

Mémoire de Maîtrise en médecine

# Evaluation de trois versions d'un test rapide pour le dépistage des *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA)

## **Etudiante**

Bulliard Eléonore

## **Tuteur**

Blanc Dominique

Service de Médecine Préventive Hospitalière

## **Expert**

Cometta Alain

Service de Médecine Interne EHNV Yverdon

Lausanne, 2 décembre 2017

## **Remerciements**

Ce travail de maitrise n'aurait pas vu le jour sans l'intervention et l'aide de plusieurs personnes. Tout d'abord, je tiens à remercier Dominique S. Blanc, mon tuteur de maitrise, pour sa grande disponibilité, sa patience, son aide, ses conseils, ses avis et ses compétences théoriques. Merci à son équipe pour leur disponibilité et leur savoir-faire.

Pour leur œil de clinicienne, je remercie Laurence Senn et Estelle Moulin. Merci à Bruno Grandbastien pour son aide aux calculs des statistiques et à leur interprétation.

Enfin, merci à David Pérez, représentant de Cepheid en Suisse, pour les promptes réponses amenées à mes e-mails.

# TABLE DES MATIÈRES

1. Introduction .....	4
2. Matériel et Méthodes.....	5
2.1. Conception de l'étude et cadre clinique.....	5
2.2. Test rapide Xpert MRSA.....	5
2.3. Culture.....	6
2.4. Discordances .....	6
2.4.1. Faux positifs .....	6
2.4.2. Faux négatifs .....	7
3. Résultats.....	7
3.1. Performance des tests rapides .....	7
3.2. Discordance : test rapide positif, culture négative.....	9
3.3. Discordance : test rapide négatif, culture positive.....	12
4. Discussion .....	12
4.1. Analyse des faux positifs .....	13
4.2. Analyse des faux négatifs .....	15
4.3. Limites de l'étude .....	15
4.4. Conclusion .....	16
5. Références.....	17

## 1. Introduction

Les staphylocoques sont des bactéries commensales cocci Gram positif et catalase positive regroupant principalement 2 espèces, le staphylocoque doré (*S.aureus*) et les autres staphylocoques dits « coagulase négative ». 20 à 30% des personnes en bonne santé sont colonisées par *S.aureus*, préférentiellement au niveau nasal, mais également au niveau de la gorge, des plis inguinaux, des aisselles, etc. Cette bactérie, connue pour être une des causes majeures de diverses infections nosocomiales pyogènes, possède deux autres facteurs de virulence pouvant être utilisés au laboratoire pour son diagnostic : la coagulase et la protéine A. En 1940, la pénicilline, un antibiotique de la classe des bêta-lactamines agissant en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne en se liant à une protéine transmembranaire appelée Penicillin-Binding Protein (PBP), arrive sur le marché pour le traitement des infections dues à ce germe. 8 ans plus tard, *S.aureus* développe une première résistance consistant en une enzyme, la bêta-lactamase (pénicillinase), hydrolysant l'anneau bêta-lactame de l'antibiotique. De nouveaux antibiotiques résistants à la pénicillinase, comme la méticilline, arrivent sur le marché en 1959. Rapidement, de nouvelles souches résistantes, cette fois dues à l'acquisition du gène *mecA* ou *mecC* synthétisant une PBP modifiée appelée PBP2a maintenant l'intégrité de la paroi bactérienne, sont rapportées. Les *S.aureus* résistants sont connus sous le nom de MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*).

Les infections nosocomiales, caractérisées par des germes multi-résistants, sont devenues une préoccupation majeure dans les établissements de soins au vu de la morbi-mortalité et des coûts qui leur sont associés. De ce fait, le dépistage des porteurs de MRSA fait partie du programme de prévention des infections où la culture est considérée comme « gold standard ». Néanmoins, son délai de traitement est de minimum 2 jours. Il est donc important de disposer d'un test rapide visant cinq objectifs : un dépistage et une surveillance active de ces porteurs, le contrôle de sa propagation par la mise en place précoce de mesures de contact additionnelles, une meilleure gestion du flux de patients, l'évitement d'un isolement préemptif ayant un prix considérable et nécessitant de la place dans l'établissement, et finalement un traitement ciblé d'entrée.

Pour cette étude, nous allons nous focaliser sur 3 versions consécutives d'un test rapide par PCR en temps réel détectant et amplifiant certaines séquences spécifiques de l'ADN du *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

Notre étude comporte deux objectifs. Le premier objectif étant de définir la performance des trois tests rapides et le deuxième étant d'investiguer les discordances entre les résultats des tests rapides et la culture.

## **2. Matériel et Méthodes**

### **2.1. Conception de l'étude et cadre clinique**

L'hôpital universitaire de Lausanne (CHUV) est un centre de soins tertiaires comportant 1 468 lits où la stratégie de contrôle implique une surveillance active des porteurs de MRSA par culture.

L'étude mono-centrique a été conduite sur les résultats de dépistage des MRSA par test rapide et par culture. La performance du test MRSA G3 a été calculée grâce à une base de données pour la période entre le 1 mars 2014 et le 27 mars 2015. Celle du test MRSA Gen3 a été calculée pour la période entre le 27 mars 2015 et le 29 février 2016. Enfin, celle du test MRSA NxG a été calculée entre le 2 juin 2016 et le 31 mai 2017.

### **2.2. Test rapide Xpert MRSA**

L'échantillon de dépistage de MRSA est constitué de frottis de nez, gorge et plis de l'aîne, tous trois rassemblés dans un tube eSwab MRSA (Copan, Italie) contenant du liquide d'Amies. De ce liquide d'Amies, 100 µL ont été prélevés pour le test rapide Xpert® MRSA effectué selon les instructions du fabricant (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA). La version G3 détecte la jonction entre la cassette chromosomique staphylococcique *mec* (SCC*mec* I à IV) et *orfX*. La version Gen3 détecte le gène *mecA* ou *mecC*, ainsi que la jonction SCC*mec* (I à XI) – *orfX*. La version NxG a les mêmes cibles que la version précédente, Gen3, avec une mise à jour des amorces et des conditions PCR. De par la conception du test rapide, des faux positifs (PCR positive, culture négative) et des faux négatifs (PCR négative, culture positive) peuvent être mis en évidence.

La sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positive et négative des tests rapides G3, Gen3 et NxG ont été calculées avec l'aide du calculateur en ligne <http://faculty.vassar.edu/lowry/clin1.html>.

### 2.3. Culture

Du liquide d'Amies, 250 µL ont été mis dans un bouillon d'enrichissement m-Staphylococcus (BS) (Difco, Basel, Switzerland) et l'ensemble incubé à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, le bouillon a servi à ensemencer une plaque chromogenic MRSA-Select agar (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) elle-même ensuite incubée une nuit à 37°C. Si, à la lecture de la plaque les colonies roses sont caractéristiques, trois tests (PBP2a agglutination, Slidex Staph Plus et catalase) sont effectués, leur résultat positif permettant de confirmer la présence de MRSA. La susceptibilité à l'oxacilline est déterminée par la méthode de diffusion du disque de la céfoxitine selon les recommandations du comité Européen sur les tests de susceptibilité antimicrobienne (EUCAST(1)). Le reste des prélèvements discordants a été gardé au congélateur à -20°C.

### 2.4. Discordances

#### 2.4.1. Faux positifs

Prospectivement, les prélèvements positifs par test rapide et négatifs par culture (faux positifs) ont été traités avec l'aide d'un protocole de laboratoire créé en 2013 permettant d'approfondir les recherches sur ces souches. La première étape a été de repiquer le BS gardé au frigo sur une plaque chromogenic MRSA-Select agar et sur une plaque chromogenic *S.aureus* agar (SAID, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) incubée en aérobic. Le BS a été ensuite réincubé 24h avant d'être repiqué sur les 2 mêmes géloses lues quotidiennement. En parallèle, le prélèvement initial a été repris et inoculé dans un bouillon BHI. Celui-ci a été incubé et repiqué après 24 et 48h d'incubation. Le repiquage s'est fait sur deux géloses qui ont été incubées 48h avec une lecture journalière. Depuis juillet 2016, une plaque MRSA-Select a été doublée pour ajouter une incubation en CO<sub>2</sub>. Si des colonies vertes caractéristiques poussaient sur la plaque SAID, une PCR et un antibiogramme suivant la méthode de Kirby-Bauer étaient faits. Dans le contexte où la PCR était positive pour le SCC<sub>mec</sub> et que l'antibiogramme montrait une sensibilité à l'oxacilline, alors nous concluons à un MSSA (methicillin-sensitive *S.aureus*) avec une SCC<sub>mec</sub>-like.

Rétrospectivement, 29 prélèvements faux positifs restés inexpliqués des versions G3 et Gen3 ont été décongelés. Ils ont été mis directement en culture sur une plaque

chromogenic MRSA-Select agar dans une étuve enrichie en CO<sub>2</sub> à 37°C pendant 48h avec une lecture quotidienne.

Si, après ces analyses supplémentaires de laboratoire la culture est restée négative, nous avons analysé les dossiers de patients. De ces dossiers, nous avons retiré les informations sur l'historique MRSA, les prélèvements microbiologiques MRSA et MSSA, les infections à MRSA et les différents facteurs de risque d'une colonisation à MRSA (hospitalisation dans l'année, hospitalisation durant l'épidémie MRSA 2008-2012, les transferts d'un autre hôpital/de l'étranger/d'un établissement médico-social, les traitements antibiotiques au court du mois précédent et/ou au moment du prélèvement, le port de sonde urinaire, les plaies, les cathéters intravasculaires, les opérations durant l'hospitalisation et les dialyses).

#### **2.4.2. Faux négatifs**

Lors d'un résultat faux négatif par le test rapide, une souche de la culture est conservée pour des analyses ultérieures. Un typage moléculaire par la méthode du double locus sequence typing (DLST) a été effectuée, ainsi que la détermination du type de *SCCmec* et la présence des gènes codant pour la PVL. Depuis la version NxG, ces souches de faux négatifs sont en plus testées avec le test rapide. Le but étant de voir si le kit GeneXpert reconnaît la souche comme étant un MRSA.

### **3. Résultats**

#### **3.1. Performance des tests rapides**

Sur un total de 11523 tests rapides effectués conjointement à la culture, 1929 prélèvements ont été exclus de l'étude pour cause de refus du consentement du patient. Au total, 9594 prélèvements ont été inclus dans notre étude parmi lesquels 63 ont obtenu un résultat ininterprétable. Le taux de prélèvement positif par culture s'élevait à 4.7%. Le détail en fonction des différentes versions se trouve dans la table 1. La comparaison entre la culture et la version G3 du test rapide a été faite sur un total de 3503 prélèvements (Table 2). La comparaison entre la culture et la version Gen3 du test rapide a été faite sur un total de 2776 prélèvements (Table 3). La comparaison entre la culture et la version NxG du test rapide a été faite sur un total de 3252 prélèvements (Table 4).

**Table 1.** Récapitulatif sur le nombre de test rapide des différentes versions, les exclusions, le nombre de prélèvement inclus dans l'étude et les ininterprétables.

Version	Nb de tests rapides	Exclus	Pour l'étude	Ininterprétables
G3	4216	704 (16.7%)	3512	9 (0.25%)
Gen3	3557	763 (21.4%)	2794	18 (0.64%)
NxG	3750	462 (12.3%)	3288	36 (1.10%)

**Table 2.** Version G3 comparée à la culture

	Culture +	Culture -	Totaux
Xpert MRSA G3 +	125	52	177
Xpert MRSA G3 -	50	3276	3326
Totaux	175	3328	3503

Dans la table 2, 3.6% des prélèvements ont obtenu un résultat positif par culture et par PCR, 93.5% des prélèvements ont obtenu un résultat négatif par culture et par PCR, 1.4% ont obtenu un résultat positif par culture et négatif par PCR, 1.5% des prélèvements ont obtenu un résultat négatif par culture et positif par PCR.

**Table 3.** Version Gen3 comparée à la culture

	Culture +	Culture -	Totaux
Xpert MRSA Gen3 +	107	85	192
Xpert MRSA Gen3 -	23	2561	2584
Totaux	130	2646	2776

Dans la table 3, 3.9% des prélèvements ont obtenu un résultat positif par culture et par PCR, 92.3% des prélèvements ont obtenu un résultat négatif par culture et par PCR, 0.8% ont obtenu un résultat positif par culture et négatif par PCR, 3.1% des prélèvements ont obtenu un résultat négatif par culture et positif par PCR.



**Table 4.** Version NxG comparée à la culture

	Culture +	Culture -	Totaux
Xpert MRSA NxG +	118	27	145
Xpert MRSA NxG -	22	3085	3107
Totaux	140	3112	3252

Dans la table 4, 3.6% des prélèvements ont obtenu un résultat positif par culture et par PCR, 94.9% des prélèvements ont obtenu un résultat négatif par culture et par PCR, 0.7% ont obtenu un résultat positif par culture et négatif par PCR, 0.8% des prélèvements ont obtenu un résultat négatif par culture et positif par PCR.

La table 5 regroupe la période de dépistage du MRSA par les différentes versions du test rapide conjointement à la culture, le nombre de prélèvement inclus dans l'étude et la performance (sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative) des versions G3, Gen3 et NxG.

**Table 5.** Performance des différentes versions G3, Gen3 et NxG

	G3, % (95%IC)	Gen3, % (95%IC)	NxG, % (95%IC)
Période	01.04.14-27.03.15	27.03.15-29.02.16	02.06.16-31.05.17
Nb	3512	2794	3288
Sensibilité	71.4 (64.0 – 77.9)	82.3 (74.4 – 88.2)	84.3 (77.0-89.7)
Spécificité	98.4 (97.9 – 98.8)	<b>96.8</b> (96.0 – 97.4)	<b>99.1</b> (98.7-99.4)
VPP	70.6 (63.2 – 77.1)	<b>55.7</b> (48.4 – 62.8)	<b>81.4</b> (73.9-87.2)
VPN	98.5 (98.0 – 98.9)	99.1 (98.6 – 99.4)	99.3 (98.9-99.5)

### 3.2.Discordance : test rapide positif, culture négative

Sur un total de 514 prélèvements positifs par PCR, 164 étaient négatifs par culture. Le nombre de prélèvement faux positif par version, les MRSA retrouvés après les analyses supplémentaires de laboratoire, les MSSA SSC*mec*-like ainsi que les prélèvements restés négatifs se trouvent dans la table 6. La valeur-p a été calculée et comparée entre chaque version pour les catégories suivantes : proportion de faux positifs, proportion de MRSA identifiés après le protocole supplémentaire de laboratoire parmi tous les échantillons testés, proportion de MSSA SSC*mec*-like parmi tous les échantillons testés et proportion de négatifs parmi tous les échantillons testés.

**Table 6.** Résultats supplémentaires des faux positifs (Xpert® MRSA positif, culture négative).

	G3 (%)	Gen3 (%)	NxG (%)	p
Nombre faux positifs	52 (1.5)	85 (3.0)	27 (0.8)	A
MRSA après réensemencement du BS sur MRSA-Select	0	4	1	
MRSA après réincubation BS +24h	2	0	0	
MRSA après ensemencement du prélèvement dans BHI à 24h	6	3	0	
MRSA autres conditions	0	1*	1**	
Total MRSA après protocole supplémentaire de laboratoire	8	8	2	B
Total MSSA avec SCC <i>mec</i> -like	24	26	13	C
Total des prélèvements négatifs après protocole supplémentaire	20	51	12	D

\*Retrouvé par la culture sous CO<sub>2</sub>

\*\*Croissance uniquement sur SAID

<sup>A</sup> G3 vs Gen3 : p< 0.0001; G3 vs NxG : p=0.011; Gen3 vs NxG p< 0.000001

<sup>B</sup> G3 vs NxG : p=0.014

<sup>C</sup> Gen3 vs NxG : p= 0.0091

<sup>D</sup> G3 vs Gen3 : p < 0.00001; Gen3 vs NxG : p < 0.000001

Une diminution significative du nombre de faux positif a été retrouvée pour la version NxG par rapport à ses deux versions précédentes. La version Gen3, avec 85 prélèvements, est la version avec la plus grande proportion significative de faux positifs.

Après les analyses supplémentaires de laboratoire sur les 164 prélèvements faux positifs, 18 nouveaux cas de MRSA ont été mis en évidence. Parmi eux, 5 prélèvements se sont révélés positifs par culture en repiquant le BS sur une plaque MRSA-Select, 2 prélèvements se sont révélés positifs par culture en augmentant le temps d'incubation du BS, 9 prélèvements se sont révélés positifs par culture en inoculant l'échantillon initial dans un bouillon BHI non sélectif, 1 prélèvement s'est révélé positif après une incubation dans une étuve en CO<sub>2</sub> et 1 prélèvement s'est révélé positif avec une croissance uniquement possible sur la plaque SAID. La version NxG, avec ses 2 prélèvements MRSA, montre une diminution significative de ces cas retrouvés après les analyses supplémentaires de laboratoire comparée à la version G3.

Sur les 146 prélèvements restants, 63 se sont révélés être des vrais faux positifs (MSSA

SCCmec-like). La version NxG montre une diminution significative de ceux-ci comparée à la version Gen3.

Concernant les faux positifs restés négatifs, leur proportion est significativement plus élevée dans la version Gen3 comparée aux versions G3 et NxG. Pour ces 83 prélèvements faux positifs inexpliqués, les dossiers des patients ont été consultés (Table 7). Il est intéressant de noter que 19 (22.9%) ont eu au moins une fois un dépistage positif pour MRSA, dont 10 avant et 9 après le prélèvement en question. De plus, 10 patients ont eu un prélèvement microbiologique avec présence de MRSA, dont 5 ont développé une infection à MRSA au cours de leur vie.

**Table 7.** Données cliniques et épidémiologiques des patients ayant eu un dépistage faux positif (N=83)

	Oui	Non	Pas de prélèvement	Pas connu
Dépistage MRSA positif par culture dans le mois précédent	3	8	72	
Dépistage MRSA positif par culture dans le mois suivant	5	25	53	
Dépistage MRSA positif par culture plus d'un mois avant	13	30	40	
Dépistage MRSA positif par culture plus d'un mois après	7	24	52	
Hospitalisation antérieure	48	32	3	
Hospitalisation au CHUV pendant l'épidémie MRSA 2008-2012	37	46		
Transfert d'un établissement de soins Etranger/Suisse/EMS	41 9/10/22	42		
Traitement antibiotique le mois précédant le prélèvement	27	8		48
Traitement antibiotique au moment du prélèvement	15	35		33
Présence d'une sonde urinaire	19	41		23
Présence de plaie	30	11		42
Présence de cathéter	51	11		21
Opération	19	60		4
Dialyse	3	74		6
A été dépisté comme voisin de chambre d'un patient MRSA positif	0	0		83
Infection à MRSA	5	57		21
Prélèvement clinique avec MRSA	10			
Prélèvement clinique avec MSSA	4	79		

### 3.3.Discordance : test rapide négatif, culture positive

Sur un total de 9017 prélèvements négatifs par PCR, 95 étaient positifs par culture (Tables 2, 3 et 4). L'analyse du typage moléculaire des souches obtenues de ces prélèvements faux négatifs montre que la grande majorité ont une SCCmec détectable par le test Xpert® MRSA (I, II, IV, V et VI). La table 8 montre les différentes SCCmec de ces souches en fonction des différentes versions du test rapide. Pour la version NxG, 18 des 19 souches ont été testées avec le test rapide et étaient toutes positives.

**Table 8.** Types de SCCmec des souches MRSA obtenues par culture des prélèvements négatifs par test rapide Xpert MRSA.

	I	II	IV	V	VI	Nouvelles	Pas de typage
G3	8	15	9	3	2	8	5
Gen3	3	11	2	4	0	2	1
NxG	0	7	10	0	0	4	1

## 4. Discussion

Notre étude avait pour objectif de définir la performance de 3 versions successives du système Xpert® MRSA sur un échantillon total de 9531 prélèvements interprétables et une période de 3 x 1 an. Nous avons pu observer une sensibilité légèrement augmentée au fil des versions (G3 71.4%, Gen3 82.3%, NxG 84.3%), mais qui reste non significative. De manière significative, la spécificité était meilleure pour les versions G3 (98.4%) et NxG (99.1%) comparée à la version Gen3 (96.8%). Dans l'étude de Jacquim et al. (2), ils décrivent également la version NxG plus spécifique que la version Gen3. La valeur prédictive positive était également plus élevée avec les versions G3 et NxG, 70.6% et 81.4% respectivement, comparée à la version Gen3 55.7%. Une prévalence changeante peut expliquer une différence significative entre les versions. Cependant, le taux de MRSA parmi les *S.aureus* est restée stable dans l'ouest de la Suisse passant de 9.4% en 2014 à 8.4% en 2016 (<http://www.anresis.ch/index.php/base-de-donnees-interactive.html>). La diminution significative de la spécificité et de la valeur prédictive positive dans la version Gen3 est expliquée par une proportion significativement augmentée de faux positifs (Gen3 3.1%, G3 1.5%, NxG 0.8%). La valeur prédictive négative est, quant à elle, préservée et élevée dans les 3 versions. Dans ce contexte (VPN élevée, VPP basse), nous rejoignons l'article de Hombach et al.(3) où il est dit que la culture n'est probablement pas nécessaire lorsque la PCR est négative.

#### **4.1. Analyse des faux positifs**

A l'analyse de la table 6, nous pouvons mettre en évidence 3 catégories principales de faux positifs : les faux positifs étants des MRSA (18/164=11.0%), les MSSA SCC*mec*-like (63/164=38.4%) et les faux positifs inexplicés (83/164=50.6%).

La première catégorie est la mise en évidence des 18 cas de MRSA. Différentes hypothèses ont été émises afin de répondre à différents biais de sélection du MRSA.

Une première hypothèse peut être que l'échantillon ne contient qu'une petite quantité de MRSA et/ou que le MRSA est masqué par d'autres colonies. 5 nouveaux cas se sont révélés être des MRSA après le repiquage du BS sur une plaque MRSA-Select. Tous avaient une croissance très faible de colonies et une plaque contenait d'autres colonies pouvant masquer le MRSA.

Une deuxième hypothèse serait que le temps d'incubation est trop court. C'est pourquoi l'incubation des bouillons d'enrichissement a été prolongée jusqu'à 48h. Seulement 2/164 prélèvements primairement négatifs par culture ont montré la présence de MRSA.

Une troisième hypothèse peut être l'inhomogénéité de l'échantillon. Lors des tests, certaines parties de l'échantillon peuvent contenir plus ou moins de bactéries et donc le test se révéler positif ou négatif en fonction de la partie de l'échantillon inoculée dans le bouillon de culture ou pour le test rapide. Dans notre étude, nous pensions que ce problème était limité par l'utilisation d'un tube eSwab MRSA. L'eSwab a l'avantage d'être fait d'une tête en éponge qui permet une meilleure relâche du prélèvement dans le liquide d'Amies. Ceci permet de créer une suspension plus homogène dans le tube et ainsi un échantillon plus précis à analyser. Cependant, 9 nouveaux MRSA ont pu être mis en évidence après l'inoculation de l'échantillon dans le BHI.

Une quatrième hypothèse peut être les 6% de NaCl contenu dans le BS. Cette concentration élevée de chlorure de sodium peut inhiber possiblement certaines souches de MRSA. C'est pourquoi le prélèvement initial a été repris pour inoculer un bouillon BHI non sélectif, permettant l'enrichissement des souches de MRSA inhibées par la grande proportion de NaCl du bouillon d'origine (BS). Cette hypothèse peut également expliquer les 9 nouveaux MRSA mis en évidence.

Une cinquième hypothèse peut être la présence de souches MRSA poussant uniquement dans un environnement enrichi en CO<sub>2</sub>. Une colonie caractéristique a été observée dans un seul prélèvement. Cette souche n'était pas dépendante du CO<sub>2</sub> pour sa croissance car

l'antibiogramme incubé dans une étuve en aérobie a également montré sa résistance. Le patient était connu pour être porteur de MRSA et un prélèvement positif par culture a été obtenu une semaine plus tard.

Après réflexion, nous pensons que l'explication principale de ces 18 cas de MRSA réside dans l'inhomogénéité de l'échantillon et/ou dans une meilleure sensibilité de la PCR, plutôt que par une mise en culture différente.

La deuxième catégorie est la mise en évidence des MSSA SCC*mec*-like. Le test rapide peut détecter un MSSA avec une SCC*mec* ayant perdu le gène de résistance *mecA* ou *mecC*(4-15), une SCC-like (sans gène *mecA*) (9,11,15,16) ou une SCC-unrelated sequence (15). Dans notre étude, 38.4% des faux positifs sont dus à la présence d'une SCC*mec*-like contre 25% dans l'étude menée en 2011 par Roisin et al. (9). Nous observons une amélioration dans l'amplification spécifique de la version NxG entraînant une diminution significative de ces faux positifs MSSA SCC*mec*-like comparée à la version Gen3.

Selon Stojanov et Blanc (15), plus de la moitié des souches faussement positives dans leur étude n'était pas associée à la perte du gène *mecA*, mais principalement à certains clones dont la séquence avale au site d'insertion de la SCC*mec* est similaire à cette dernière. L'ajout de la détection de l'amplification du gène *mecA* ne résoud qu'en partie ce problème car en présence dans le prélèvement de *Staphylococcus* autre qu'*aureus* et possédant le gène *mecA*, le résultat est positif.

La troisième catégorie comprend les faux positifs restés inexpliqués. Leur proportion est significativement plus élevée dans la version Gen3 comparée aux versions G3 et NxG, probablement par la détection d'autres organismes par cette version.

Après l'analyse des dossiers, nous avons pu ressortir deux points. Le premier point fait ressortir les 19/83 ayant eu au moins une fois une culture positive pour MRSA. Ils peuvent être considérés comme probables vrais MRSA. Parmi eux, 6 ont développé une infection à MRSA aux cours de leur vie.

Le deuxième point fait ressortir que près de la moitié des prélèvements faux positifs non expliqués a été fait alors que le patient était sous antibiothérapie dans le courant du mois précédent ou au moment du prélèvement. Parmi ces prélèvements discordants, une certaine proportion peut être due à la présence d'un ADN amplifiable d'un MRSA non viable(5,6,8,9,14,17-19). Par conséquent, le patient peut être initialement considéré

comme porteur de MRSA. Dans l'article de Shenoy et al.(14) portant sur la détection des MRSA par Xpert® MRSA lorsqu'une antibiothérapie contre les staphylocoques est en place, ils mettent en évidence une tendance à un résultat positif par la PCR.

#### **4.2.Analyse des faux négatifs**

Différentes hypothèses peuvent être émises quant au résultat faux positif obtenu par les différentes versions.

La première hypothèse est la couverture des différentes *SCCmec* par les versions G3, Gen3 et NxG (5,13,20,21). Avec moins de jonctions *SCCmec-orfX* détectées dans son test, la version G3 obtient 2 fois plus de résultat faux négatif comparée aux versions Gen3 et NxG. Les versions Gen3 et NxG ont été mise à jour et contiennent la détection de tous les types de *SCCmec* (I à IX). Néanmoins, il se peut qu'il existe des variations de séquences d'ADN à l'intérieur de la même famille *SCCmec*. Ainsi, le résultat serait négatif. Cette hypothèse est peu probable car 18/19 souches retrouvées par la culture étaient positives avec le test NxG.

La deuxième hypothèse, déjà discutée dans l'analyse des faux positifs, est celle d'un échantillon inhomogène (5). Après avoir démontré sur la version NxG le résultat positif des souches testées, nous pensons qu'une grande partie des faux négatifs entre dans cette hypothèse.

La troisième hypothèse serait la présence d'inhibiteurs de PCR dans le prélèvement, par exemple suite à l'utilisation d'un bain de bouche, d'un spray nasal, etc. Dans les instructions du fabricant de la version NxG, il est noté qu'une étude a été conduite sur les substances possiblement présentes au niveau nasal et interférant avec la PCR. Aucun résultat faussement négatif ou ininterprétable n'a été rapporté.

#### **4.3.Limites de l'étude**

Notre étude comporte des limites. L'une d'entre elle est l'utilisation d'un tube eSwab alors que le système Xpert® MRSA G3 et Gen3 est uniquement validé pour un tube Rayon Swab. L'eSwab, validé pour la version NxG du test rapide, a une tête en éponge. Ceci permet une suspension plus homogène de l'échantillon dans le liquide d'Amies. De plus, nous avons regroupé le frottis de nez, de gorge et du plis inguinal alors que le système Xpert® MRSA est validé pour le frottis de nez uniquement. Cependant, l'étude de Blanc et al. (6) montre qu'il n'y aurait pas d'influence sur l'efficacité du test rapide autre qu'une légère diminution de la sensibilité.

En ce qui concerne le repiquage des prélèvements congelés, une limite a été la quantité de liquide restant dans le eSwab. De plus, il se peut que la congélation à -20°C rende certaines souches de MRSA non revivifiables.

D'autre part, nous avons rencontré des difficultés lors de la recherche dans les dossiers informatisés des patients où toutes les informations ne figurent pas ou ne sont pas clairement indiquées et sujettes à interprétation.

Enfin, notre étude se limite à un centre hospitalier. Une généralisation de nos résultats nécessiterait une étude dans un cadre plus large comprenant d'autres centres hospitaliers.

#### **4.4.Conclusion**

Le système Xpert® MRSA est un test facile d'utilisation plus onéreux que la culture. Néanmoins, il permet de réduire le délai de prise en charge du patient afin de mener à bien un programme efficace de prévention. De ce fait, la PCR montre de potentiels avantages au niveau médical, économique et organisationnel. Cependant, pour déterminer son utilité, il est important de calculer la performance d'un nouveau test dans les conditions de l'endroit. Dans notre étude menée au centre hospitalier universitaire vaudois sur les versions G3, Gen3 et NxG, nous avons pu observer une amélioration de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives positive et négative de la dernière version du test Xpert® MRSA. Celui-ci est plus fiable que ses versions précédentes avec une diminution importante du nombre de faux positifs, aussi bien des souches négatives que des souches possédant une SCC*mec*-like, ainsi qu'une diminution du nombre de faux négatifs. Par conséquent, nous pouvons conclure à une amélioration significative de la version NxG.

En ce qui concerne les discordances avec PCR positive et culture négative, nous avons pu mettre en évidence 22.6% des faux positifs pouvant finalement être considérés comme probables porteurs de MRSA et 38.4% étant de vrais faux positifs par la présence de souches MSSA SCC*mec*-like. De ce fait, lorsque le test rapide est positif et la culture revient négative, avant que le laboratoire mette en place une détection des MSSA SCC*mec*-like, le patient devrait être considéré comme porteur de MRSA.



## 5. Références

1. CASFM\_EUCAST\_V1\_2015.pdf [Internet]. [cited 2017 Feb 14]. Available from: [http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM\\_EUCAST\\_V1\\_2015.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_EUCAST_V1_2015.pdf)
2. Jacqmin H, Schuermans A, Desmet S, Verhaegen J, Saegeman V. Performance of three generations of Xpert MRSA in routine practice: approaching the aim? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017 Aug 1;36(8):1363–5.
3. Hombach M, Pfyffer GE, Roos M, Lucke K. Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Specimens from Various Body Sites: Performance Characteristics of the BD GeneOhm MRSA Assay, the Xpert MRSA Assay, and Broth-Enriched Culture in an Area with a Low Prevalence of MRSA Infections. *J Clin Microbiol*. 2010 Nov 1;48(11):3882–7.
4. Ciardo DE, Burger S, Payer M, Lee C, McCallum N. GeneXpert Captures Unstable Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Prone to Rapidly Losing the *mecA* Gene. *J Clin Microbiol*. 2010 Aug;48(8):3030–2.
5. Laurent C, Bogaerts P, Schoevaerds D, Denis O, Deplano A, Swine C, et al. Evaluation of the Xpert MRSA assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nares swabs of geriatric hospitalized patients and failure to detect a specific SCCmec type IV variant. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 May 29;29(8):995–1002.
6. Blanc DS, Nahimana I, Zanetti G, Greub G. MRSA screening by the Xpert MRSA PCR assay: pooling samples of the nose, throat, and groin increases the sensitivity of detection without increasing the laboratory costs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Nov 10;32(4):565–8.
7. Blanc DS, Basset P, Nahimana-Tessemo I, Jaton K, Greub G, Zanetti G. High Proportion of Wrongly Identified Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carriers by Use of a Rapid Commercial PCR Assay Due to Presence of Staphylococcal Cassette Chromosome Element Lacking the *mecA* Gene. *J Clin Microbiol*. 2011 Feb 1;49(2):722–4.
8. Wolk DM, Picton E, Johnson D, Davis T, Pancholi P, Ginocchio CC, et al. Multicenter Evaluation of the Cepheid Xpert Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Test as a Rapid Screening Method for Detection of MRSA in Nares. *J Clin Microbiol*. 2009 Mar;47(3):758–64.
9. Roisin S, Laurent C, Nonhoff C, Deplano A, Hallin M, Byl B, et al. Positive predictive value of the Xpert MRSA assay diagnostic for universal patient screening at hospital admission: influence of the local ecology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Aug 28;31(5):873–80.
10. Donnio P-Y, Oliveira DC, Faria NA, Wilhelm N, Le Coustumier A, de Lencastre H. Partial Excision of the Chromosomal Cassette Containing the Methicillin Resistance Determinant Results in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug;43(8):4191–3.
11. Wong H, Louie L, Lo RYC, Simor AE. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates with a Partial or Complete Absence of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements. *J Clin Microbiol*. 2010 Oct;48(10):3525–31.
12. Nulens E, Descheemaeker P, Deurenberg RH, Stobberingh EE, Gordts B. Contribution of Two Molecular Assays as Compared to Selective Culture for MRSA Screening in a Low MRSA Prevalence Population. *Infection*. 2010 Feb 27;38(2):98–101.

13. Mendes RE, Watters AA, Rhomberg PR, Farrell DJ, Jones RN. Performance of BD Max StaphSR for Screening of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates among a Contemporary and Diverse Collection from 146 Institutions Located in Nine U.S. Census Regions: Prevalence of *mecA* Dropout Mutants. *J Clin Microbiol*. 2016 Jan 1;54(1):204–7.
14. Shenoy ES, Noubary F, Kim J, Rosenberg ES, Cotter JA, Lee H, et al. Concordance of PCR and Culture from Nasal Swabs for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Setting of Concurrent Antistaphylococcal Antibiotics. *J Clin Microbiol*. 2014 Apr 1;52(4):1235–7.
15. Stojanov M, Blanc DS. Characterization of the staphylococcal cassette chromosome *mec* insertion site in 108 isolates lacking the *mecA* gene and identified as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by the Xpert MRSA assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Jun 7;33(11):1967–71.
16. Jonckheere S, Van Vaerenbergh K, Boel A, Vankeerberghen A, De Beenhouwer H. How is the Xpert MRSA Gen 3 assay (Cepheid) performing on pooled eSwab medium? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Nov;83(3):219–21.
17. Wolk DM, Struelens MJ, Pancholi P, Davis T, Della-Latta P, Fuller D, et al. Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) in Wound Specimens and Blood Cultures: Multicenter Preclinical Evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA Skin and Soft Tissue and Blood Culture Assays. *J Clin Microbiol*. 2009 Mar;47(3):823–6.
18. Wu et al. Point-of-care universal screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a cluster-randomized cross-over trial [Internet]. [cited 2017 Nov 8]. Available from: [https://ac.els-cdn.com/S0195670116303644/1-s2.0-S0195670116303644-main.pdf?\\_tid=8be820b2-c45b-11e7-98d2-00000aab0f27&acdnat=1510128492\\_6e73e07537db1d03c979c9f2922ae072](https://ac.els-cdn.com/S0195670116303644/1-s2.0-S0195670116303644-main.pdf?_tid=8be820b2-c45b-11e7-98d2-00000aab0f27&acdnat=1510128492_6e73e07537db1d03c979c9f2922ae072)
19. Nielsen XC, Madsen TV, Engberg J. Evaluation of Xpert MRSA Gen 3 and BD MAX MRSA XT for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening in a routine diagnostic setting in a low-prevalence area. *J Med Microbiol*. 2017;66(1):90–5.
20. Lepointeur M, Delattre S, Cozza S, Lawrence C, Roux A-L, Rottman M. Comparative Evaluation of Two PCR-Based Methods for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Xpert MRSA Gen 3 and BD-Max MRSA XT. *J Clin Microbiol*. 2015 Jun;53(6):1955–8.
21. Becker K, Denis O, Roisin S, Mellmann A, Idelevich EA, Knaack D, et al. Detection of *mecA*- and *mecC*-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates by the New Xpert MRSA Gen 3 PCR Assay. *J Clin Microbiol*. 2016 Jan 1;54(1):180–4.