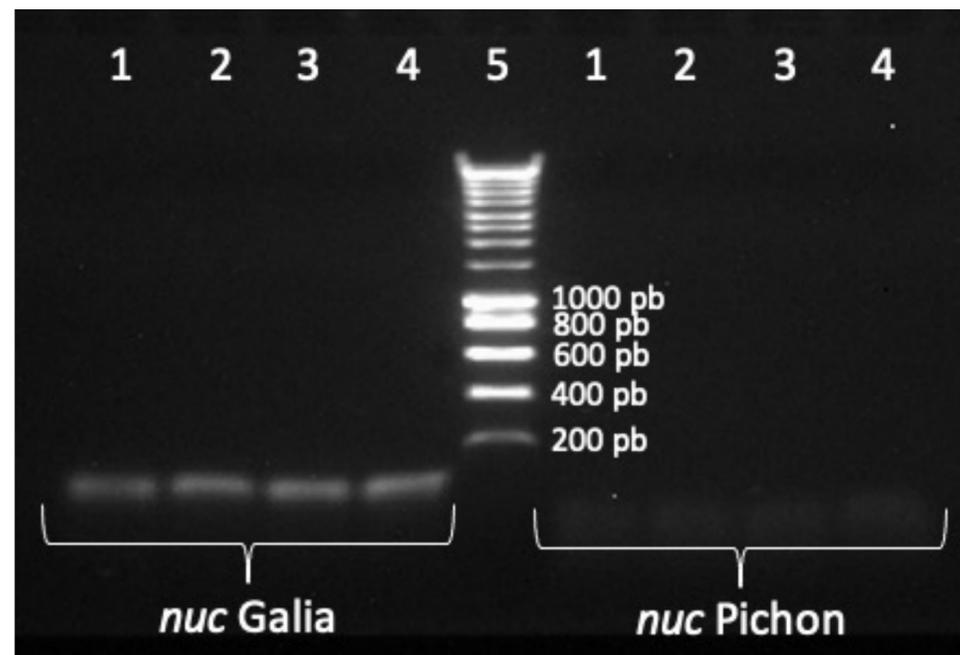
- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : eau
- 5 : marqueur de poids moléculaire



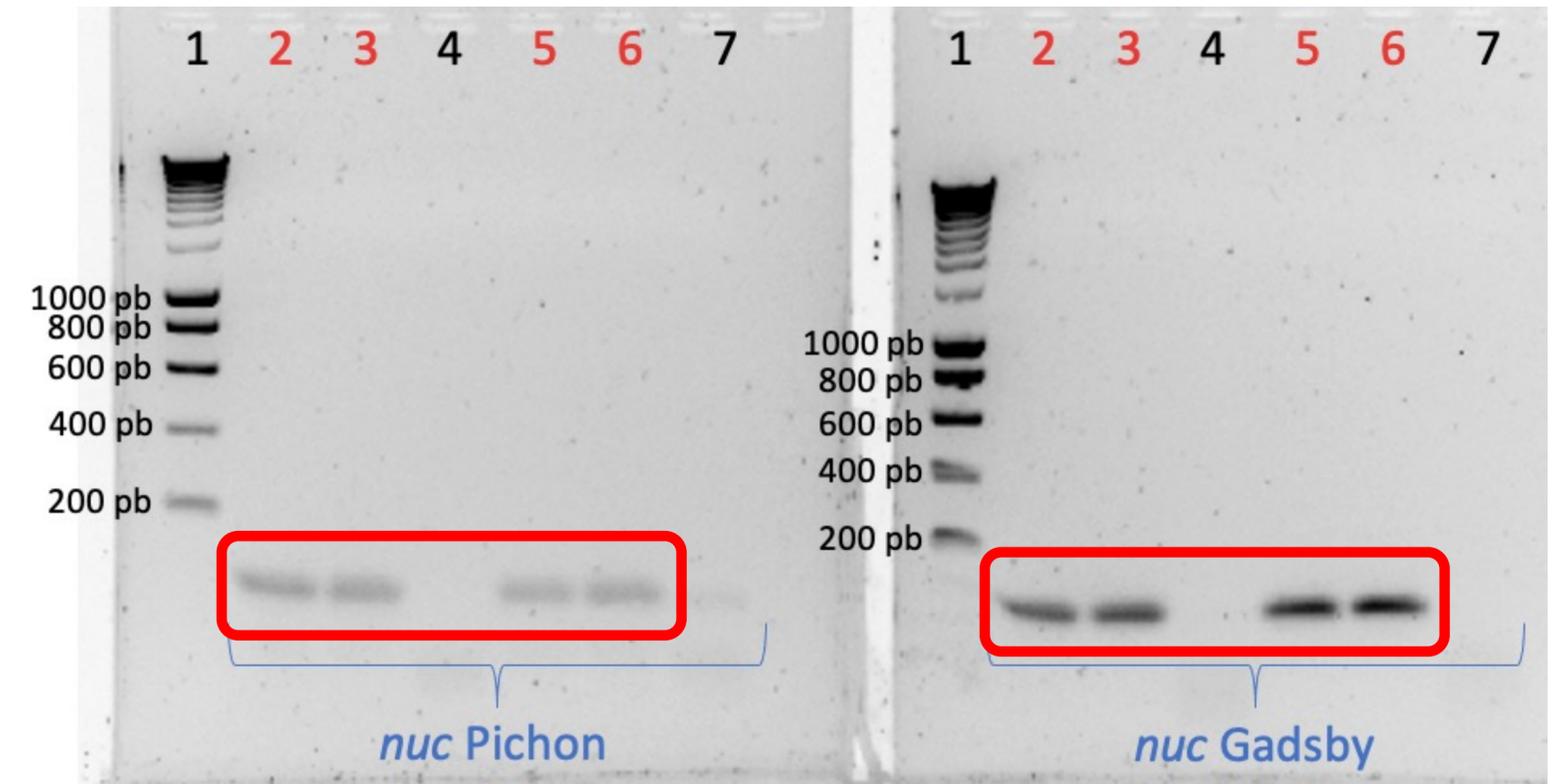
- 1 : marqueur de poids moléculaire
- 2 : SASM (CIP 103429)
- 3 : SARM (CIP 110856)
- 4 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 5 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 6 : SARM (souche n°24)
- 7 : eau

PCR en point final

Gène *nuc*



- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : eau
- 5 : marqueur de poids moléculaire



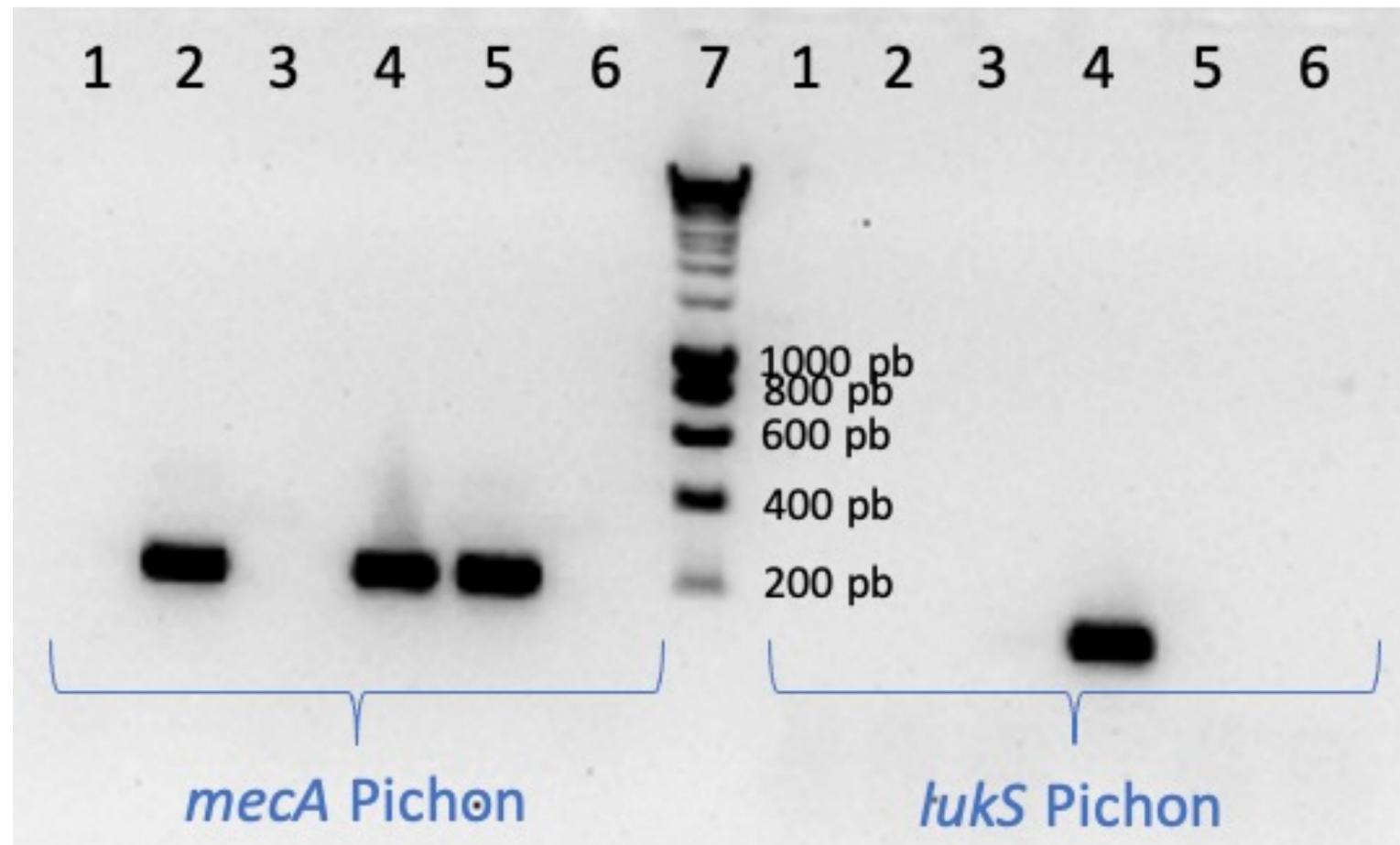
- 1 : marqueur de poids moléculaire
- 2 : SASM (CIP 103429)
- 3 : SARM (CIP 110856)
- 4 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 5 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 6 : SARM (souche n°24)
- 7 : eau



Bandes plus nettes et plus intenses pour les amorces de Gadsby *et al.*

PCR en point final

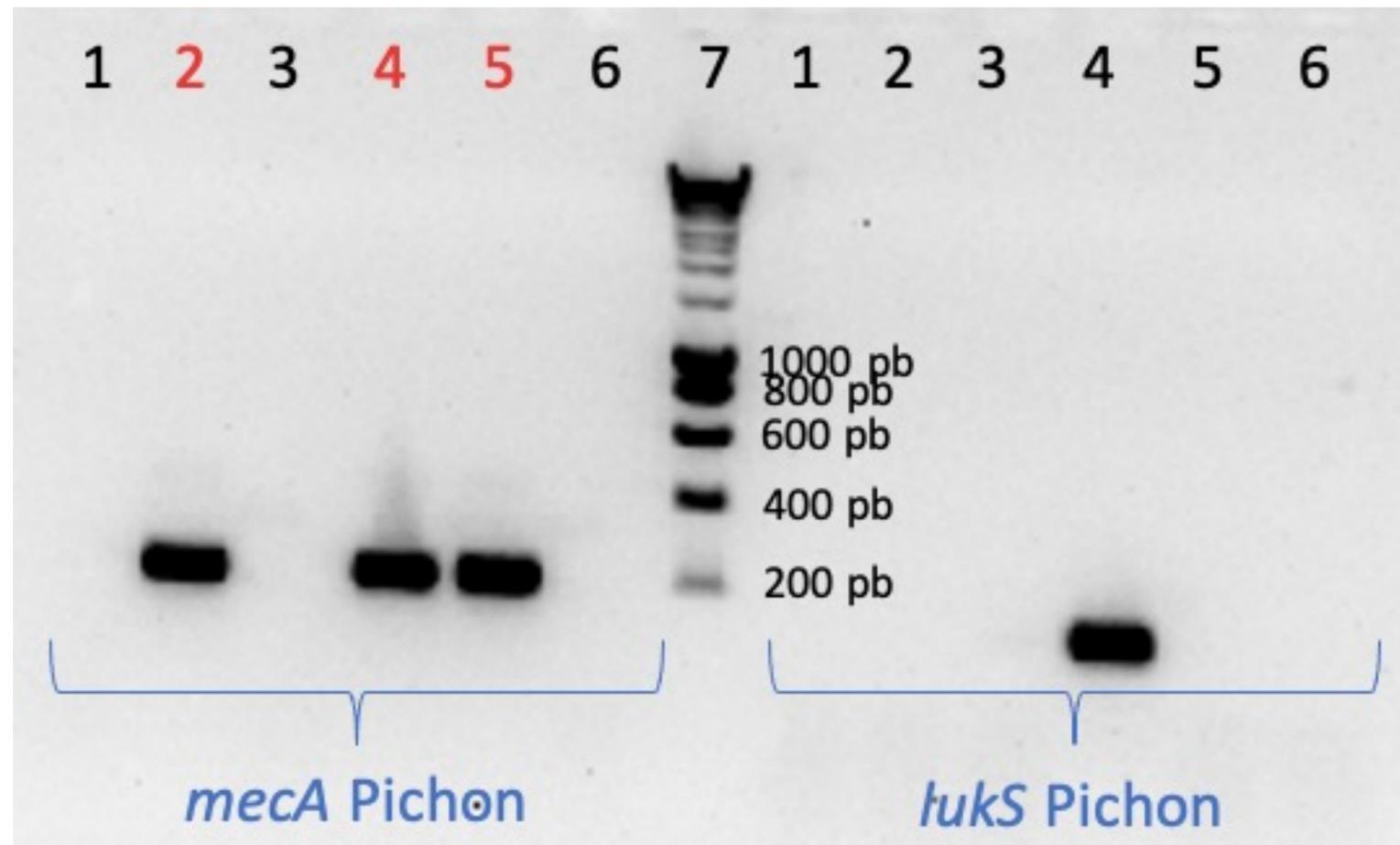
Gènes *mecA* et *lukS*



- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 5 : SARM (souche n°24)
- 6 : eau
- 7 : marqueur de poids moléculaire

PCR en point final

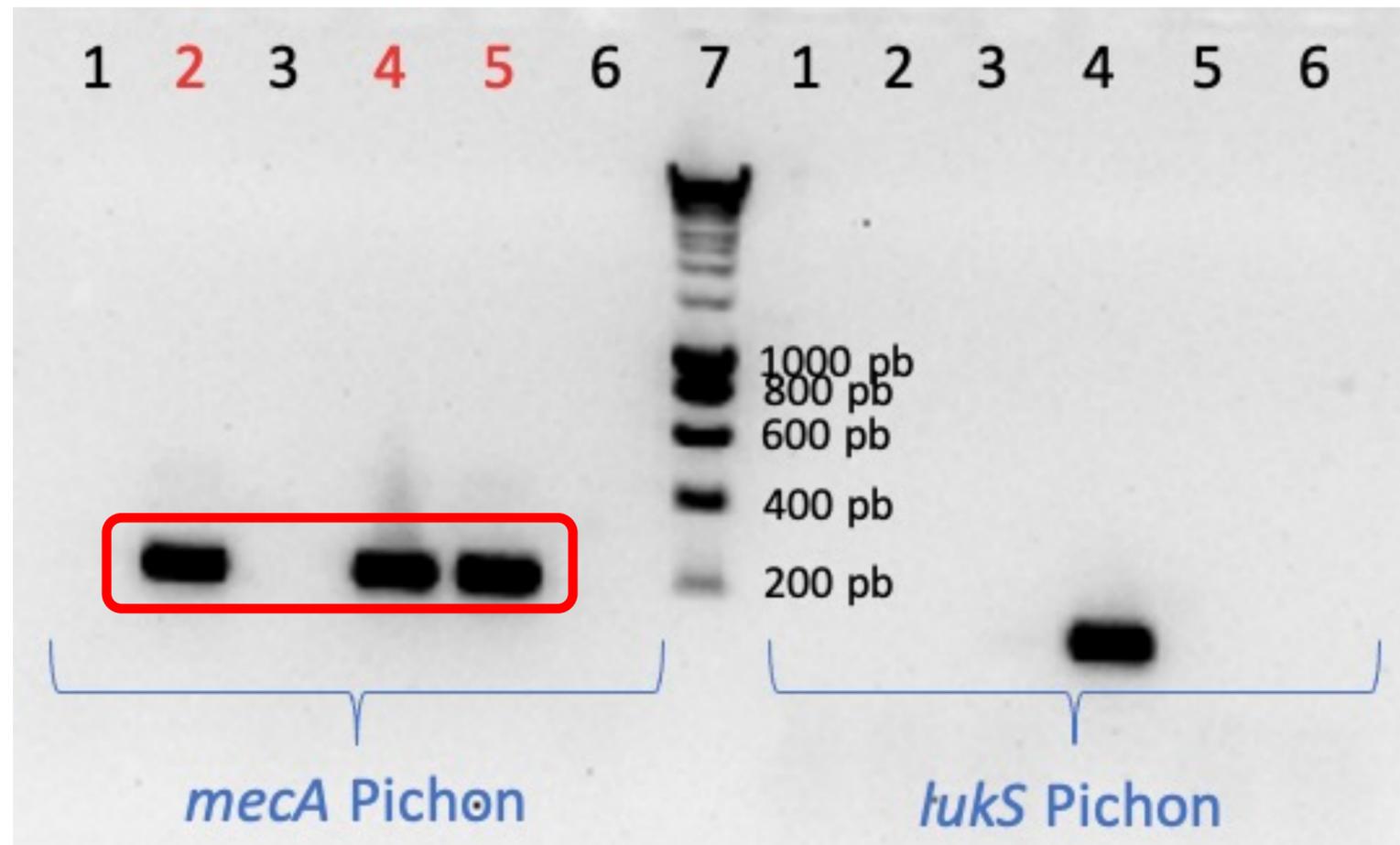
Gènes *mecA* et *lukS*



- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 5 : SARM (souche n°24)
- 6 : eau
- 7 : marqueur de poids moléculaire

PCR en point final

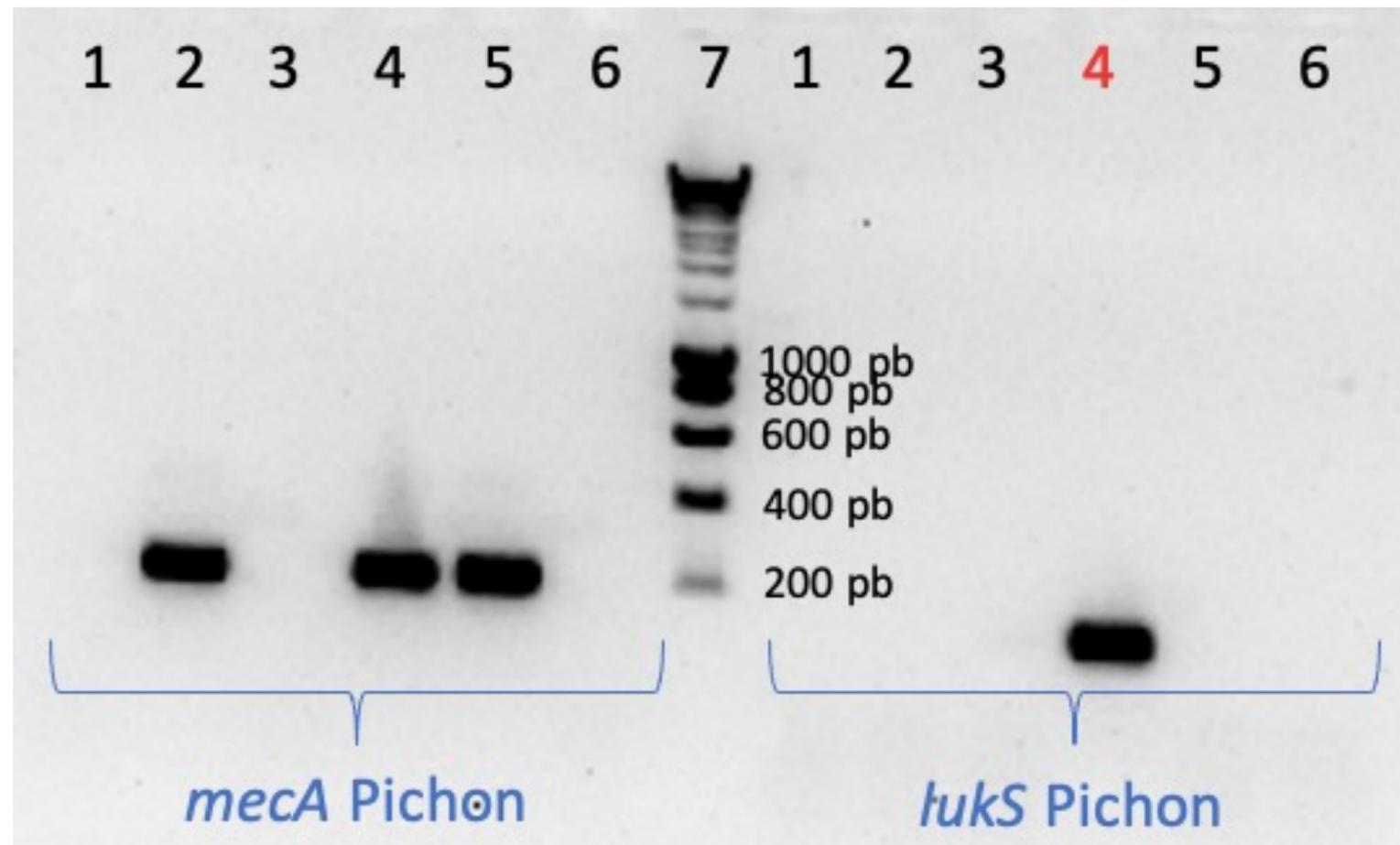
Gènes *mecA* et *lukS*



- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : **SARM** (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : **Souche n°49** (SARM-PVL+)
- 5 : **SARM** (souche n°24)
- 6 : eau
- 7 : marqueur de poids moléculaire

PCR en point final

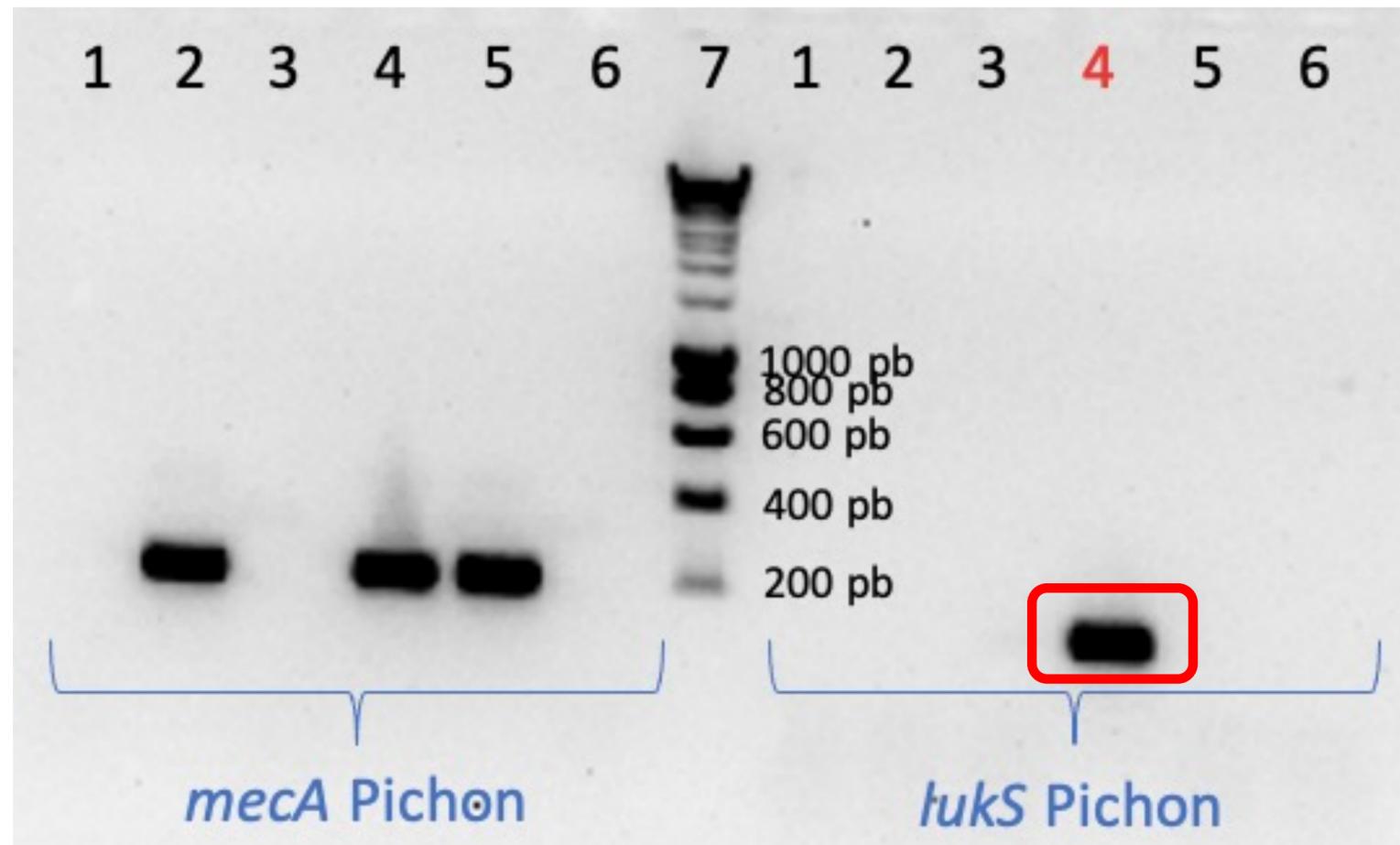
Gènes *mecA* et *lukS*



- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 5 : SARM (souche n°24)
- 6 : eau
- 7 : marqueur de poids moléculaire

PCR en point final

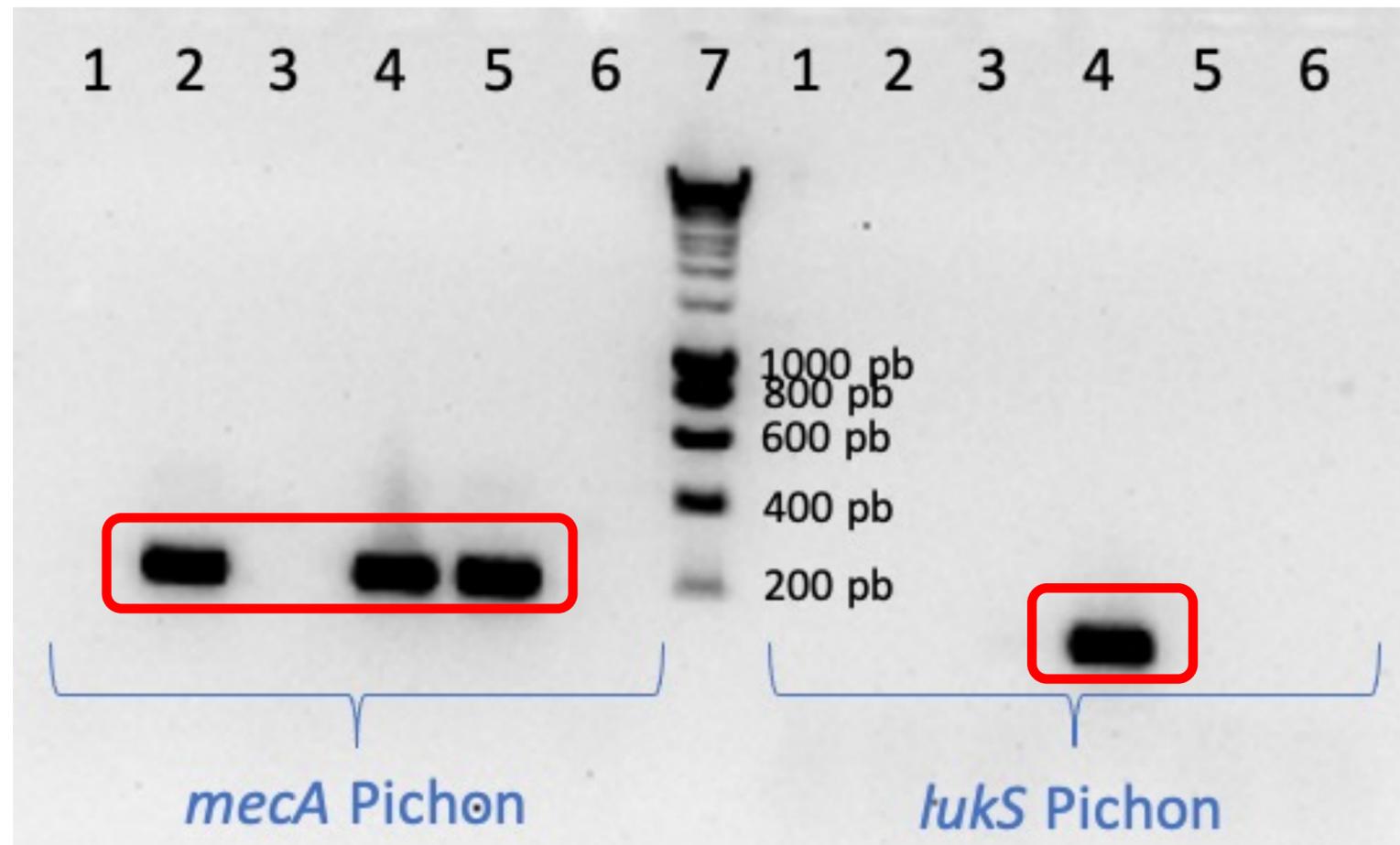
Gènes *mecA* et *lukS*



- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 5 : SARM (souche n°24)
- 6 : eau
- 7 : marqueur de poids moléculaire

PCR en point final

Gènes *mecA* et *lukS*



- 1 : SASM (CIP 103429)
- 2 : SARM (CIP 110856)
- 3 : *S. saprophyticus* (ATCC BAA 750)
- 4 : Souche n°49 (SARM-PVL+)
- 5 : SARM (souche n°24)
- 6 : eau
- 7 : marqueur de poids moléculaire



Bandes nettes et intenses sur les souches attendues : amorces de Pichon *et al.* retenues

Résultats – Discussion

PCR en temps réel triplex

Souche n°49 :
SARM-PVL+
nuc + , *mecA* + , *lukS* +

Gène		Dilutions (UFC/mL)						
		10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
<i>nuc</i>	1	20,698	24,501	27,915	31,252	34,997	38,172	38,847
	2	20,7	24,473	27,868	31,389	34,586	39,174	ND
	3	20,528	24,32	27,859	31,212	35,225	38,072	ND
	4	20,396	24,207	27,783	31,169	34,493	ND	ND
	5	20,56	24,292	27,83	31,239	34,701	37,627	ND
	6	20,706	24,379	27,858	31,149	34,837	37,579	ND
<i>mecA</i>	1	20,946	25,069	28,538	31,647	36,543	39,147	ND
	2	20,946	25,074	28,365	31,462	35,673	38,452	ND
	3	20,839	24,888	28,316	31,704	35,087	38,2	ND
	4	20,719	24,724	28,246	31,876	35,557	ND	ND
	5	20,819	24,822	28,236	31,892	35,685	37,736	ND
	6	20,999	24,932	28,375	31,692	35,559	38,748	ND
<i>lukS</i>	1	20,629	24,407	27,774	30,98	34,938	38,598	ND
	2	20,586	24,376	27,574	30,791	34,968	ND	ND
	3	20,382	24,151	27,544	30,572	34,817	38,147	ND
	4	20,281	24	27,462	30,743	34,266	38,031	ND
	5	20,384	24	27,482	30,991	35,174	ND	38,655
	6	20,438	24,087	27,506	30,573	34,743	ND	ND

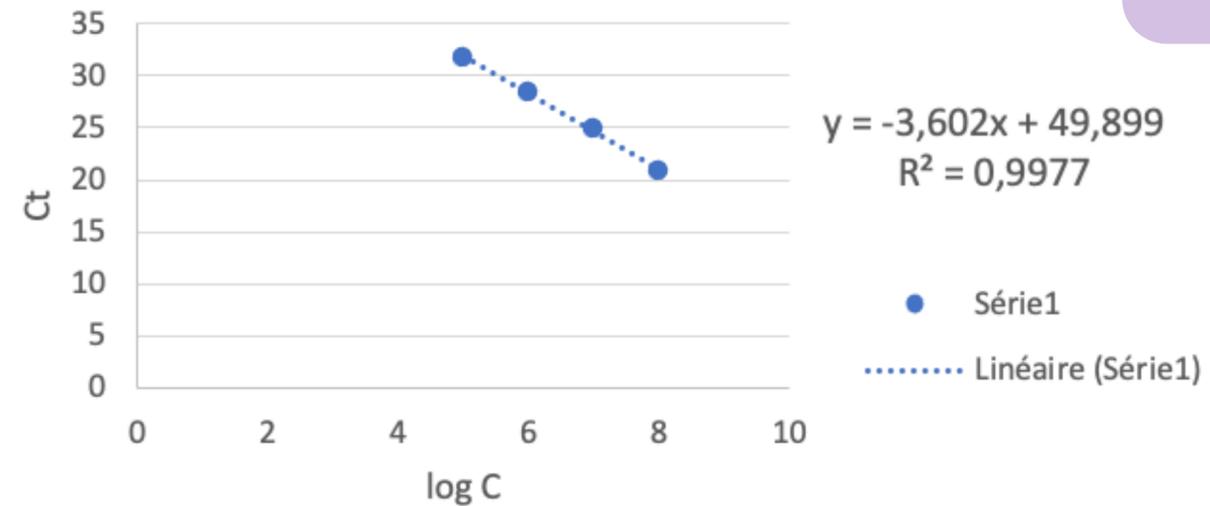
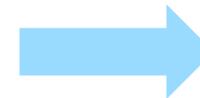
ND : Non Détectable

Résultats – Discussion

PCR en temps réel triplex

Gène		Dilutions (UFC/mL)						
		10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
<i>nuc</i>	1	20,698	24,501	27,915	31,252	34,997	38,172	38,847
	2	20,7	24,473	27,868	31,389	34,586	39,174	ND
	3	20,528	24,32	27,859	31,212	35,225	38,072	ND
	4	20,396	24,207	27,783	31,169	34,493	ND	ND
	5	20,56	24,292	27,83	31,239	34,701	37,627	ND
	6	20,706	24,379	27,858	31,149	34,837	37,579	ND
<i>mecA</i>	1	20,946	25,069	28,538	31,647	36,543	39,147	ND
	2	20,946	25,074	28,365	31,462	35,673	38,452	ND
	3	20,839	24,888	28,316	31,704	35,087	38,2	ND
	4	20,719	24,724	28,246	31,876	35,557	ND	ND
	5	20,819	24,822	28,236	31,892	35,685	37,736	ND
	6	20,999	24,932	28,375	31,692	35,559	38,748	ND
<i>lukS</i>	1	20,629	24,407	27,774	30,98	34,938	38,598	ND
	2	20,586	24,376	27,574	30,791	34,968	ND	ND
	3	20,382	24,151	27,544	30,572	34,817	38,147	ND
	4	20,281	24	27,462	30,743	34,266	38,031	ND
	5	20,384	24	27,482	30,991	35,174	ND	38,655
	6	20,438	24,087	27,506	30,573	34,743	ND	ND

ND : Non Détectable



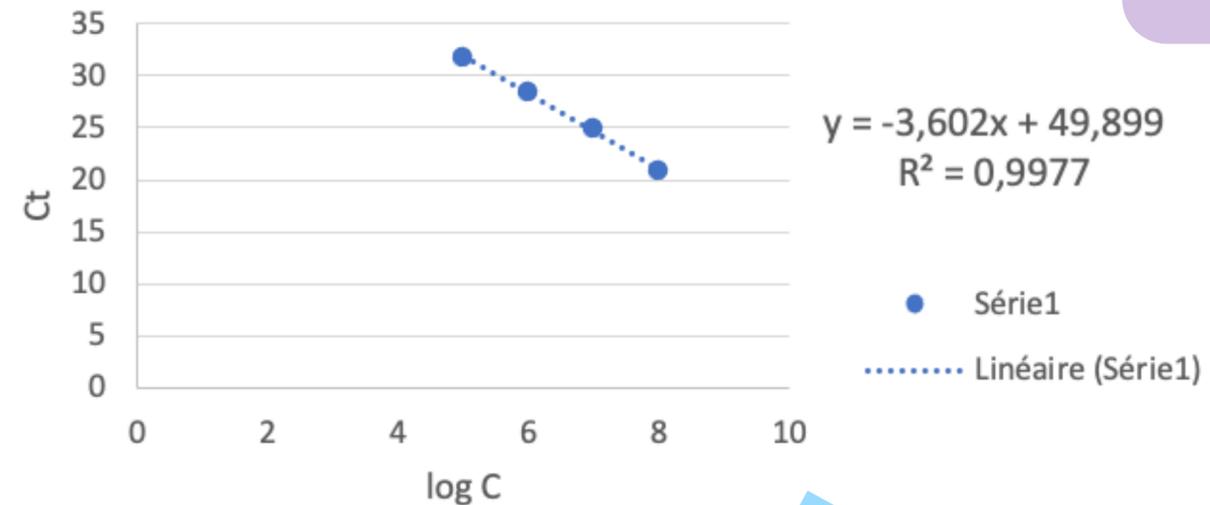
Souche n°49 :
SARM-PVL+
nuc + , *mecA* + , *lukS* +

Résultats – Discussion

PCR en temps réel triplex

Gène		Dilutions (UFC/mL)						
		10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
<i>nuc</i>	1	20,698	24,501	27,915	31,252	34,997	38,172	38,847
	2	20,7	24,473	27,868	31,389	34,586	39,174	ND
	3	20,528	24,32	27,859	31,212	35,225	38,072	ND
	4	20,396	24,207	27,783	31,169	34,493	ND	ND
	5	20,56	24,292	27,83	31,239	34,701	37,627	ND
	6	20,706	24,379	27,858	31,149	34,837	37,579	ND
<i>mecA</i>	1	20,946	25,069	28,538	31,647	36,543	39,147	ND
	2	20,946	25,074	28,365	31,462	35,673	38,452	ND
	3	20,839	24,888	28,316	31,704	35,087	38,2	ND
	4	20,719	24,724	28,246	31,876	35,557	ND	ND
	5	20,819	24,822	28,236	31,892	35,685	37,736	ND
	6	20,999	24,932	28,375	31,692	35,559	38,748	ND
<i>lukS</i>	1	20,629	24,407	27,774	30,98	34,938	38,598	ND
	2	20,586	24,376	27,574	30,791	34,968	ND	ND
	3	20,382	24,151	27,544	30,572	34,817	38,147	ND
	4	20,281	24	27,462	30,743	34,266	38,031	ND
	5	20,384	24	27,482	30,991	35,174	ND	38,655
	6	20,438	24,087	27,506	30,573	34,743	ND	ND

ND : Non Détectable



Souche n°49 :
SARM-PVL+
nuc + , *mecA* + , *lukS* +



- Coefficient de détermination (R²) :**
- *nuc* : 0,9977
 - *mecA* : 0,9989
 - *lukS* : 0,9994

CONFORME :
R² > 0,98

D'après Kralik et al.

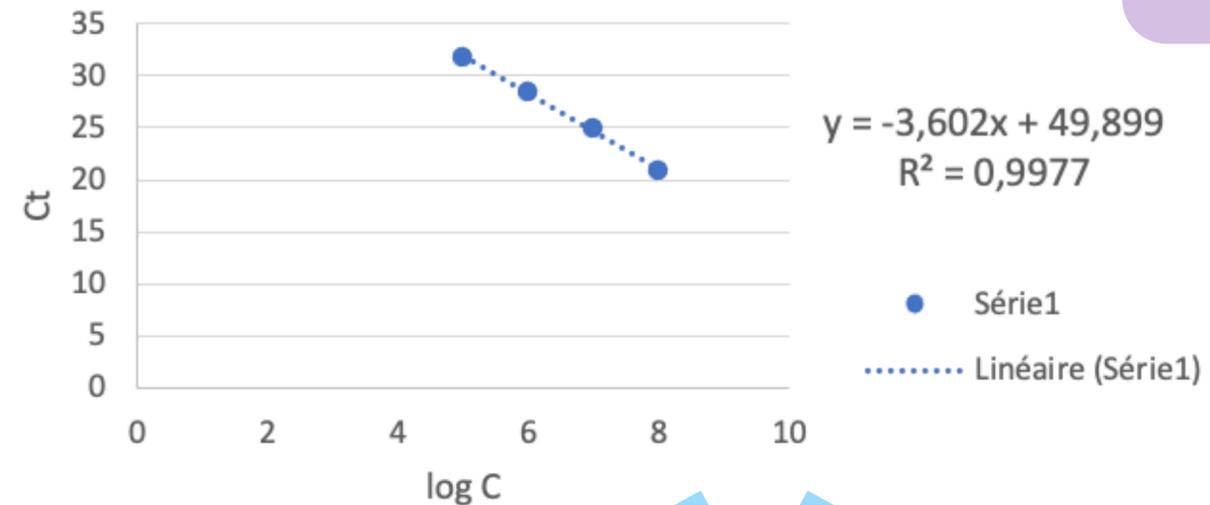
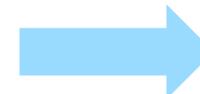
Résultats – Discussion

PCR en temps réel triplex

Souche n°49 :
SARM-PVL+
nuc + , *mecA* + , *lukS* +

Gène		Dilutions (UFC/mL)						
		10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
<i>nuc</i>	1	20,698	24,501	27,915	31,252	34,997	38,172	38,847
	2	20,7	24,473	27,868	31,389	34,586	39,174	ND
	3	20,528	24,32	27,859	31,212	35,225	38,072	ND
	4	20,396	24,207	27,783	31,169	34,493	ND	ND
	5	20,56	24,292	27,83	31,239	34,701	37,627	ND
	6	20,706	24,379	27,858	31,149	34,837	37,579	ND
<i>mecA</i>	1	20,946	25,069	28,538	31,647	36,543	39,147	ND
	2	20,946	25,074	28,365	31,462	35,673	38,452	ND
	3	20,839	24,888	28,316	31,704	35,087	38,2	ND
	4	20,719	24,724	28,246	31,876	35,557	ND	ND
	5	20,819	24,822	28,236	31,892	35,685	37,736	ND
	6	20,999	24,932	28,375	31,692	35,559	38,748	ND
<i>lukS</i>	1	20,629	24,407	27,774	30,98	34,938	38,598	ND
	2	20,586	24,376	27,574	30,791	34,968	ND	ND
	3	20,382	24,151	27,544	30,572	34,817	38,147	ND
	4	20,281	24	27,462	30,743	34,266	38,031	ND
	5	20,384	24	27,482	30,991	35,174	ND	38,655
	6	20,438	24,087	27,506	30,573	34,743	ND	ND

ND : Non Détectable



Efficacité :

- *nuc* : 91,6%
- *mecA* : 89,5%
- *lukS* : 95,4%

Coefficient de détermination (R²) :

- *nuc* : 0,9977
- *mecA* : 0,9989
- *lukS* : 0,9994

Efficacité acceptable si 90% < E < 110% → **CONFORME** sauf pour *mecA*
mais PCR triplex (compétition) + exploration possible par d'autres méthodes

CONFORME :
R² > 0,98

Validation de méthode

Fidélité intermédiaire

Contamination

Exactitude

CONFORME

Limite de détection

Estimée entre 10^3 et 10^4 UFC/mL

CONFORME aux données de la littérature (Pichon *et al.*, Galia *et al.*, Renwick *et al.*), reste à affiner

Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

46 souches cliniques

Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

46 souches cliniques

Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

46 souches cliniques

Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

46 souches cliniques

Souche n°25

Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

46 souches cliniques

Souche n°25

Souche de
dépistage
préopératoire



Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

46 souches cliniques

Souche n°25

Souche de
dépistage
préopératoire



5 min : négatif
20 min : positif

Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

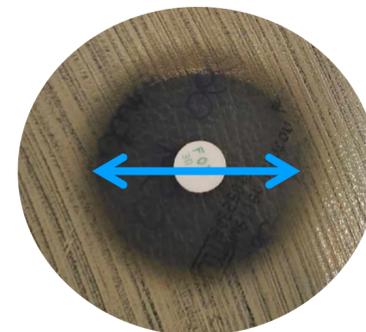
46 souches cliniques

Souche n°25

Souche de
dépistage
préopératoire



5 min : négatif
20 min : positif



25 mm

(BP : < 22 mm)

D'après CASFM - 2022

Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

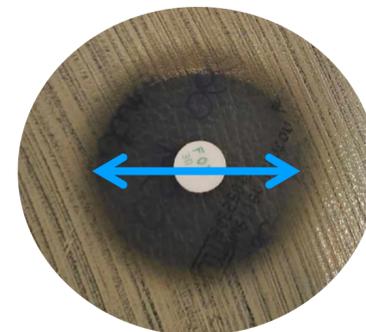
46 souches cliniques

Souche n°25

Souche de dépistage préopératoire



5 min : négatif
20 min : positif



25 mm

(BP : < 22 mm)

D'après CASFM - 2022



Antibiotique	CMI	Interprétation
Test céfoxitine screen	NEG	-
Oxacilline	0,5	S

(BP : < 2 mg/L)

D'après CASFM - 2022

Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

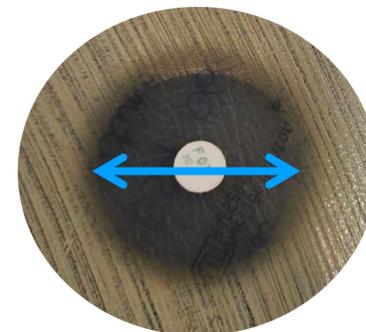
46 souches cliniques

Souche n°25

Souche de dépistage préopératoire



5 min : négatif
20 min : positif



25 mm

(BP : < 22 mm)

D'après CASFM - 2022



Antibiotique	CMI	Interprétation
Test céfoxitine screen	NEG	-
Oxacilline	0,5	S

(BP : < 2 mg/L)

D'après CASFM - 2022



Non respect des recos fournisseur

Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

46 souches cliniques

Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

46 souches cliniques

Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

46 souches cliniques

Souches n°31 et 33

Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

46 souches cliniques

Souches n°31 et 33

Couple de retour du Vietnam



Abcès au menton



Surinfection
piqûre insecte
au pied

Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

46 souches cliniques

Souches n°31 et 33

Couple de retour du Vietnam

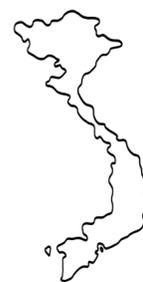


Abcès au menton



Surinfection piqûre insecte au pied

Épidémiologie



SARM : 33%
PVL : 27%
D'après Ngoc Thi Vu et al., 2016



SARM : 11%
PVL < 5%
D'après Escudier et al., 2016

Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

46 souches cliniques

Souches n°31 et 33

Couple de retour du Vietnam

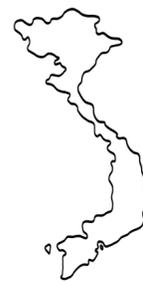


Abcès au menton



Surinfection piqûre insecte au pied

Épidémiologie



SARM : 33%
PVL : 27%
D'après Ngoc Thi Vu et al., 2016



SARM : 11%
PVL < 5%
D'après Escudier et al., 2016



Probables infections à SA-PVL+ non diagnostiquées

1. Mise en place d'une PCR triplex sur souche

Performances (efficacité, R^2) **conformes** aux données publiées dans la littérature

Délai de rendu amélioré



Adaptation sur des **prélèvements** : réduire au maximum le délai de rendu du résultat

2. Validation de méthode

- Fidélité intermédiaire
- Contamination
- Exactitude
- Limite de détection
- Comparaison de méthodes

CONFORMES



Analyses complémentaires :

- robustesse, stabilité des réactifs
- analyse des risques
- variabilité inter-opérateur

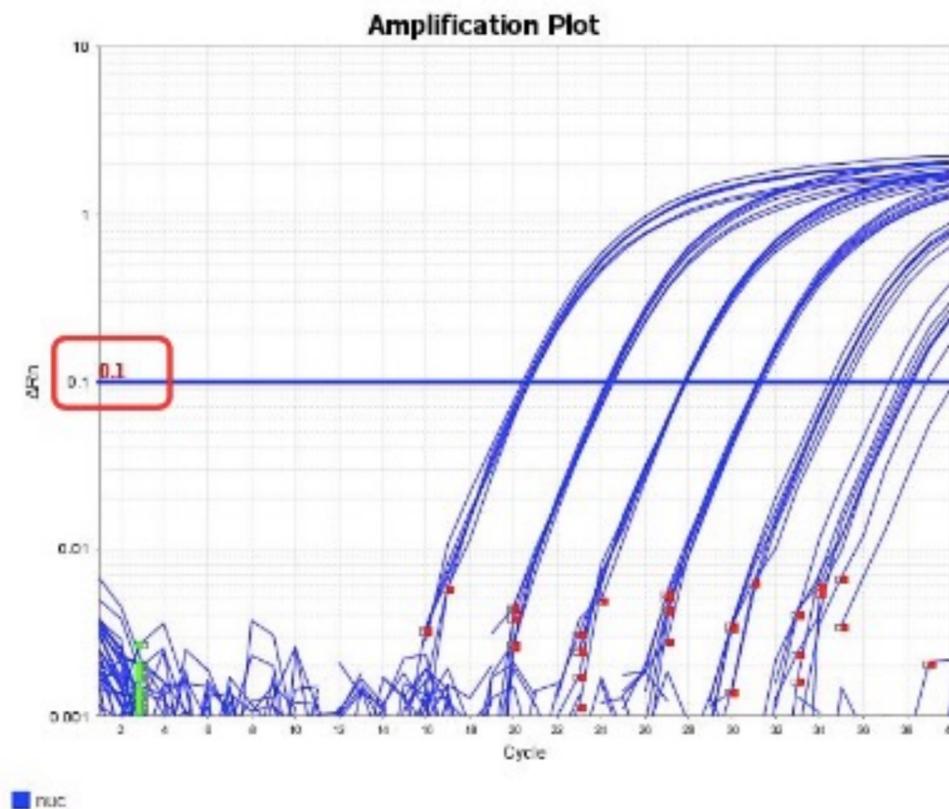
Merci pour votre attention



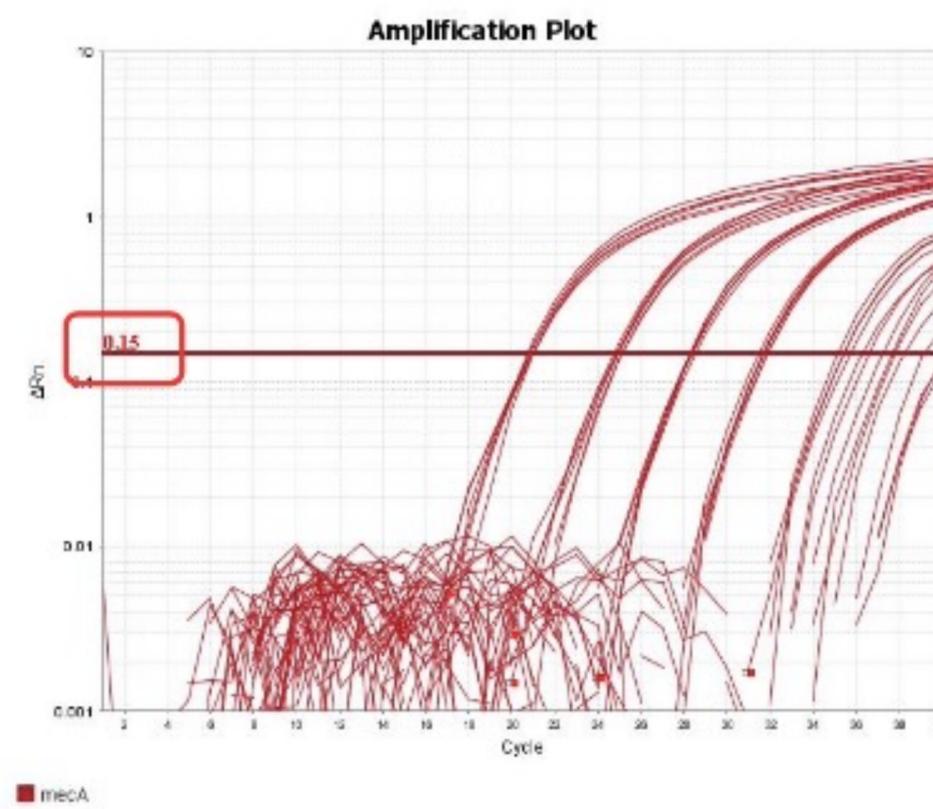


PCR en temps réel triplex

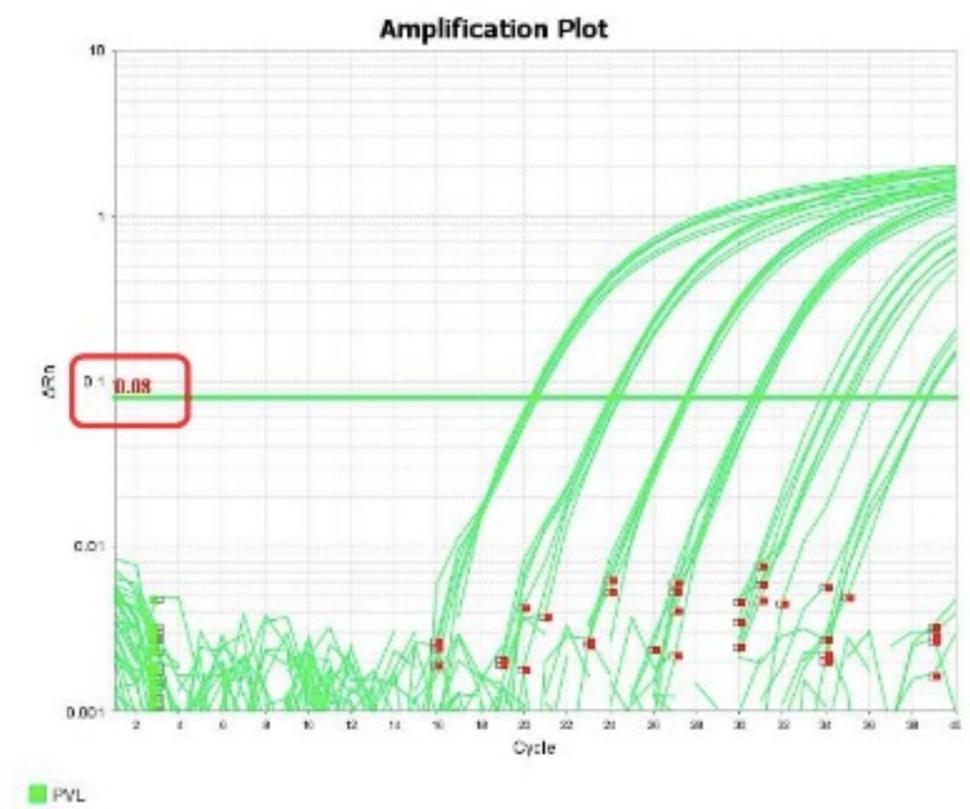
Seuils de fluorescence



nuc : $\Delta Rn = 0,10$



mecA : $\Delta Rn = 0,15$



lukS : $\Delta Rn = 0,08$



Établi au point médian de la phase exponentielle d'amplification de l'extrait

Validation de méthode

Limite de détection (LOD)

Inoculum	<i>nuc</i>	<i>mecA</i>	<i>lukS</i>	Inoculum	<i>nuc</i>	<i>mecA</i>	<i>lukS</i>
10 ⁴ UFC/mL	34,99	36,54	34,93	10 ³ UFC/mL	38,17	39,15	38,59
	34,58	35,67	34,96		39,17	38,45	ND
	35,22	35,08	34,81		38,07	38,20	38,14
	34,49	35,55	34,26		ND	ND	38,03
	34,70	35,68	35,17		37,63	37,74	ND
	34,83	35,55	34,74		37,56	38,75	ND
	34,75	36,26	33,76		37,85	ND	36,19
	34,77	35,35	34,31		37,08	37,15	38,65
	34,41	35,37	34,19		38,18	37,58	38,09
	34,90	35,06	34,13		38,99	38,19	36,84
34,62	34,98	34,00	39,30	39,15	38,18		

ND : Non Détectable

Souche n°49 :
SARM-PVL+
nuc + , *mecA* + , *lukS* +

CONFORME aux données de la littérature (Pichon *et al.*, Galia *et al.*, Renwick *et al.*), reste à affiner



Estimation de la LOD entre 10³ et 10⁴ UFC/mL

Validation de méthode

Comparaison de méthodes

		<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%

46 souches cliniques

Souches n°31 et 33

Couple de retour du Vietnam

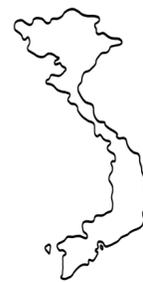


Abcès au menton



Surinfection
piqûre insecte
au pied

Épidémiologie



SARM : 33%
PVL : 27%
D'après Ngoc Thi Vu et al., 2016



SARM : 11%
PVL < 5%
D'après Escudier et al., 2016



Infection à CA-MRSA ?

- Infection communautaire
- Patients jeunes sans comorbidités
- Acquisition en zone de prévalence élevée
- Transmission intra-familiale
- SA-PVL+ : pourvoyeur d'IPTM

Mise au point de la PCR

3. Validation de méthode

- Fidélité intermédiaire
- Contamination
- Exactitude
- Limite de détection
- Comparaison de méthodes

