

Dépistage de *Candida auris* par PCR de détection en temps réel

PROTOCOLES DE LABORATOIRE LSPQ

AVIS ET RECOMMANDATIONS

AOÛT 2024 (VERSION 1.0)

SOMMAIRE

Méthodologie d'élaboration du protocole	2
Principe de la méthode	3
Spécimens	3
Matériel requis	5
Exposé de la procédure	6
Contrôle de la qualité	8
Analyse et interprétation des résultats	8
Limites de la méthode	11
Références	12
Annexes	13

AVANT-PROPOS

L'Institut national de santé publique du Québec est le centre d'expertise et de référence en matière de santé publique au Québec. Sa mission est de soutenir le ministre de la Santé et des Services sociaux dans sa mission de santé publique. L'Institut a également comme mission, dans la mesure déterminée par le mandat que lui confie le ministre, de soutenir Santé Québec, la Régie régionale de la santé et des services sociaux du Nunavik, le Conseil cri de la santé et des services sociaux de la Baie James et les établissements dans l'exercice de leur mission de santé publique.

La collection *Avis et recommandations* rassemble sous une même bannière une variété de productions scientifiques qui apprécient les meilleures connaissances scientifiques disponibles et y ajoutent une analyse contextualisée recourant à divers critères et à des délibérations pour formuler des recommandations.

Le présent document du Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ) décrit un protocole de dépistage par PCR en temps réel de *Candida auris*. Il a été élaboré à la demande des microbiologistes-infectiologues et de la Direction de la biovigilance et de la biologie médicale (DBBM) dans le cadre des activités de soutien au réseau hospitalier offert par le LSPQ et d'un financement par les activités régulières du LSPQ. Ce document s'adresse aux microbiologistes-infectiologues, aux technologues médicaux œuvrant dans les laboratoires diagnostiques en microbiologie du réseau de la Santé du Québec.

Nous espérons qu'il vous sera utile.

MISE EN CONTEXTE

Candida auris est une levure pathogène avec un fort potentiel de multirésistante. Depuis 2012, on constate son émergence rapide et simultanée partout dans le monde. *C. auris* est maintenant rapportée dans plus de 50 pays sur six continents. Aux États-Unis, *C. auris* est désormais bien implantée avec 8131 cas (d'infection et de colonisation)^{1,2} en 2022 comparativement à seulement 12 cas au Canada pour la même période. Cette levure est en cause dans plusieurs écloisions nosocomiales en milieux de soins et sa létalité est élevée lorsque l'infection est invasive. Elle colonise la peau et les muqueuses, se transmet entre personnes et peut persister dans l'environnement plusieurs semaines. On estime qu'environ 5-10 % des patients colonisés finiront par faire une fongémie.³ Toutes ces caractéristiques en font une levure particulièrement virulente. La détection de l'état de porteur permet de mettre en place des mesures de prévention et de contrôle des infections afin de limiter sa propagation en milieu hospitalier.

La PCR de détection en temps réel présentée ici permet de confirmer la présence de *C. auris* et l'état de porteur chez le patient ayant été dépisté (aines/aisselles et/ou narines) avec un écouvillon liquide AMIES. Elle peut aussi servir au dépistage environnemental de *C. auris* dans un milieu de soins.

Le dépistage par PCR en temps réel s'avère avantageux comparativement au dépistage sur gélose chromogénique, car il réduit les délais d'analyse (la culture est évitée, la PCR pouvant être effectuée directement sur le spécimen prélevé) et il permet le dépistage simultané sur de nombreux patients (ex. lors d'écloisions) sans avoir de problématiques de gestion de commande et de péremption de milieu associées au dépistage par la culture sur géloses chromogéniques.

1 MÉTHODOLOGIE D'ÉLABORATION DU PROTOCOLE

Cette procédure décrit le protocole de dépistage par PCR en temps réel de *Candida auris* sur la plateforme QuantStudio basé sur celui des CDC et du laboratoire Wadsworth de l'État de New York.^{4,5} Il s'agit d'un protocole maison ayant été validé et développé au laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ) en respect de la norme ISO 15189, en collaboration avec le Comité sur les analyses de diagnostic moléculaire en microbiologie (CADMM). Les données de validation sont disponibles sur demande.

Ce document a été enrichi par une consultation auprès de microbiologistes experts en mycologie et a fait l'objet d'une révision par les pairs.

2 PRINCIPE DE LA MÉTHODE

- La PCR de détection en temps réel présentée ici permet de confirmer la présence de *C. auris* et l'état de porteur chez le patient ayant été dépisté (aines/aisselles et narines) avec un écouvillon liquide Amies. Elle peut aussi servir au dépistage environnemental de *C. auris* dans un milieu de soins;
- Une fois récoltés, les spécimens sont soumis à une digestion à la protéinase K. L'extraction d'acide nucléique est ensuite effectuée sur un extracteur d'acides nucléiques automate. La PCR cible la région ITS2 de l'ADN ribosomal de *C. auris*, un gène conservé et présent en plusieurs copies dans le génome de cette levure. Un témoin d'amplification interne (TAI) spécifique à la séquence du bactériophage MS2 est inclus dans la PCR et permet de détecter l'inhibition de la PCR;
- Le protocole est inspiré de Leach et al., 2018 et de la PON des CDC^{4,5}. Les amorces et la sonde pour la cible ITS2 sont les mêmes que celles dans ces deux références alors que la cible du témoin d'amplification a été remplacée par une séquence d'ADN du bactériophage MS2. La séquence des amorces et des sondes utilisées est fournie à l'annexe 1 (fluorophore FAM pour ITS2 et ATTO647 pour cible MS2). Le protocole de digestion à la protéinase K se trouve à l'annexe 2;
- La PCR en temps réel est réalisée avec la trousse UCP probe kit de Qiagen TM sur les thermocycleurs QuantStudio TM (Thermo Fisher Scientific).

3 SPÉCIMENS

3.1 Échantillons acceptés et volume requis

- Un volume minimum de 250 µL de spécimen dans milieu de transport Amies (écouvillon avec milieu de transport Amies liquide de type eSwab™ réf: 220245 ou équivalent – sans charbon) est requis pour l'analyse.

Note : Les autres milieux de transport n'ont pas été évalués et ne sont pas considérés acceptables. Les écouvillons dans milieu de transport solide Amies gélosés ou milieu de transport semi-solide doivent être refusés. L'agar présente dans ces milieux inhibe l'amplification PCR.

3.2 Prélèvement et transport

Pour le prélèvement, le comité des infections nosocomiales du Québec (CINQ) recommande d'effectuer au minimum un prélèvement au niveau des aisselles et aines (en frottant 5 fois chaque côté) avec un seul écouvillon.⁷ L'ajout du nez/ des narines (optionnel) permet d'augmenter la sensibilité du dépistage.^{5,6} Procédez dans l'ordre nez (narines), aisselle et aines si le même écouvillon est utilisé.

Se référer aux recommandations du CINQ- « Mesures de prévention et de contrôle du *Candida auris* dans les milieux de soins » pour plus de détails sur les modalités de dépistage

<https://www.inspq.qc.ca/publications/3540>.

Spécifiquement :

1. Ouvrez l'emballage de l'écouvillon en saisissant la tige à l'extrémité opposée de l'embout souple. Laissez l'écouvillon dans l'emballage pour éviter toute contamination. Ouvrir l'emballage contenant le tube de milieu de transport;
2. Retirez l'écouvillon de l'emballage. Écouvillonner en frottant fermement au moins 5 fois de chaque côté au niveau des aisselles et d'aines. Les narines pourraient également être écouvillonnées selon les directives locales du milieu de soins;
3. Insérer l'écouvillon dans le tube de milieu de transport;
4. Identifier l'écouvillon/l'échantillon et la requête selon la procédure en vigueur;
5. Transporter l'échantillon en moins de 96 heures dans un contenant de catégorie B en le gardant réfrigéré entre 2 – 8 °C ou à température de la pièce. Assurez-vous qu'il est protégé de toute chaleur excessive pendant le transport;
6. Les échantillons reçus doivent être réfrigérés 2 – 8 °C ou congelés à leur arrivée au laboratoire. Les écouvillons sont considérés stables jusqu'à 1 semaine si réfrigérés et > 6 mois si congelés ≤ -55 °C;
7. Après l'analyse, les échantillons sont conservés à ≤ -55 °C.

NOTE : *C. auris* s'avère très stable dans le milieu de transport Amies liquide. Dans des tests de stabilité effectués au LSPQ sur des échantillons simulés, aucune perte de viabilité n'a été constatée pour *C. auris* après 4 semaines d'incubation pour des écouvillons Amies maintenus à la température de la pièce, réfrigérés ou congelés (≤ -70 °C). À température pièce, on a d'ailleurs constaté que la charge de *C. auris* augmentait dans le temps dans le milieu Amies liquide. Cela reste par contre à vérifier sur des spécimens provenant de patients.

3.3 Réception du spécimen et critères de rejet

La réception doit se faire selon les procédures usuelles propres à chaque laboratoire.

Rejeter les échantillons suivants :

- Tout autre spécimen autre qu'un écouvillon dans milieu de transport Amies liquide ou aliquots de ceux-ci;
- Selon les critères de rejet usuels (fuite du spécimen, contenant endommagé, spécimen sans requête ou identifiant, mauvaises conditions de conservation, milieu de transport périmé);

- Spécimen n'a pas été testé dans les délais requis (il y a plus de 4 jours avant la réception au laboratoire sans avoir été congelé);
- Dans le cas d'un rejet, celui-ci doit être signalé au clinicien requérant en indiquant la cause au rapport.

4 MATÉRIEL REQUIS

4.1 Appareils et consommables

- Micropipettes pour des volumes variant de 2 µL à 1000 µL;
- Embouts tamponnés stériles de capacité de 2 µL à 1000 µL;
- Tubes de 1,5 mL ou 2,0 mL stériles avec bouchons vissés, de type Sarstedt;
- Bloc chauffant réglé à 65 °C avec ou sans agitation;
- Microcentrifugeuse;
- Agitateur-mélangeur à vortex;
- Thermocycleur de PCR en temps réel QuantStudio 5 de Thermo Fisher Scientific, ou appareil équivalent;
- Pellicule adhésive pour PCR (MicroAmp Optical Adhesive Film - ABI, no. cat :4311971 ou équivalent);
- Spatule pour sceller le ruban optique à la plaque 96 puits;
- Plaque PCR 96 puits (MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate 0,1 ml -ABI, no. cat :4346907 ou équivalent).

4.2 Trousse et réactifs

- Mélange réactionnel UCP Probe PCR Kit™ (Qiagen no.cat :208214);
- Solution d'amorces et de sondes (voir annexe 3 pour préparation);
- Témoin d'amplification interne - TAI (ADN synthétique d'une région du Phage MS2- voir les annexes 4 et 5 pour la préparation);
- Échantillons contrôles positifs et négatifs d'extraction (voir les annexes 6 et 7 pour la préparation du contrôle positif).

5 EXPOSÉ DE LA PROCÉDURE

5.1 Contrôles négatifs et positifs

Un échantillon contrôle positif et un échantillon contrôle négatif (tampon TE pH 8,0) sont ajoutés à chaque série d'analyse, à l'étape d'extraction (voir les annexes 6 et 7 la préparation du contrôle d'extraction positif).

5.2 Pré-traitement des échantillons à protéinase

Préparer 200 µL de la solution de Protéinase K – Tris-HCL (voir annexe 2) pour chaque échantillon à traiter au réactif.

1. Démarrer le bloc chauffant et régler la température à 65 °C;
2. Dégeler les échantillons à température pièce au besoin;
3. Bien mélanger au vortex (5 – 10 secondes) les écouvillons dans leur milieu de transport ou les aliquots de ceux-ci;
4. Sous une enceinte de sécurité biologique (ESB), déposer 200 µL des échantillons et contrôles dans des tubes de type Sarstedt 1,5 mL;
5. Ajouter, à chacun des tubes, 200 µL de la solution protéinase K (annexe 2);
6. Mélanger par inversion 4 à 5 fois. Ne pas vortexer pour éviter la formation de mousse;
7. Incuber à 65 °C pendant 10 minutes
 - a. Dans le cas d'un bloc chauffant agitateur régler à une vitesse de 300 RPM;
 - b. Pour bloc chauffant sans agitation, inverser les tubes (4 - 5 fois) pour mélanger après 5 min et la fin de l'incubation.

5.3 Extraction des acides nucléiques

Procéder à l'extraction des acides nucléiques sur l'automate EMAG (bioMérieux) selon le protocole du manufacturier en utilisant un volume de 400 µL traité à la protéinase K (tel que décrit ci-dessus) et 2 mL de tampon de lyse suivi d'une élution dans 60 µL de tampon d'élution. Placer les extraits à 2 à 8 °C si ceux-ci utilisés dans un délai de 48 h ou congeler (< - 20 °C) pour conservation de plus de 48 h.

5.4 Amplification par PCR avec détection en temps réel

Démarrer le thermocycleur de PCR en temps réel QuantStudio au local post-PCR.

1. Au local des réactifs, à l'aide du registre fourni à l'annexe 3, préparer le mélange réactionnel. **Tous les échantillons doivent être testés en triplicata.** La recette du mélange d'amorces et sondes y est aussi fournie;
2. Au local pré-PCR, ajouter le TAI MS2 au mélange réactionnel et mélanger. Distribuer 15 µL à température pièce de mélange réactionnel par puit dans une plaque de 96 puits sur un portoir à plaque PCR selon le schéma de travail établi;
3. Ajouter 5 µL de chaque préparation d'extraits d'acides nucléiques au mélange réactionnel, selon le schéma de travail établi.

Note : N'ouvrir qu'un seul tube ou languette de bouchons à la fois pour éviter la contamination;

4. Sceller la plaque 96 puits en apposant la pellicule autocollante (ex. MicroAmp Optical Adhesive Film - ABI, no cat: 4311971 ou similaire);

Note : Prendre soins de ne pas toucher au ruban optique avec les doigts. Ne pas utiliser de gants poudrés;

5. Passer au local post-PCR, vortexer la plaque de 96 puits brièvement (5 – 10 s) puis centrifuger brièvement la plaque (lorsque la vitesse maximale de la micro-centrifugeuse de banc de travail est atteinte – environ 2000 G);
6. Placer la plaque 96 puits dans le bloc d'amplification de l'appareil pour détection en temps réel, et démarrer la méthode préprogrammée suivante

Tableau 1 Méthode de programmation

Cycle pour <i>C. auris</i>			
Run mode : FAST (sans ROX)			
95 °C	2 min		
95 °C	20 sec		
95 °C	3 sec	45 cycles	
 60 °C	30 sec		

Note : les thermocycleurs QuantStudio sont validés pour fonctionner à une température inférieure à 30 °C. Assurez-vous que la température de la pièce est contrôlée.

6 CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Les informations relatives à la préparation des contrôles positifs (voir annexe 6) sont consignées aux registres à l'annexe 7. Pour le contrôle négatif il suffit d'utiliser tampon TE pH 8,0 (10mM Tris-HCl et 1mM EDTA•Na₂). Les contrôles d'extraction sont conservés dans des boîtes distinctes à ≤ -55 °C.

Tableau 2 Contrôles

Contrôles	Résultats attendus*	
	MS2	<i>C. auris</i> ITS2
Contrôle négatif d'extraction	Ct 27 à 35	Ct \geq 40
Contrôle positif d'extraction	Ct 27 à 35	Ct 20 à 32

Notes : Lorsque la Ct est \leq 40, les courbes d'amplification doivent correspondre à une cinétique exponentielle.

Si les valeurs Ct des contrôles négatifs et positifs ne sont pas comprises dans la plage attendue, la série est invalidée et tous les échantillons et contrôles doivent être extraits et analysés de nouveau.

Consigner toute situation anormale pour les contrôles et reprendre les analyses au besoin.

7 ANALYSE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

7.1 Analyse

Le résultat des analyses avec détection en temps réel est exprimé par une valeur de cycle threshold [Ct] (cycle seuil). Celle-ci représente le nombre de cycles d'amplification par PCR requis pour obtenir une émission de fluorescence détectable. Le signal de fluorescence dans l'échantillon est directement proportionnel à la quantité de produits PCR spécifiques amplifiés par la réaction.

- Inscrire une valeur seuil fixe (threshold Δ Rn) à 10 000 pour chacune des cibles;
- Sauvegarder une copie du fichier lorsque toutes les modifications ont été faites aux données brutes pour que la série soit disponible pour le responsable avec les valeurs finales;
- Générer un rapport permettant d'avoir les valeurs Ct et autres informations de la série d'analyse;
- Remettre à la personne responsable de l'analyse et validation des résultats.

7.2 Interprétation des résultats

L'analyse est valide si les contrôles positifs et négatifs sont conformes aux résultats attendus.

- Si le contrôle négatif s'avère positif ($Ct < 40$), celui-ci est non valide, une contamination des échantillons est possible et toute la série d'échantillons et de contrôles devra être répétée. Le responsable de l'analyse pourra par contre décider de rapporter les résultats de patients négatifs et répéter que les positifs à sa discrétion;
- Si le contrôle positif s'avère négatif ($Ct \geq 40$ ou « UND Undetermined »), celui-ci est non valide, toute la série d'échantillons et de contrôles devra être répétée. Le responsable de l'analyse pourra par contre décider de rapporter les résultats de patients positifs et répéter que les négatifs à sa discrétion.

Le témoin d'amplification interne (TAI) doit être détecté pour rapporter un résultat négatif, sans quoi ce résultat est invalide et devra être répété. Si le TAI n'est pas détecté à la reprise un résultat « indéterminé ou invalide » sera rapporté. Un commentaire suggérant de resoumettre un nouvel échantillon devra être ajouté au rapport dans ces cas-là.

Chaque échantillon est testé en triplicata. Un résultat est considéré positif si la cible ITS2 de *C. auris* et celle du phage MS2 sont toutes deux détectées. Le TAI n'a pas besoin d'être positif pour rapporter un résultat positif *C. auris* (une charge élevée de *C. auris* pouvant inhiber l'amplification du TAI MS2). Si discordance dans les résultats en triplicata, le résultat obtenu de 2 sur 3 répétitions devra être rapporté.

La courbe d'amplification (en mode linéaire) doit correspondre à une cinétique exponentielle et ressembler à celles des contrôles positifs.

Colliger les registres signés, les graphiques et le rapport produits par le logiciel QuantStudio 5 dans le secteur.

Les actions à prendre en fonction des valeurs de Ct de l'échantillon clinique sont résumées dans le tableau ci-dessous.

7.3 Actions à prendre en fonction des résultats obtenus

Tableau 3 Actions à prendre et résultats à rapporter au rapport

<i>Cauris</i> ITS2 (FAM)	CI (Q670)	Action à prendre	Résultat à rapporter au rapport
Ct ≤ 37 (≥ pour 2 sur 3 Replicata)	Toutes Ct	Émettre le résultat (après vérification de la courbe d'amplification)	<i>Candida auris</i> détecté Commentaire à ajouter : <i>C. auris</i> détecté. S'il s'agit d'un nouveau cas, veuillez aviser le LSPQ et procéder à l'isolement de la souche. Celle-ci devra ensuite être envoyée au LSPQ pour test de sensibilité et typage par séquençage génomique.
37,1 < Ct ≤ 40 (≥ pour 2 sur 3 Replicata)	Toutes Ct	Voir l'allure de la courbe en log	Belle courbe exponentielle = <i>Candida auris</i> détecté Courbe équivoque = <i>Candida auris</i> indéterminé Commentaire à ajouter : <i>C. auris</i> détecté. S'il s'agit d'un nouveau cas, veuillez aviser le LSPQ et procéder à l'isolement de la souche. Celle-ci devra ensuite être envoyée au LSPQ pour test de sensibilité et typage par séquençage génomique. Courbe non-exponentielle = <i>Candida auris</i> non détecté
Négatif (Undet.) * (≥ pour 2 sur 3 Replicata)	Ct 27 - 35	Émettre le résultat	<i>Candida auris</i> non détecté
Négatif (Undet.) * (≥ pour 2 sur 3 Replicata)	Négatif (Undet.) * (≥ pour 2 sur 3 Replicata)	Répéter l'analyse ou émettre après reprise	Résultat invalide Commentaire à ajouter : Inhibition de la PCR de détection observée. Nous faire suivre un nouvel échantillon au besoin.
Ct ≤ 40 avec courbe d'amplification atypique - non exponentielle (≥ pour 2 sur 3 Replicata)	Toutes Ct	Répéter l'analyse ou émettre	Indéterminé Commentaire à ajouter : Nous faire suivre un nouvel échantillon au besoin

* Undet : undetermined (résultat négatif tel que rapporté par l'appareil QuantStudio 5 de ThermoFisher)

Notes : Lorsque l'intégrité du spécimen est douteuse (Ct gène du TAI MS2 > 35), une nouvelle extraction d'ADN peut être effectuée à la demande du responsable.

Tout profil d'amplification qui diffère des situations susmentionnées est évalué par le responsable de cette analyse.

7.4 Valeurs d'alertes ou critiques

L'identification d'une souche de *C. auris* est une valeur épidémiologique urgente qui doit être rapportée immédiatement au microbiologiste-infectiologue de garde au laboratoire, au service de prévention et de contrôle des infections (SPCI) et à l'unité de soins concernée si le patient est hospitalisé.

8 LIMITES DE LA MÉTHODE

- Pour le diagnostic *in vitro* uniquement;
- Protocole maison (LDT) avec trousse non homologuée. Une validation locale est requise pour utilisation en clinique;
- Des résultats faux négatifs peuvent survenir si le microorganisme est présent à une concentration inférieure à la sensibilité analytique du test ou lorsque la cible détectée présente des mutations, des insertions, des délétions ou des réarrangements de son génome ou lorsque le test est réalisé très tôt au cours de la maladie. La limite de détection calculée au LSPQ a été déterminée à 5 UFC / mL;
- Comme avec d'autres tests, des résultats faux positifs peuvent survenir. Dans certains cas, une répétition du test, ou le renouvellement du test avec un autre appareil peut être indiqué;
- Ce test est qualitatif et ne fournit pas de valeurs quantitatives de la quantité de *C. auris* détecté.

RÉFÉRENCES

1. Lyman M, Forsberg K, Sexton DJ, Chow NA, Lockhart SR, Jackson BR, Chiller T. (2023) Worsening Spread of *Candida auris* in the United States, 2019 to 2021. *Ann Intern Med.* 176(4): 489-495. PMID: 36940442.
2. Tracking *C. auris*. Site des CDC <https://www.cdc.gov/candida-auris/tracking-c-auris/index.html> 24 avril 2024
3. Adams E, Quinn M, Tsay S, Poirot E, Chaturvedi S, Southwick K, Greenko J, Fernandez R, Kallen A, Vallabhaneni S, Haley V, Hutton B, Blog D, Lutterloh E, Zucker H; *Candida auris* Investigation Workgroup. (2018) *Candida auris* in Healthcare Facilities, New York, USA, 2013-2017. *Emerg Infect Dis.* (10):1816-1824. PMID: 30226155.
4. Leach L, Zhu Y, Chaturvedi S. Development and Validation of a Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of *Candida auris* from Surveillance Samples. *J Clin Microbiol.* 2018 Jan 24;56(2): e01223-17. PMID: 29187562.
5. Real-Time PCR Based Identification of *Candida auris* Using Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Platform (oct 2022) <https://www.cdc.gov/fungal/lab-professionals/Real-time-PCR-based-Id-C-auris.html>
6. Zhu Y, O'Brien B, Leach L, Clarke A, Bates M, Adams E, Ostrowsky B, Quinn M, Dufort E, Southwick K, Erazo R, Haley VB, Bucher C, Chaturvedi V, Limberger RJ, Blog D, Lutterloh E, Chaturvedi S. Laboratory Analysis of an Outbreak of *Candida auris* in New York from 2016 to 2018: Impact and Lessons Learned. *J Clin Microbiol.* 2020 Mar 25;58(4): e01503-19. PMID:31852764.
7. Recommandations du CINQ : Mesures de prévention et de contrôle du *Candida auris* dans les milieux de soins (juillet 2024) <https://www.inspq.qc.ca/publications/3540>

ANNEXE 1 SÉQUENCES DE SONDÉS ET AMORCES

Tableau 1 Amorces et sondes utilisés

Cible	Nom	Type	Séquences (5' → 3') des amorces et sondes
MS2	MS2TM2f	Amorce sens	TGCTCGGGATACCCG
	MS2TM2r	Amorce antisens	AACTTGC GTTCTCGAGCGAT
	MS2atto647tao*	Sonde	/5 ATTO647NN /ACCTCGGGT/TAO/TTCCGTCTTGCTCGT/ 3IAbRQSp /
Cauris ITS2	CAURF	Amorce sens	CAGACGTGAATCATCGAATCT
	CAURR	Amorce antisens	TTTCGTGCAAGCTGTAATTT
	CAURP*	Sonde	/5 6-FAM /AATCTTCGC /ZEN/GGTGGCGTTGCATTCA/ 3IABkFQ /

* Fluorophores et modifications disponibles chez Integrated DNA technologies (<https://www.idtdna.com/>)

Tableau 2 Séquence du fragment ADN synthétique gBlocks® utilisé pour TAI du bactériophage MS2

Nom	Séquences (5' → 3') des amorces (en jaune) et sonde (en vert)
MS2 DNA*	CAGCCCGCTACGGCAGTCTCGGTATACACCAAGACTCCGTACGGGCGGC TGCTCGGGATACCCGT ACCT CGGGTTCCGTCTTGCTCGT ATCGCTCGAGAACGCAAGT CTTCAGCGAAAAGCACGACAGTGGTCGCTACA TAGCGTGGTCCATACTG

* Fragment d'ADN synthétiques de type gBlocks® disponibles chez Integrated DNA technologies (https://www.idtdna.com)

ANNEXE 2 TRAITEMENT DES SPÉCIMENS À LA PROTÉINASE K

1. Réactifs requis

- Tris-HCl 20 mM, pH 8,3 produit par les milieux de culture
- Protéinase K lyophilisée, 100 mg (Cat 3115879001 de Roche Diagnostics ou similaire)
- SDS 10 % produit par les milieux de culture

2. Préparation de la solution stock de protéinase K (25 mg / mL)

- Réhydrater la totalité de protéinase K (100 mg) lyophilisée avec 4 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 8,3 afin d'obtenir une solution stock de protéinase K à 25 mg / mL
- Aliquoter la solution stock en 10 aliquots de 400 µl et conserver au congélateur (< -15 °C) au local des réactifs

3. Préparation de la solution de travail (25 mg / mL)

- La solution fraîche de travail de protéinase K utilisée lors d'une réaction de lyse consiste en 1 mg / mL de protéinase K, 0,5 % SDS, 20 mM Tris-HCl pH 8,3
- 200 µL est nécessaire par échantillon. Voici quelques suggestions de volumes pour la préparation du mélange

Ingrédient	Volume pour 1 mL	Volume pour 2 mL	Volume pour 5 mL
Tris-HCl 20 mM pH 8,3	910 µL	1820 µL	4500 µl
SDS 10 %	50 µL	100 µL	250 µl
Stock prot. K (25 mg / mL)	40 µL	80 µl	200 µl

4. Utilisation et conditions de lyse

- Utiliser dans un ratio 1:1 avec l'échantillon (ex. 200 µL de milieu de transport liquide Amies de l'écouvillon de dépistage avec 200 µL de la solution Protéinase K de travail). La concentration finale est de 0,5 mg / mL de protéinase K
- Bien mélanger, incuber à 65 °C pour 10 minutes. Remélanger après 5 min et à la fin de l'incubation. Si un bloc chauffant avec agitation est utilisé le régler à 300 RPM.

5. Conservation et élimination

- La solution fraîche doit être conservée à 4 °C jusqu'à utilisation et doit être utilisée la journée même de sa préparation.
- Il s'agit d'un produit non contrôlé par SIMDUT. Il peut être jeté sans précaution particulière.

ANNEXE 3 REGISTRE DE PRÉPARATION DE MÉLANGE RÉACTIONNEL

Fait par : _____

Date : _____

Préparation du mélange réactionnel : _____ Nb échantillons (n×3) + 1 : _____

Réactifs (Concentration finale) _{cf}		N° lot Ou date de fabrication	Date de péréemption	Volume (µL) Par réaction	Volume total (µL) dans le mélange réactionnel
Qiagen UCP Probe Mix				10,0	
Mix <i>C. auris</i>	CAURF (0,5 µM) _{cf}			2,8	
	CAURR (0,5 µM) _{cf}				
	CAURP (0,1 µM) _{cf}				
Mix MS2	MS2F (0,25 µM) _{cf}			1,4	
	MS2R (0,25 µM) _{cf}				
	MS2P (0,05 µM) _{cf}				
dil. MS2 10 ⁻⁷ (Au pré-PCR)				0,8	

Volume du mélange réactionnel : 15,0

Volume de la préparation d'acides nucléiques: 5,0

Micropipettes utilisées	
Réactifs	Pré-PCR

Instrument utilisé :

- QS5 #1 : 9595
- QS5 #2 : 9598

Responsable : _____ Date : _____

REGISTRE DE PRÉPARATION DE MÉLANGE RÉACTIONNEL

Mix	Cible	Rapporteur	Répresseur	Note	Programme
<i>C auris</i>	ITS2	FAM	None	Désélectionner la normalisation ROX	Run mode : FAST Candida auris 95° C 2 min 95° C 20 sec 95° C 3 s 60° C 30 s 45 X
MS2	MS2	ATTO 647	None		

Préparation des mix d'amorces et sondes

Fait par : _____ Date de péremption : _____

Qualifié par : _____ Date de péremption : _____

MIX CAUR	Amorces/sondes	N° Lot Date de préparation	Pour 1 réaction	___ réactions
FAM	CAURF (10 µM)		1 µl	
	CAURR (10 µM)		1 µl	
	CAURP (2,5 µM)		0,8 µl	

MIX MS2	Amorces/sondes	N° Lot Date de préparation	Pour 1 réaction	___ réactions
ATTO647	MS2F (10 µM)		0,5 µl	
	MS2R (10 µM)		0,5 µl	
	MS2P (2,5 µM)		0,4 µl	

Micropipettes utilisées					
-------------------------	--	--	--	--	--

ANNEXE 4 PRÉPARATION DU TÉMOIN D'AMPLIFICATION INTERNE MS2

1) Réhydrater le fragment d'ADN synthétique du phage MS2 gBlocks® (format de 250 ng) décrit à l'annexe 1

Sur réception mettre au local pré-PCR, ne pas laisser aux réactifs

Dans une ESB de type II (hors des locaux qui seront utilisés pour traitement des échantillons et étapes de l'extraction et de PCR)

- Centrifuger le tube à vitesse maximale brièvement
- Resuspendre dans 1 mL de TE pH 8,0 pour une concentration finale d'environ 0.25 ng / L
- Vortexer et incubé à 50 °C pendant 20 minutes
- Re-vortexer et centrifuger brièvement

Préparation des dilutions (gBlock® et dilutions sériées)

- Préparer la dilution 10^1 en prenant 50 µL de la dilution à 0.25 ng / L et ajouter à 450 µL de tampon TE pH 8,0
- De cette nouvelle dilution 10^1 préparer 8 nouvelles dilutions 1 / 10
- Consulter le tableau à l'annexe 5

2) Tester les dilution 10^{-3} et 10^{-8} avec la PCR *C. auris* comme s'il s'agissait d'un échantillon

Selon les résultats obtenus, choisir la dilution qui donne une valeur de Ct autour de 32 – 33 (Généralement une dilution entre 10^{-6} et 10^{-7})

Avec la dilution sélectionnée, produire un volume de 5 ml. Par exemple, si la dilution choisie est 10^{-6} , prendre 5 µL de 10^{-3} avec 4995 µl de tampon TE pH 8,0 pour dilution 1000X.

- Préparer des aliquots de 100 µL dans des tubes Sarstedt de 1,5 mL
- Étiqueter les tubes avec les inscriptions, TAI MS2, la dilution produite, ainsi que la date de préparation. Le TAI a une date de péremption de 2 ans. Une fois dégelé, il peut être utilisé 6 mois (un maximum de 5 cycles de gel/dégel sont permis)

ANNEXE 5 REGISTRE DE PRÉPARATION DU TAI

1) Réhydratation du bactériophage MS2 gBlocks® Gene Fragment (format 250 ng) dans 1 mL de TE pH 8,0

Matériel	No lot / no référence	Date de péremption
MS2 DNA (gBlocks)		
Tampon TE pH 8.0		

2) Préparation des dilutions

Dilution	Concentration (ng / 2,5 µl)	Préparation de la dilution
10 ⁰	0,00625	Voir ci-haut
10 ⁻¹	0,000625	50 µl 10 ⁰ /450 µl d'eau DEPC
10 ⁻²	0,0000625	50 µl 10 ⁻¹ /450 µl d'eau DEPC
10 ⁻³	0,00000625	50 µl 10 ⁻² /450 µl d'eau DEPC
10 ⁻⁴	0,000000625	50 µl 10 ⁻³ /450 µl d'eau DEPC
10 ⁻⁵	0,0000000625	50 µl 10 ⁻⁴ /450 µl d'eau DEPC
10 ⁻⁶	0,00000000625	50 µl 10 ⁻⁵ /450 µl d'eau DEPC
10 ⁻⁷	0,000000000625	50 µl 10 ⁻⁶ /450 µl d'eau DEPC
10 ⁻⁸	0,0000000000625	50 µl 10 ⁻⁷ /450 µl d'eau DEPC
10 ⁻⁹	0,00000000000625	50 µl 10 ⁻⁸ /450 µl d'eau DEPC
10 ⁻¹⁰	0,000000000000625	50 µl 10 ⁻⁹ /450 µl d'eau DEPC

3) Qualification par PCR des dilutions 10⁻³ à 10⁻⁸. Compléter le RE-BM-317

Micropipettes utilisées	
Étape 1	Étape 2

ANNEXE 6 PRÉPARATION DU CONTRÔLE POSITIF D'EXTRACTION

Compléter le registre pour la préparation de ces contrôles (voir annexe 7)

- 1) Préparer McFarland 0,5 (dans 5 mL de saline) de la souche de *C. auris* (LSPQ-01312, ATCC MYA-5002 ou autre), ce qui correspond à 10^6 ou 10^7 UFC/mL
- 2) Faire une dilution 10X en ajoutant 100 µL de la suspension McFarland 0,5 dans 900 µL de TE pH 8.0
- 3) Diluer cette dilution 200X en ajoutant 200 µL de cette suspension à 40 mL de TE pH 8,0 (pour dilution finale de 2000X)
- 4) Distribuer un volume de 200 µl dans une série de tube Sarstedt de 2,0 mL 200 tubes seront nécessaires
- 5) Apposer une étiquette indiquant C+E (*C. auris*), ainsi que la date de préparation
- 6) Déposer au congélateur ≤ -55 °C jusqu'au lendemain avant de faire la qualification du lot
- 7) Extraire sur E-MAG et tester 3 tubes du lot (début, milieu et fin) par PCR
- 8) La Ct devrait idéalement se situer entre 25 et 30 (voir tableau des Contrôles section 7 et être approuvée par le responsable de l'analyse

ANNEXE 7 REGISTRE DE PRÉPARATION DU CONTRÔLE POSITIF D'EXTRACTION

Contrôle positif d'extraction

Préparation d'un McFarland 0,5 dans 5 mL de saline (correspond à 10^6 ou 10^7 UFC/mL) par à partir d'une culture de 24-72 h de *Candida auris* sur gélose (ex. LSPQ-01312, ATCC MYA-5002 ou autre).

Date de préparation du McFarland 0.5 / (Initiales)	Date de préparation de la dilution 200X / (Initiales)	Nombre d'aliquots 200 µL préparés	Validation sur aliquot (Date / initiales)	Approbation du responsable (Date / initiales)

Lot Tampon TE pH 8,0 : _____

Date de péremption : _____

Micropipettes utilisés

Dépistage de *Candida auris* par PCR de détection en temps réel

AUTEUR ET AUTRICE

Philippe Dufresne, Ph. D., spécialiste clinique en biologie médicale (Mycologie)

Laboratoire de santé publique du Québec

Mélanie Côté, technicienne de laboratoire médicale (Biologie Moléculaire)

Laboratoire de santé publique du Québec

SOUS LA COORDINATION DE

Judith Fafard, M.D., directrice médicale

Laboratoire de santé publique du Québec

COLLABORATION

Jasmin Villeneuve, M.D., médecin conseil

Direction des risques biologiques

Institut national de santé publique du Québec

Simon-Frédéric Dufresne, M.D., microbiologiste-infectiologue

Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux de l'Est-de-l'Île-de-Montréal

Julie Okapuu, M.D., microbiologiste-infectiologue

Centre intégré de santé et de services sociaux de la Montérégie-Ouest

Anne Desjardins, M.D., microbiologiste-infectiologue

Centre hospitalier universitaire de Québec

Matthew Cheng, M.D., microbiologiste-infectiologue

Centre universitaire de santé McGill

Valérie Roy, M.D., microbiologiste-infectiologue

Centre intégré de santé et des services sociaux de Chaudières-Appalaches

RÉVISION

Catherine Allard, M.D., microbiologiste-infectiologue

Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke

Caroline Sheitoyan-Pesant, M.D., microbiologiste infectiologue

Centre hospitalier universitaire Dr-George-L. Dumont
Moncton, Nouveau-Brunswick

Les réviseuses ont été conviées à apporter des commentaires sur la version pré-finale de ce document et en conséquence, n'en ont pas révisé ni endossé le contenu final.

L'auteur et l'autrice ainsi que les membres du comité scientifique et les réviseuses ont dûment rempli leurs déclarations d'intérêts et aucune situation à risque de conflits d'intérêts réels, apparents ou potentiels n'a été relevée.

MISE EN PAGE

Teresa Alper, agente administrative

Laboratoire de santé publique du Québec

Ce document est disponible intégralement en format électronique (PDF) sur le site Web de l'Institut national de santé publique du Québec au : <http://www.inspq.qc.ca>.

Les reproductions à des fins d'étude privée ou de recherche sont autorisées en vertu de l'article 29 de la Loi sur le droit d'auteur. Toute autre utilisation doit faire l'objet d'une autorisation du gouvernement du Québec qui détient les droits exclusifs de propriété intellectuelle sur ce document. Cette autorisation peut être obtenue ou en écrivant un courriel à : droits.dauteur.inspq@inspq.qc.ca.

Les données contenues dans le document peuvent être citées, à condition d'en mentionner la source.

Dépôt légal – 3^e trimestre 2024

Bibliothèque et Archives nationales du Québec

ISBN : 978-2-550-98559-4 (PDF)

© Gouvernement du Québec (2024)

N^o de publication : 3545