

Test d’agglutination au latex de la protéine fixatrice de pénicilline (PPF2¹)

1. UTILISATION PRÉVUE

Ce test est un test d’agglutination rapide au latex qui permet la détection de la PFP2¹ (également appelée PFP2a)² dans des isolats de staphylocoques et facilite l’identification de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et de staphylocoques résistants à la méticilline à coagulase négative.

2. PRINCIPE DU TEST

Les staphylocoques sont une des causes principales d’infections nosocomiales et d’infections acquises en collectivité à travers le monde². Dans de nombreux établissements, environ 25 % à 50 % des souches de *S. aureus* et 75 % des staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont résistants à la méticilline³. Les souches de SARM constituent un sujet de préoccupation majeur en raison de la facilité de dissémination et de colonisation des patients affaiblis que présentent certaines souches épidémiques. Le traitement des souches sensibles par des pénicillines résistantes à la pénicillinase (PRP) est préférable car les bêta-lactamines sont absorbées plus facilement par les liquides et tissus corporels, génèrent moins de complications liées au traitement et ne favorisent pas le développement d’organismes résistants à la vancomycine. Une identification fiable de la résistance à la méticilline est donc importante.

Les souches de *S. aureus* présentant une sensibilité réduite aux PRP sont classées comme suit :

- iii(i) *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM), produisant PFP2¹, une protéine fixatrice de pénicilline de faible affinité, encodée par le gène *mecA*^{3,6}.
- ii(ii) *S. aureus* à sensibilité diminuée à la méticilline (BORSA, pour « borderline oxacillin resistant *S. aureus* »), dont la résistance limitée est généralement considérée comme due à une hyperproduction de bêta-lactamase de type A¹⁰
- (iii) souches présentant des PFP modifiées en raison d'une capacité de fixation de la pénicilline modifiée ou d'une hyperproduction de PFP (MODSA, pour « modified *S. aureus* »)^{1,2}. Des souches MODSA ont été isolées de ra rares occasions seulement et leur réponse clinique au traitement par bêta-lactamines n’est donc que peu connue. En conséquence, à quelques rares exceptions près, la présence de PFP2¹ est responsable de la résistance à la méticilline lors du traitement d’infections à *S. aureus* et à SCN⁶.

Le phénotype de la résistance à la méticilline peut être très hétérogène, ce qui complique sa détection à l’aide de tests de sensibilité aux agents antimicrobiens classiques, telles que la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), les disques et le criblage sur gélose. L’exactitude de ces tests est influencée par le volume de l’inoculum, la durée et la température d’incubation, le milieu, le pH, la concentration en sels et d’autres facteurs^{8,9}. De plus, ces méthodes de culture nécessitent une incubation de 24 heures pour obtenir des résultats fiables. Les souches SCN produisent souvent de plus faibles quantités de PFP2¹ et doivent être activées par exposition à une PRP afin de produire un niveau de produit suffisant pour être détecté^{2,3,12}.

La détection du gène *mecA* est considérée comme la méthode de référence pour déterminer la résistance à la méticilline à cause de son exactitude ; toutefois cette méthode est onéreuse et nécessite un temps de travail important^{1,6}. Le test de détection de la PFP2¹ au latex d’Oxoid présente l’avantage d’une détection directe de la protéine PFP2¹ et peut être réalisé rapidement avec des frais de personnel réduits. Son exactitude est potentiellement supérieure à la détection du gène *mecA* car il n’y a pas de résultats faux positifs pour des souches possédant le gène *mecA* mais incapables de produire la protéine correspondante. De plus, le test ne détecte pas les souches hyperproductrices de bêta-lactamase ou de PFP.

Le test de PFP2¹ d’Oxoid a déjà été évalué à travers le monde, démontrant ainsi sa sensibilité et sa spécificité élevées^{4,5,11}.

Les particules de latex sensibilisées avec un anticorps monoclonal dirigé contre la PFP2¹ réagissent spécifiquement avec les staphylocoques résistants à la méticilline pour entraîner une agglutination visible à l’œil nu.

3. COMPOSANTS DU KIT

TEST LATEX	DR0901 Particules de test en latex synthétique sensibilisées avec un anticorps monoclonal dirigé contre la PFP2 ¹
CONTROL LATEX	DR0902 Particules de contrôle en latex synthétique recouvertes d’un anticorps de lapin sensibilisé avec un anticorps monoclonal de la même sous-classe d’IgG et ne présentant aucune réactivité avec des protéines de <i>S. aureus</i>
EXTRACTION REAGENT 1	DR0903 Réactif d’extraction 1
EXTRACTION REAGENT 2	DR0904 Réactif d’extraction 2
	Cartes de test Bâtonnets mélangeurs Notice d'utilisation

4. MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS

- Micropipette et embouts (50 µl)
- Anses microbiologiques (5 µl/1 µl)
- Bain-marie à ébullition ou bloc chauffant
- Centrifugeuse (1500 x g)
- Tubes de microcentrifugation (Safe-Lock)
- Désinfectant de laboratoire approprié

5. PRÉCAUTIONS

IVD Ce produit est destiné à un usage diagnostique *in vitro* uniquement.

Le temps de chauffage doit être de trois minutes. Un temps de chauffage supérieur à cinq minutes peut diminuer la sensibilité du test. Un temps de chauffage inférieur ou égal à une minute peut entraîner une agglutination non spécifique. Lors de l’aspiration du surnageant après centrifugation pour utilisation dans le test, retirer délicatement la pipette pour éviter d’emporter les matières solides se trouvant au fond du tube. Le transfert de matières solides peut être à l’origine d’une agglutination non spécifique. Bien mélanger les réactifs au latex avant utilisation pour obtenir une suspension homogène.

Les réactifs contiennent 0,095% d’azoture de sodium en tant que conservateur. L’azoture de sodium est toxique et peut réagir avec les tuyaux en plomb ou en cuivre pour former des azotures métalliques qui sont explosifs par contact. Pour éviter toute accumulation d’azotures dans la tuyauterie, rincer avec de grandes quantités d’eau immédiatement après élimination des déchets.

Respecter les précautions d’usage lors de la manipulation des échantillons car ces derniers peuvent contenir des organismes pathogènes. La procédure d’extraction peut ne pas détruire les bactéries ; les mêmes précautions doivent donc être respectées lors de la manipulation de l’extrait.

Les réactifs d’extraction 1 et 2 contiennent un agent légèrement irritant et un acide faible. Éviter tout contact direct par le port d’équipements de protection adaptés. En cas de contact avec la peau, les muqueuses ou les yeux, rincer immédiatement la zone concernée avec de grandes quantités d’eau.

6. CONSERVATION

 Stocker le kit entre 2 °C et 8 °C. Dans ces conditions, la réactivité des réactifs est conservée jusqu’à la date de péremption indiquée sur l’emballage.

7. PROCÉDURES DE CONTRÔLE

Les procédures de contrôle suivantes doivent être réalisées pour chaque nouveau lot du kit, puis une fois par semaine après ouverture.

1. **Contrôle positif**
Utiliser une souche de SARM connue, telle que la souche ATCC® 43300 (Thermo Scientific Cult-Loops™ R4609022). Suivre la méthode décrite dans la procédure de test. Vérifier que l’agglutination a lieu dans un délai de 3 minutes.
2. **Contrôle négatif**
Utiliser une souche de *Staphylococcus aureus* sensible à méticilline (SASM) connue, telles que les souches ATCC® 25923 ou ATCC® 29213 (Thermo Scientific Cult-Loops® R4607010 ou R4607011). Suivre la méthode décrite dans la procédure de test. Vérifier qu’aucune agglutination n’a lieu dans un délai de 3 minutes. Ne pas utiliser le test si les résultats obtenus avec les organismes de contrôle sont incorrects.
3. Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption.

8. REMARQUE IMPORTANTE RELATIVE À LA PROCÉDURE

Veiller à éviter toute contamination des réactifs en empêchant l’embout de dépôt de toucher l’échantillon sur la carte de réaction. Vérifier que les bouchons sont bien refermés après utilisation pour éviter toute contamination et évaporation des réactifs. Après utilisation, remettre le kit au réfrigérateur en veillant à ce que les flacons soient stockés en position verticale.

9. PRÉPARATION DES CULTURES

Les milieux de culture suivants peuvent être utilisés pour tester les colonies :

Gélose tryptone soja (gélose trypsique soja, TSA) contenant 5 % de sang de mouton (TSA sang), gélose Columbia contenant 5 % de sang de mouton, gélose Mueller-Hinton. Il est recommandé d’utiliser des cultures fraîchement préparées (18 à 24 heures). Toutefois, si nécessaire, il est possible de tester des cultures plus anciennes (24 à 48 heures) pour obtenir une croissance suffisante. Les données relatives à la performance citées dans cette notice ont été obtenues sur les milieux de culture utilisés dans le cadre de la soumission à la Food and Drugs Administration d’Amérique du Nord. Les données internes ont également montré l’efficacité du test sur des colonies de *S. aureus* prélevées sur une gélose tryptone soja et une gélose Columbia contenant 5 % de sang de cheval, ainsi que les géloses Iso-Sensitest et DSTA. Bien que ces milieux de culture soient utilisés couramment en Europe, cela n’est pas le cas en Amérique du Nord ; de ce fait, ils n’ont pas été inclus dans les essais réalisés pour produire les données présentées dans la section Caractéristiques de performance.

Exigences particulières :

Le test de PFP2¹ ne doit être utilisé que pour les espèces du genre *Staphylococcus* (coques à Gram positif). Un test de coagulase ou tout autre test équivalent doit être réalisé afin de déterminer si l’isolat est *S. aureus* ou une autre espèce du genre *Staphylococcus*.

Préparation de l’inoculum :

Pour *S. aureus*, le test peut être réalisé à partir de colonies bien isolées sur la boîte d’isolement primaire, lorsque la croissance est suffisante, ou à partir d’une sous-culture de l’isolat. Il a été démontré que les autres microbiotes pouvant être présents sur la boîte n’interfèrent pas avec le test. Pour les staphylocoques à coagulase négative, une induction est nécessaire pour stimuler la production d’une quantité suffisante de PFP2¹.

1. Préparer une suspension de bouillon de culture contenant l’organisme avec une turbidité équivalente au standard McFarland 1, puis ensemencer en stries sur de la gélose TSA sang, Columbia sang ou Mueller-Hinton. Sinon, inoculer la boîte de gélose avec plusieurs colonies distinctes et ensemencer en stries sur les quatre quadrants.
2. Placer un disque d’oxacilline (1 µg/ml) sur les stries ou dans le quadrant correspondant à l’inoculum principal.
3. Incuber à 37 °C pendant au moins 24 heures sans toutefois dépasser 48 heures.

Attention : pour éviter l’obtention de résultats faussement négatifs, ne réaliser le test que si un inoculum suffisant est disponible. Toujours prélever les organismes à proximité du disque.

10. MÉTHODE DE TEST

Procédure d’extraction de PFP2¹

1. Déposer quatre gouttes de réactif d’extraction 1 dans un tube de microcentrifugation.
2. Le test doit être réalisé sur environ 1,5 x 10⁹ cellules (3 à 5 µl). Une anse stérile de 5 µl peut être utilisée pour prélever un volume de bactéries correspondant au diamètre interne de l’anse. Sinon, une anse stérile de 1 µl peut être utilisée pour prélever plusieurs colonies dans un volume correspondant à une « cuillerée » d’une hauteur de 1 mm et de la largeur du diamètre externe de l’anse. Suspender les organismes à tester dans le tube de microcentrifugation. En présence d’aggrégats, agiter au vortex. La suspension obtenue doit être très turbide.
3. Placer le tube dans de l’eau bouillante ou un bloc chauffant (à une température SUPÉRIEURE à 95 °C) et incuber pendant trois minutes.
4. Retirer le tube de microcentrifugation et laisser refroidir jusqu’à température ambiante.
5. Ajouter une goutte de réactif d’extraction 2 dans le tube et bien mélanger.
6. Centrifuger à 1500 x g pendant cinq minutes (c.-à-d. 3000 t/min pour un rayon de rotation de 15 cm, ou 4500 t/min pour un rayon de rotation de 4,5 cm). Utiliser le surnageant pour le test.

Procédure d’agglutination au latex

1. Pour chaque surnageant à tester, étiqueter un cercle de la carte de test pour l’analyse avec le latex de test, et un autre pour le latex de contrôle.
2. Bien mélanger les réactifs au latex en les agitant vigoureusement pour homogénéiser les particules de latex avant chaque utilisation, puis déposer une goutte de latex de test ou de latex de contrôle dans chaque cercle étiqueté.
3. Ajouter 50 µl de surnageant dans le cercle de test et le cercle de contrôle, en veillant à ne pas aspirer le culot. Mélanger minutieusement le latex et le surnageant dans chaque cercle à l’aide d’un bâtonnet mélangeur.
4. Placer la carte sur un agitateur à bascule pour une durée de maximum trois minutes et observer l’agglutination sous une luminosité normale. Consigner les résultats du test et des réactions de contrôle.
5. Éliminer la carte de réaction de manière sûre en la plaçant dans un désinfectant ou avec les déchets à risque infectieux.

11. LECTURE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L’agglutination est observée dans un délai de 3 minutes avec le latex de test mais pas avec le latex de contrôle	Positif à la PFP2 ¹ (SARM)
Pas d’agglutination observée dans un délai de 3 minutes, quel que soit le réactif (latex de test ou de contrôle)	Négatif à la PFP2 ¹ (SASM)
L’agglutination est observée dans un délai de 3 minutes avec le latex de contrôle	Non déterminé

Intensité de la réaction d’agglutination

Négative (-)	= une suspension homogène de particules sans agrégats visibles
Faiblement positive (+)	= agrégats petits mais avérés sur un fond turbide
Fortement positive (++)	= petits et gros agrégats sur un fond légèrement turbide, ou gros agrégats sur un fond très transparent.

Remarque : de temps en temps, les réactions négatives ont l’apparence de grains fins ou sont d’apparence filandreuse. Dans ces cas, le niveau de turbidité du fond doit être utilisé pour interpréter les résultats. La présence d’un fond opaque indique un résultat négatif alors qu’un fond transparent doit être interprété comme un résultat positif.

12. LIMITES

En cas de résultat non déterminé, il convient de répéter le test avec un extrait fraîchement préparé. Si le résultat de ce nouveau test est encore non déterminé, la résistance à la méticilline doit être évaluée par d’autres méthodes. Des résultats faussement négatifs peuvent survenir si une quantité de culture insuffisante est utilisée pour le test. Dans ce cas, il convient de répéter le test avec une quantité de culture suffisante.

Les résultats vrais positifs correspondent généralement à des réactions de forte intensité. Bien que rares, des réactions faussement positives ont été observées, mais sont généralement de faible intensité. De tels résultats peuvent être vérifiés en répétant le test avec une culture fraîchement préparée.

Les souches de *S. aureus* modifiées (MODSA) et présentant une résistance diminuée (BORSA) ne produisent pas de PFP2⁺ et ne devraient pas générer de résultat positif dans ce test.

Certaines autres souches peuvent présenter un faible niveau de résistance à la méthicilline ou, dans de rares cas, produire de petites quantités de PFP2⁺ et donner un résultat faussement négatif.

En raison de la sensibilité et de la spécificité limitées des méthodes de test de sensibilité du CLSI pour les staphylocoques à coagulase négative⁹, notamment les souches autres que *Staphylococcus epidermidis*, les résultats du test de PFP2⁺ peuvent ne pas concorder avec les résultats des tests de sensibilité classiques. Les souches ayant une CMI ≥ 0,5 µg/ml doivent être considérées comme résistantes à la méthicilline, quels que soient les résultats du test de PFP2⁺.

13. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

1. Le test d'agglutination au latex de la protéine fixatrice de pénicilline d'Oxoid a été évalué dans quatre laboratoires géographiquement distincts avec des isolats cliniques fraîchement préparés de *Staphylococcus aureus*. 201 isolats ont été testés avec chacun des trois milieux de culture avec les méthodes CLSI et le test de PFP2⁺ d'Oxoid. Une réaction du test au latex d'Oxoid a présenté un résultat faiblement faux-positif (négatif après répétition) avec le milieu TSA sang. Toutes les réactions positives se sont avérées fortement positives, à l'exception de 3 réactions faiblement positives avec la gélose Mueller-Hinton. La sensibilité de détection de SARM du test au latex a atteint 100 % pour chaque milieu de culture ; la spécificité a atteint 99 % pour le TSA sang et de 100 % pour tous les autres milieux de culture.

Résultats des tests effectués sur 201 isolats cliniques fraîchement préparés de *S. aureus* dans 4 laboratoires :

	SARM	BORSA ^A	SASM
Nbre testé	68	3	130
Croissance sur gélose sel oxacilline (CLSI)	68	0	0
CMI ≥ 4 µg/ml (CLSI)	68	0	0
Positif sur latex, TSA sang	68	0	1 (1) ^B
Positif sur latex, Columbia sang	68	0	0
Positif sur latex, Mueller-Hinton	68 (3) ^B	0	0

^A Les CMI ont atteint 2 µg/ml et mecA s'est avéré négatif.

^B Nombre de réactions faibles indiqué entre parenthèses.

2. Évaluation de souches d'épreuve de *S. aureus* dans trois zones géographiques distinctes :
Un panel de souches d'épreuve de *S. aureus* précédemment recueillies a été évalué par trois laboratoires, et les résultats du test de PFP2⁺ ont été comparés à ceux des méthodes de détermination de SARM du CLSI. Un total de 724 souches cultivées sur un milieu TSA sang ont été testées. La sensibilité du test de PFP2⁺ d'Oxoid s'est élevée à 98,5 % et la spécificité à 100 %. Les sensibilités des méthodes de criblage sur gélose et de CMI ont atteint respectivement 98,7 % et 99,2 %, et les spécificités 90,0 % et 88,7 %. Deux souches de MODSA ont également été testées séparément ; les deux souches ont donné un résultat négatif au test au latex.

3. Évaluation des staphylocoques à coagulase négative
Deux laboratoires ont utilisé le test de PFP2⁺ sur des staphylocoques à coagulase négative après induction par disques d'oxacilline. Un des laboratoires a testé 115 souches résistantes à la méthicilline et 45 souches sensibles à la méthicilline, dont 58 isolats cliniques fraîchement préparés. La sensibilité a atteint 96,5 % pour les souches cultivées sur TSA sang, et 95,6 % pour les souches sur gélose Mueller-Hinton. La spécificité s'est élevée à 100 % pour les souches cultivées sur TSA avec sang, et 98 % pour les souches sur gélose Mueller-Hinton. L'obtention d'un inoculum de bonne qualité a été plus difficile avec la gélose Mueller-Hinton. Un deuxième laboratoire a testé 212 souches résistantes à la méthicilline et 203 souches sensibles à la méthicilline ; les inocula ont été cultivés sur gélose Columbia et la sensibilité obtenue a atteint 99,5 % et la spécificité 99,5 %.

4. Reproductibilité
Dix souches de *S. aureus* différentes et bien caractérisées (3 SARM, 3 SASM, 3 BORSA et 1 MODSA) ont été envoyées à trois laboratoires géographiquement distincts. L'envoi comprenait 5 aliquots de chaque souche, identifiés simplement par un code pour procéder aux tests en aveugle. Les résultats de tous les 150 tests se sont avérés conformes aux résultats attendus, donnant ainsi une reproductibilité de 100 %. Les trois souches positives à mecA ont donné un résultat positif à chaque test (45 tests sur 45). Les trois souches SASM et les trois souches BORSA ont donné un résultat négatif à chaque test (90 tests sur 90). La CMI des souches MODSA s'est élevée à 16 µg/ml pour l'oxacilline et un résultat négatif a été obtenu avec le test au latex d'Oxoid, comme prévu, lors de chaque test (15 tests sur 15).

14. RÉFÉRENCES

1. Bignardi G.E., Woodford N., Chapman A., et al (1996). J. Antimicrobiol. Chemother., 37:53-63.
2. Chambers H.F., (1997). Clin. Microbiol. Rev., 10:781-791.
3. Gerberding J.L., Miick C., Liu H.H., et al (1991). Antimicrob. Agents Chemother., 35:2574-2579.
4. Hussain Z., Stoakes L., Garrow S., et al (2000). J. Clin. Microbiol., 38:2051-2054.
5. Louie L., Matsumura S.O., Choi E., et al (2000). J. Clin. Microbiol., 38:2170-2173.
6. Murakami K., Minamide W., Wada K., et al (1991). J. Clin. Microbiol., 29:2240-2244.
7. Nakatomi Y., and Sugiyama J., (1998). Microbiol. Immunol., 42:739-743.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000 Approved Standard Fifth Edition (M7-A5)). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
9. Tenover F.C., Jones R.N., Swenson J.M., et al (1999). J. Clin. Microbiol., 37:4051-4058.
10. Thornsbury C. and McDougal L. (1983). J. Clin. Microbiol., 18:1084-1091.
11. Yamazumi T., Marshall S.A., Wilke W.W., et al (2001). J. Clin. Microbiol., 39:53-56.
12. York M.K., Gibbs L., Chehab F., et al (1996). J. Clin. Microbiol., 34:249-253.

15. SYMBOLES

	Référence catalogue
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Consulter le mode d'emploi
	Limites de température (temp. de stockage)
	Contenu suffisant pour <N> tests
	Code de lot (numéro de lot)
	Utiliser avant (date de péremption)
	Fabriqué par

 Le logo ATCC Licensed Derivative Emblem™, le mot servant de marque ATCC Licensed Derivative® et la marque catalogue ATCC sont des marques déposées d'ATCC. Oxoid Limited est autorisée à utiliser ces marques déposées et à vendre des produits dérivés des cultures ATCC®.



Mode d'emploi X6555C, révisé en octobre 2015 Imprimé au R.-U.



Oxoid Limited,
Wade Road,
Basingstoke,
Hampshire, RG24 8PW
Royaume-Uni

Pour obtenir une assistance technique, contactez votre distributeur local.