



Apport des puces à ADN dans le diagnostic rapide en routine

... une pathologie, un pathogène, ...

Frédéric Laurent

Laboratoire de Bactériologie, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon

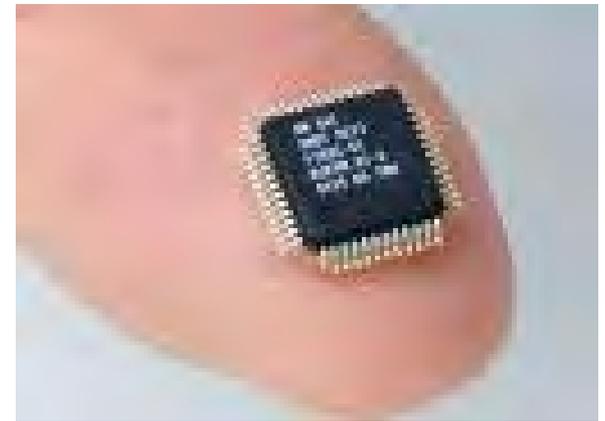
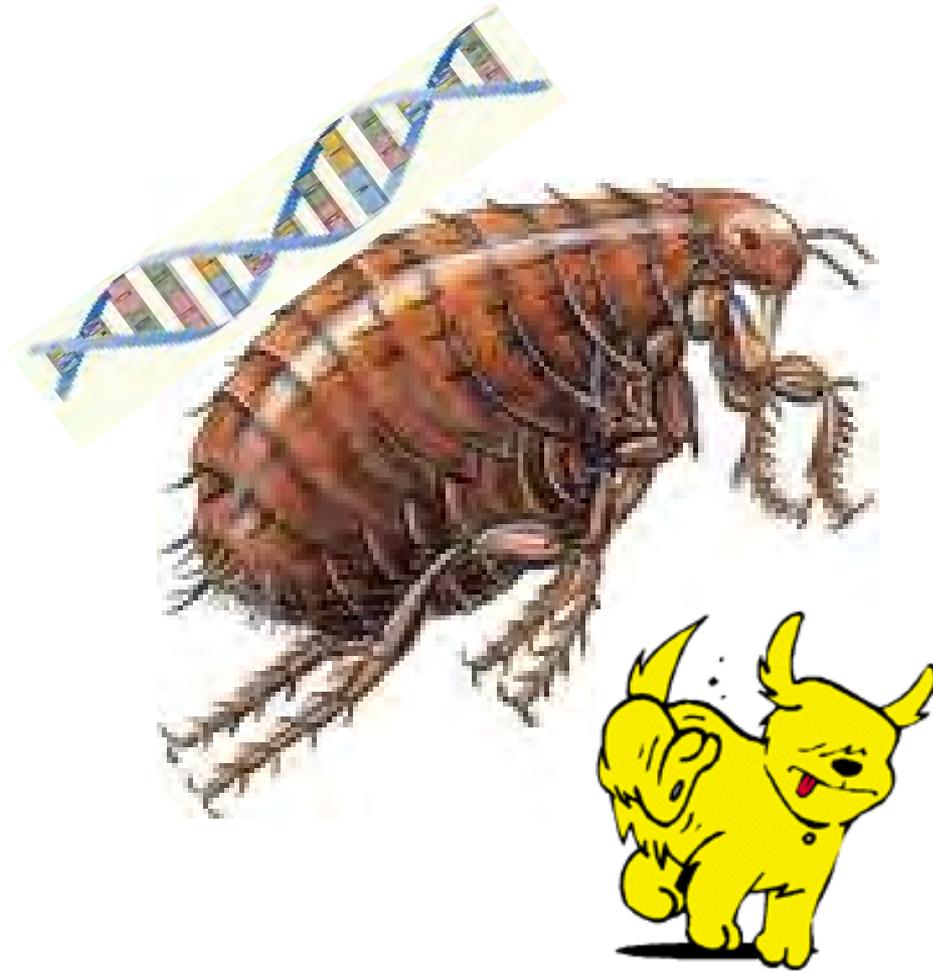
Centre National de Référence des Staphylocoques, Inserm U851

Qu'est-ce qu'une puce à ADN?

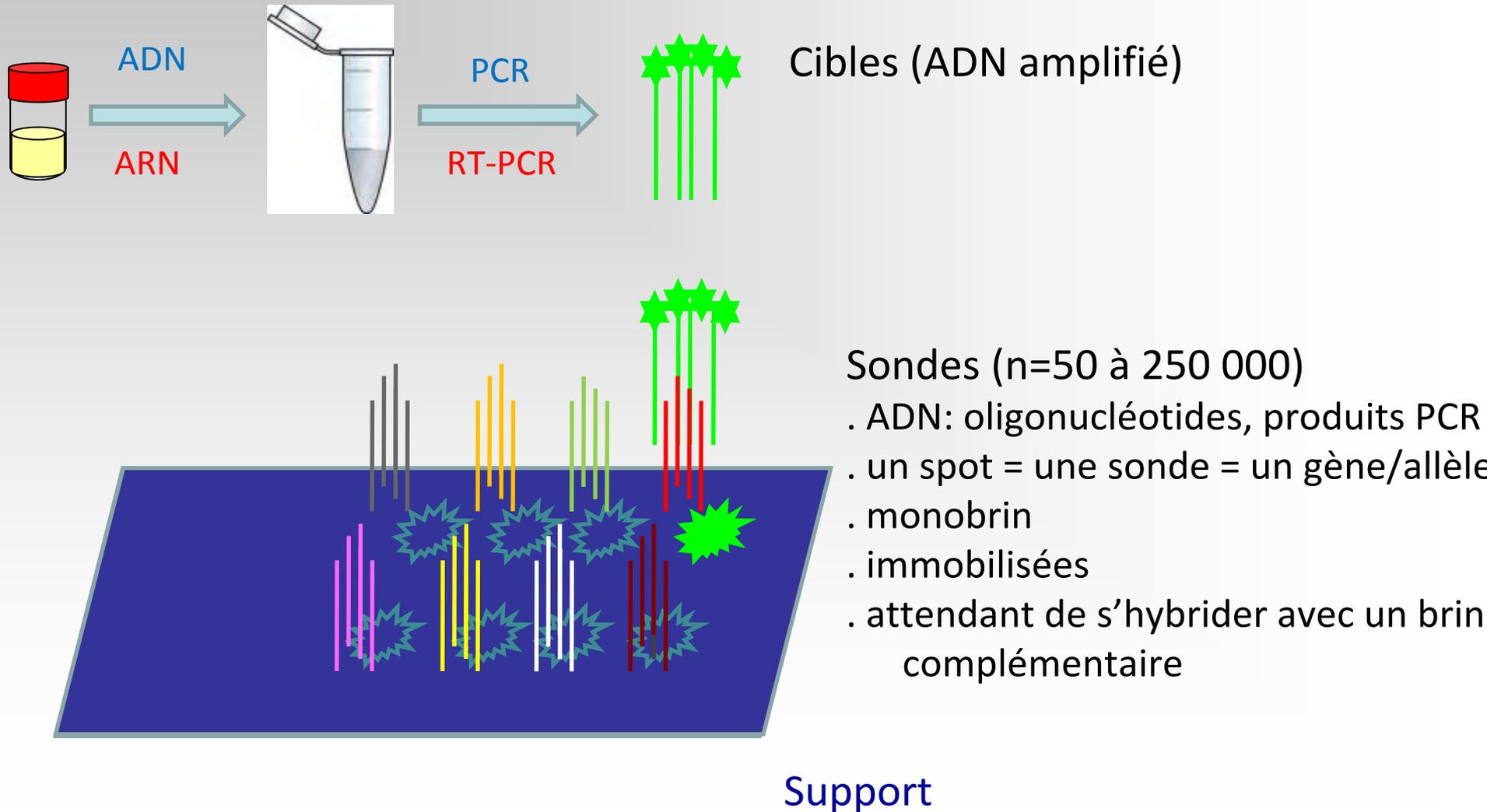
Anglicisme ?

"DNA Flea"

microarray



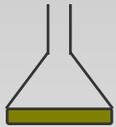
Qu'est-ce qu'une puce à ADN?



Applications des puces à ADN

Transcriptomique

sauvage condition 1 vs mutant condition 2



Bactérie

Bactérie

ARNm

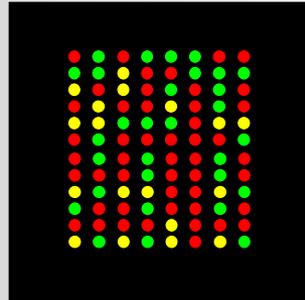
ARNm

Cy3

Cy5

Marquage différentiel de l'ADNc

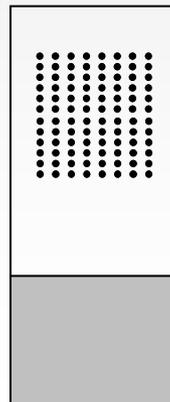
Puces de haute densité



Analyse qualitative et/ou quantitative

Scanner confocal

Hybridation



Génomique

Souche A

Souche B



Bactérie

Bactérie

ADN

ADN

Cy3

Cy5

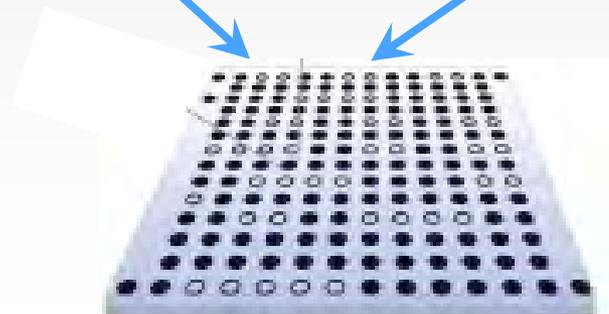
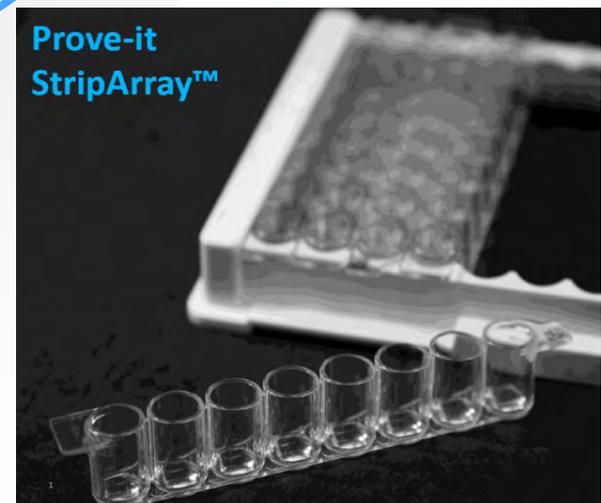
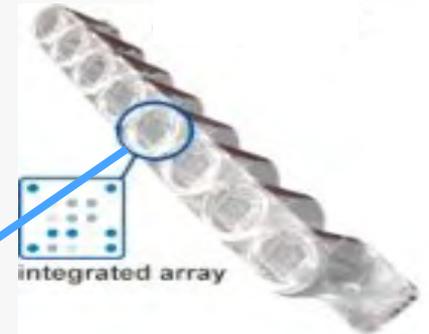
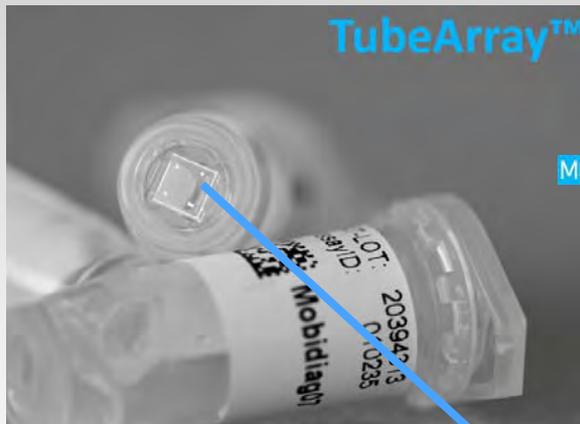
Marquage différentiel de l'ADN



Puce à ADN pour la routine

"Tous les avantages sans les inconvénients"

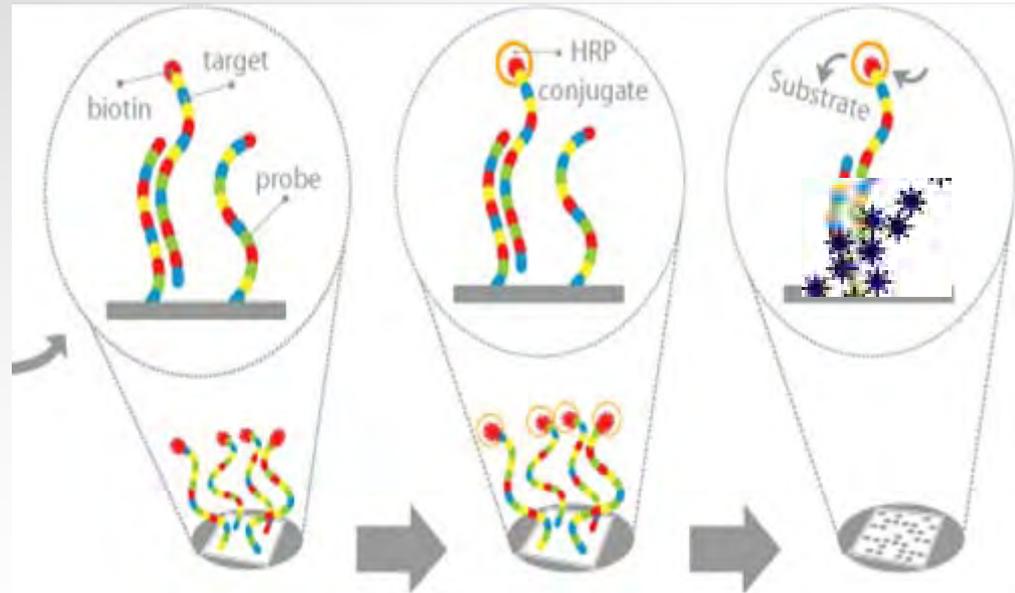
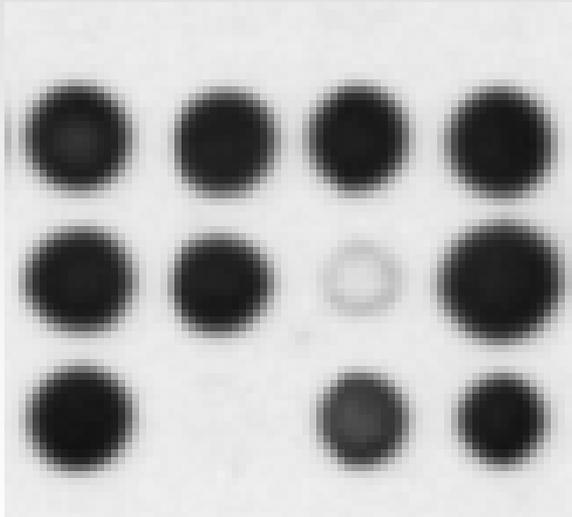
- Format simple à manipuler



Puce à ADN pour la routine

"Tous les avantages sans les inconvénients"

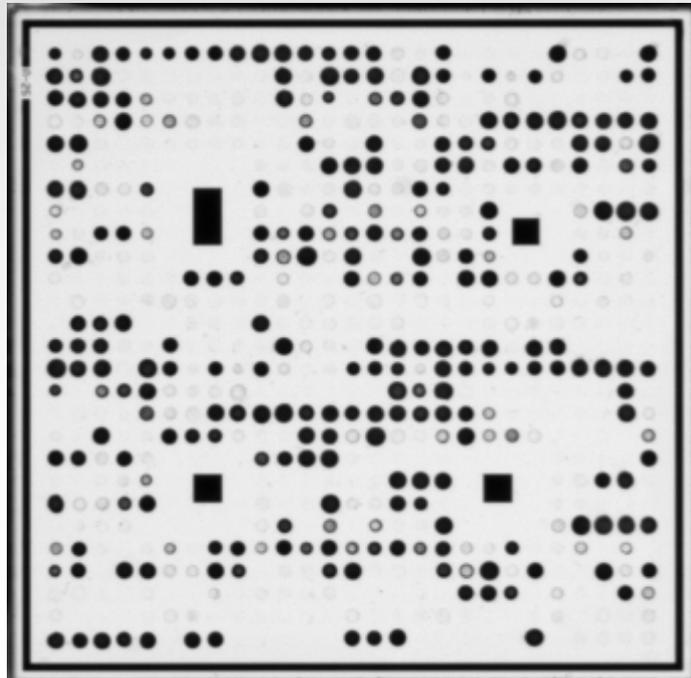
- Format simple à manipuler
- Analyse qualitative : présence ou absence
 - Présence du gène = amplification et hybridation sur les spots correspondant au gène (spots colorés)



Puce à ADN pour la routine

"Tous les avantages sans les inconvénients"

- Format simple à manipuler
- Analyse qualitative : présence ou absence
 - Présence du gène = amplification et hybridation sur les spots correspondant au gène (spots colorés)
- Puce de faible densité (entre 200 et 600 spots = gènes ou allèles)



Puce à ADN pour la routine

"Tous les avantages sans les inconvénients"

- Format simple à manipuler
- Analyse qualitative : présence ou absence
 - Présence du gène = amplification et hybridation sur les spots correspondant au gène (spots colorés)
- Puce de faible densité (entre 200 et 600 spots)
- Lecture simple et lecteur peu coûteux



Puce à ADN pour la routine

- Spots pour détecter et identifier des espèces bactériennes et/ou virales
- Spots pour détecter des résistances bactériennes et/ou virales
- Spot pour détecter des facteurs de virulence bactériens et/ou viraux

Combinaison de l'ensemble possibles car
600 spots disponibles donc 600 caractères accessibles
... en un seul run de PCR

Et si mélange de bactéries, ça marche quand même !

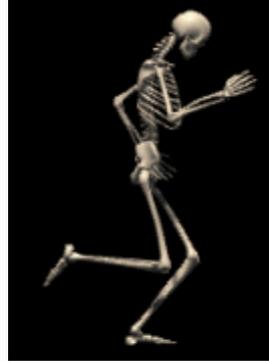
Apport des puces à ADN dans le diagnostic rapide en routine

... une pathologie, un pathogène, ...

Infection ostéo-articulaire

Infection ostéo-articulaire

Démarche diagnostique



Bactériologie

Biologie
Histologie
Imagerie
Clinique



⇒ diagnostic de certitude

- diagnostic conventionnel
- diagnostic moléculaire
 - PCR spécifique
Staph/Strepto/Kingella
 - PCR universelle 16S +
séquençage

Délai et coût ++

+ polymicrobisme (10 à 15%)

Puce à ADN pour la routine

- Spots pour détecter et identifier des espèces bactériennes et/ou virales
- Spots pour détecter des résistances bactériennes et/ou virales
- Spot pour détecter des facteurs de virulence bactériens et/ou viraux



Puce à ADN pour la routine

- **Prove-it™ Sepsis**

- Amplification des gènes *gyrB*, *parE*, *mecA* par PCR multiplex avec des amorces biotinylées
- Détection et identification de 50 espèces bactériennes
+ *mecA*
- Développée pour les hémocultures positives

| Bactéries à Gram positif | Bactéries à Gram négatif |
|---|--|
| Identification à l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Clostridium perfringens</i> | Identification à l'espèce <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> |
| Identification taxonomique <i>Staphylococcus</i> à coagulase Négative : <i>S. capitis</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. hominis</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. warneri</i> <i>S. xylosum</i> | Identification taxonomique Groupe <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Campylobacter jejuni/coli</i> Enterobacteriaceae <i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter amalonaticus</i> <i>Citrobacter koseri</i> <i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Enterobacter sakozakii</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> |
| Marqueur de résistance Gène de résistance à la méthicilline <i>mecA</i> | |

Les étapes

ADN **1**



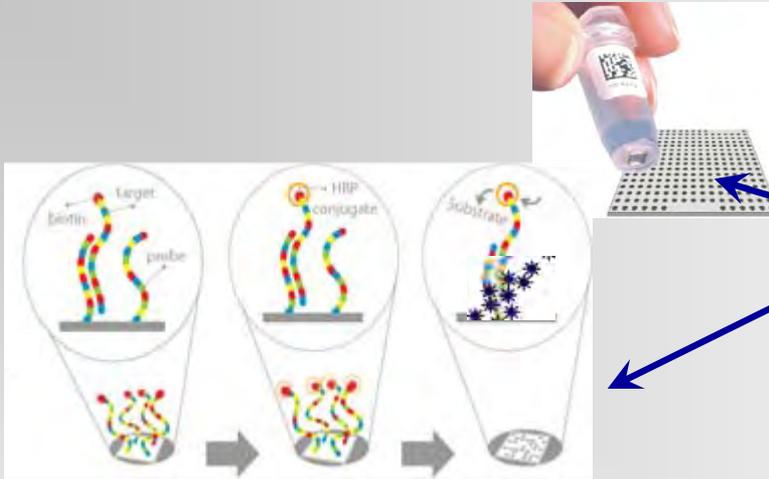
Amplification : PCR multiplex
avec amorces biotinylées
(105 min)

2

Hybridation sur la puce
(45 min)

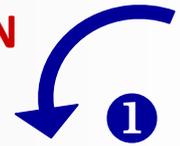
3

Lecture et interprétation
(quelques secondes)



Les étapes

ADN



Amplification : PCR multiplex avec amorce biotinylées

(105 min)

②

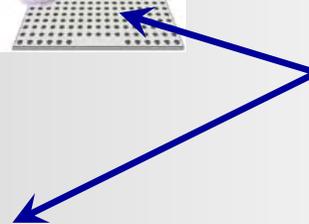
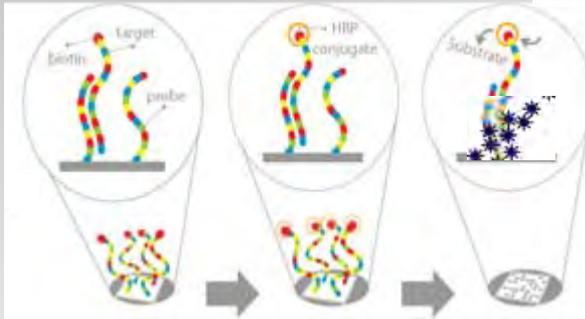
Hybridation sur la puce

(45 min)

③

Lecture et interprétation

(quelques secondes)



Les étapes

ADN **1**



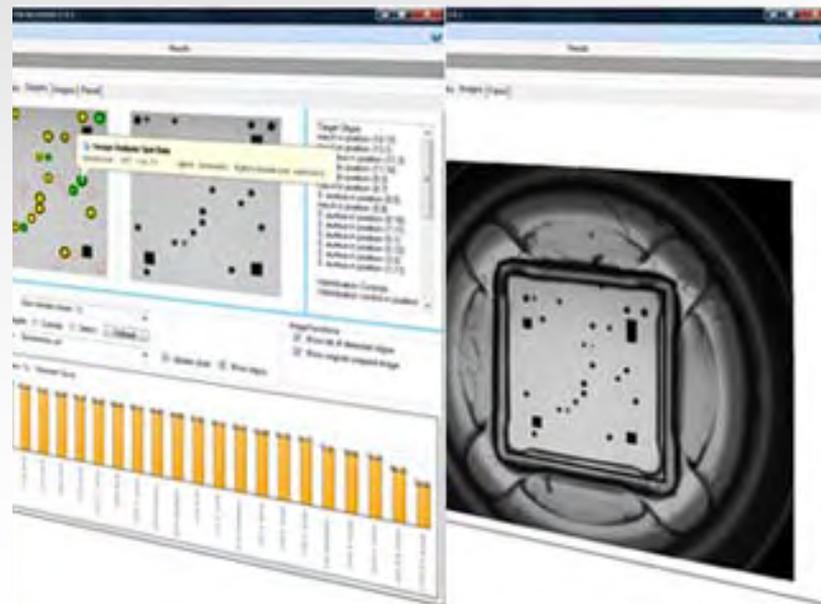
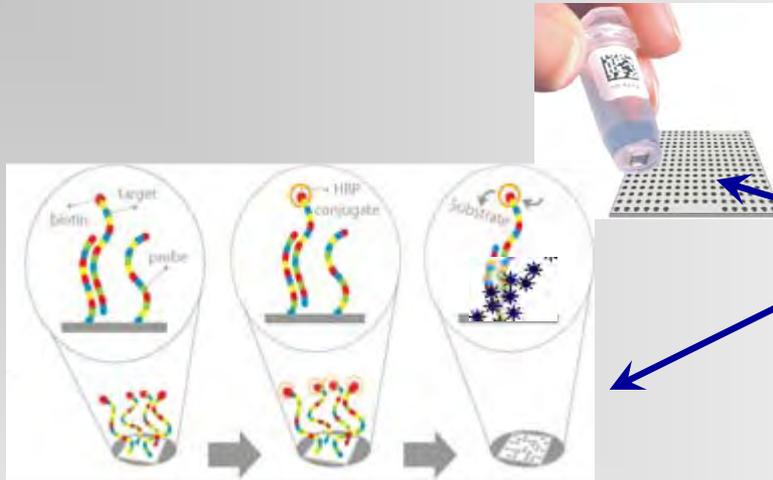
Amplification : PCR multiplex avec amorces biotinylées
(105 min)

2

Hybridation sur la puce
(45 min)

3

Lecture et interprétation
(quelques secondes)



Les étapes

ADN **1**



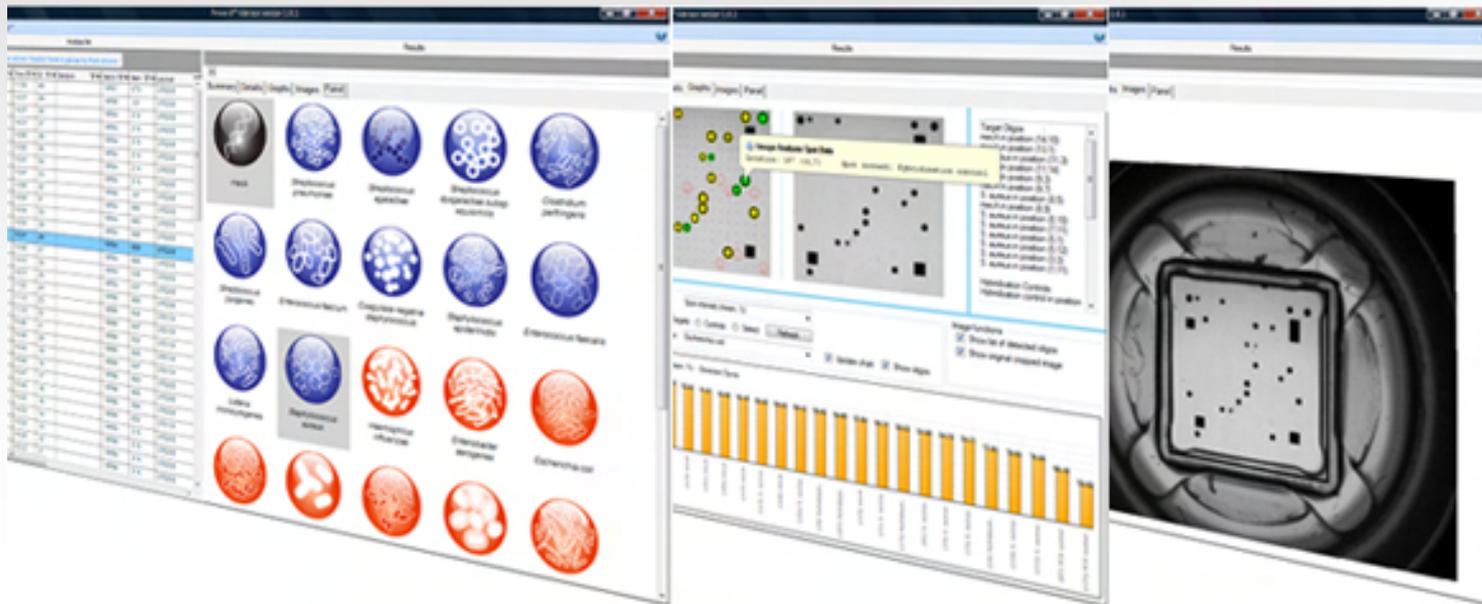
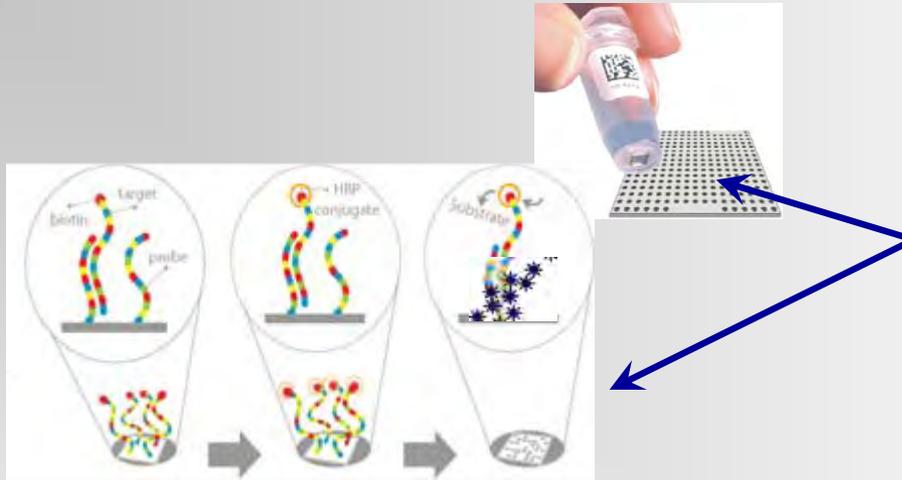
Amplification : PCR multiplex avec amorces biotinylées
(105 min)

2

Hybridation sur la puce
(45 min)

3

Lecture et interprétation
(quelques secondes)



Les étapes

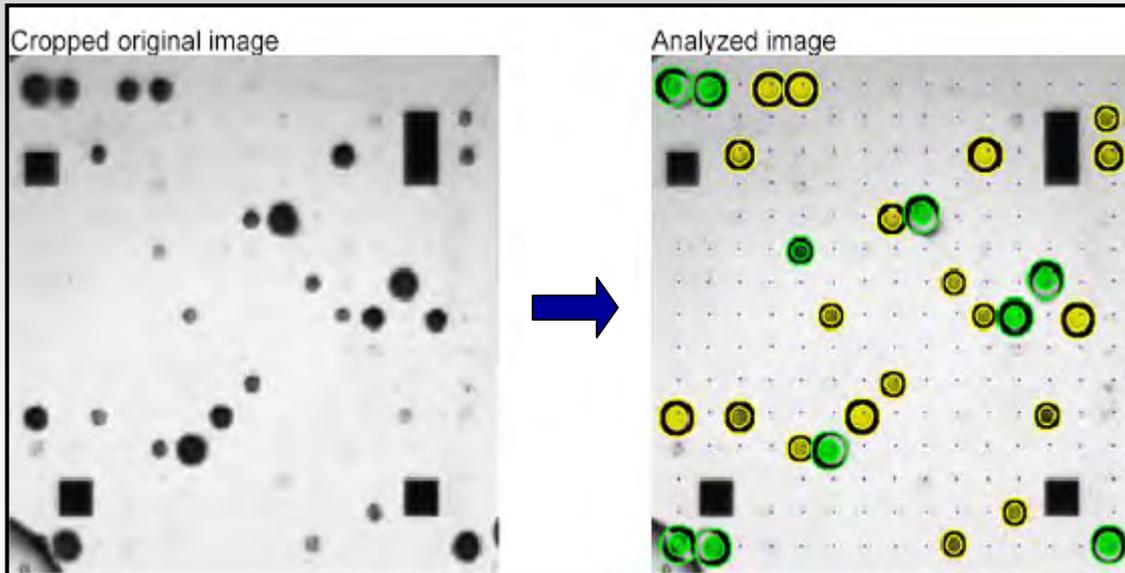


Staphylococcus aureus



Escherichia coli

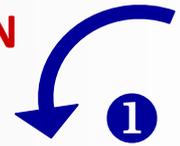
< 3h



Spots jaunes = bactéries
Spots verts = contrôles internes

| Detection | Name | Quality status | All oligos |
|-----------|-----------------------|----------------|------------|
| Positive | Escherichia coli | RUO | 10 / 10 |
| Positive | Staphylococcus aureus | RUO | 8 / 8 |

ADN



Amplification : PCR multiplex avec amorce biotinylées

(105 min)

2

Hybridation sur la puce

(45 min)

3

Lecture et interprétation

(quelques secondes)





Prove-it™ Sepsis *versus* culture

Tissari *et al.*, Lancet 2010

- 2107 hémocultures positives
 - ⇒ 86% (n=1807) avec des bactéries comprises dans le panel de détection
- Résultats
 - Sensibilité 94,7% - Spécificité 98,8%
 - Détection et identification du SARM : 100%
- Délai de rendu
 - Prove-it™ Sepsis plus rapide que la culture de 18h en moyenne



Prise en charge rapide et adaptée des patients présentant une septicémie

Prove-it™ Sepsis et infections ostéo-articulaire

- Analyse rétrospective
- 130 prélèvements
 - 67 liquides articulaires
 - 63 biopsies osseuses
 - 16 négatifs C-/PCR_{16S}⁻
 - 114 positifs C+ et/ou PCR_{16S}⁺

Sélection des prélèvements selon les sondes bactériennes disponibles sur la puce

 - 31 C+/PCR_{16S}⁺
 - 22 C+/PCR_{16S}⁻
 - 61 C-/PCR_{16S}⁺
- Protocole identique à celui des hémocultures

Bactéries testées dans l'étude

Staphylococcus spp (n=63)

S. aureus (n=35)

S. epidermidis (n=20)

Streptococcus spp (n=29)

Entérobactéries (n=19)

Bacteroides spp (n=6)

Pseudomonas spp (n=3)

Prove-it™ Sepsis et infections ostéo-articulaire

| Culture (n) | PCR _{16S} (n) | Prove-it™ | |
|----------------|------------------------|-----------|-----------|
| | | + | - |
| C- (77) | PCR- (16) | 1 | 15 |
| | PCR+ (61) | 39 | 22 |
| C+ (53) | PCR+ (31) | 27 | 4 |
| | PCR- (22) | 5 | 17 |
| 130 | | 72 | 58 |

Prove-it™ Sepsis et infections ostéo-articulaire

| Culture (n) | PCR _{16S} (n) | Prove-it™ | |
|-------------|------------------------|-----------|----|
| | | + | - |
| C- (77) | PCR- (16) | 1 | 15 |
| | PCR+ (61) | 39 | 22 |
| C+ (53) | PCR+ (31) | 27 | 4 |
| | PCR- (22) | 5 | 17 |
| 130 | | 72 | 58 |

• C-/PCR_{16S}- n=16

– 15 Prove-it –

– 1 Prove-it + : *S. epidermidis*

➤ Confirmation ultérieure au laboratoire par PCR *tuf* et séquençage

➤ Confirmation clinique : arthrite septique (genou) à *S. epidermidis* traitée

Prove-it™ Sepsis et infections ostéo-articulaire

| Culture (n) | PCR _{16S} (n) | Prove-it™ | |
|----------------|------------------------|------------|----|
| | | + | - |
| C- (77) | PCR- (16) | 1 | 15 |
| | PCR+ (61) | 39 | 22 |
| C+ (53) | PCR+ (31) | 27 | 4 |
| | PCR- (22) | 5 | 17 |
| | | 114 | |

- C+ et/ou PCR_{16S}+ n=114

– 70 Prove-it +

Identification concordante (61,4%)

- 7 diagnostics plurimicrobiens

- Détection du gène *mecA*

- 16 *Staphylococcus* spp C+/Prove-it+ : 5*mecA*+, 11*mecA*-

- 28 C-/PCR_{16S}+ : 12 *mecA* en plus

- Meilleure discrimination/PCR_{16S}

- *S. aureus* vs *S. aureus*/*S. haemolyticus*

- *K. pneumoniae* vs *K. pneumoniae*/*K. oxytoca*

- ...

Prove-it™ Sepsis et infections ostéo-articulaire

| Culture (n) | PCR _{16S} (n) | Prove-it™ | |
|-------------|------------------------|-----------|----|
| | | + | - |
| C- (77) | PCR- (16) | 1 | 15 |
| | PCR+ (61) | 39 | 22 |
| C+ (53) | PCR+ (31) | 27 | 4 |
| | PCR- (22) | 5 | 17 |

114

- C+ et/ou PCR_{16S+} n=114

- 70 Prove-it +

- Identification concordante (61,4%)

- 1 Prove-it +

- Identification discordante par rapport à la culture

- puce = *E. coli* + *S. enteritidis* versus culture = *B. fragilis*

- patient avec IOA plurimicrobienne documentée : *E. coli* + *B. fragilis*

Prove-it™ Sepsis et infections ostéo-articulaire

| Culture (n) | PCR _{16S} (n) | Prove-it™ | |
|-------------|------------------------|-----------|----|
| | | + | - |
| C- (77) | PCR- (16) | 1 | 15 |
| | PCR+ (61) | 39 | 22 |
| C+ (53) | PCR+ (31) | 27 | 4 |
| | PCR- (22) | 5 | 17 |
| | | 114 | |

• C+ et/ou PCR_{16S+} n=114

– 70 Prove-it +
 Identification concordante (61,4%)

– 1 Prove-it +
 Identification discordante par rapport à la culture

– 43 Prove-it -

➤ 17 C+/PCR_{16S}⁻

} Extraction?
 Faible inoculum?

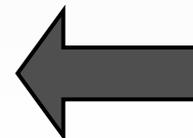
➤ 22 C-/PCR_{16S}⁺

} Congélation/
 décongélation?

➤ 4 C+/PCR_{16S}⁺

} Défaut de sensibilité?

Interférence ADN
 humain/ADN
 bactérien?



ou algorithmes d'interprétation?

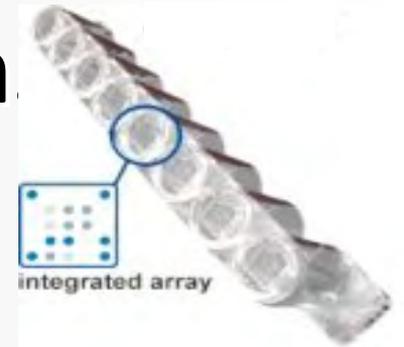
⇒ 18 Prove-it - présentaient des spots d'hybridation mais sous le seuil de positivité

Dilution 1/10 des extraits d'ADN (n=10) :

récupération de 6 positifs :

5 *Staphylococcus* spp + 1 *S. pneumoniae*

Puces et IOA - conclusion.



- Résultats prometteurs
 - Principales espèces responsables d'IOA
 - Infections polymicrobiennes
 - Résistance à la méthicilline
- Méthode simple et rapide
- Manque de sensibilité
 - Optimisations en cours
 - Etude prospective
- Extension du thesaurus à d'autres espèces
- Nouvelle génération de puce en cours d'évaluation
 - Système de barrettes (StripArray™)
 - Nouvelles espèces : *Kingella kingae* et *Propionibacterium acnes*



Apport des puces à ADN dans le diagnostic rapide en routine

... une pathologie, un pathogène, ...

Infection ostéo-articulaire

Apport des puces à ADN dans le diagnostic rapide en routine

... une pathologie, **un pathogène**,...

Staphylococcus aureus



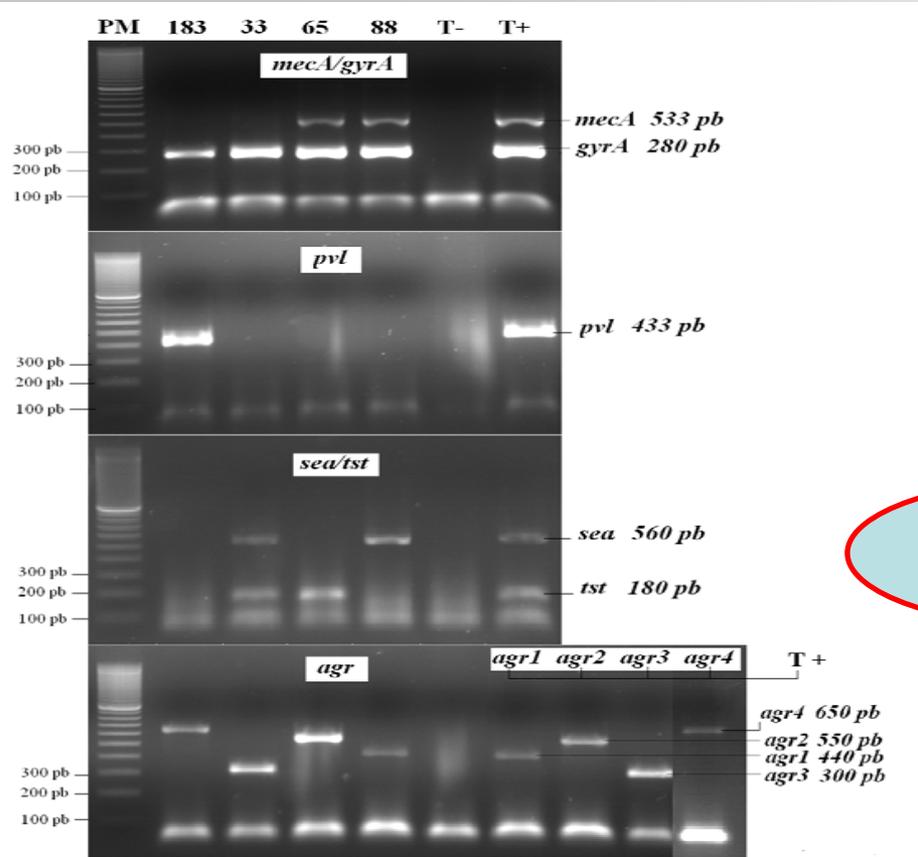
Puce à ADN pour la routine

- Spots pour détecter et identifier des espèces bactériennes et/ou virales
- Spots pour détecter des résistances bactériennes et/ou virales
- Spot pour détecter des facteurs de virulence bactériens et/ou viraux

Puce à ADN *S. aureus*

- **StaphyType 96** ® : puces à ADN dédié à *S. aureus*
- regroupe :
 - 332 sondes de *S. aureus*
 - 185 genes et leurs variants alléliques:
 - marqueurs d'espèce (*coa*, *nuc*, *spa*, *sbi*,...)
 - gènes de résistance dont *mecA*
 - cassette *SCCmec*
 - toutes les exotoxines connues
 - MSCRAMM
 - Protéases
 - capsule
 - type *agr*

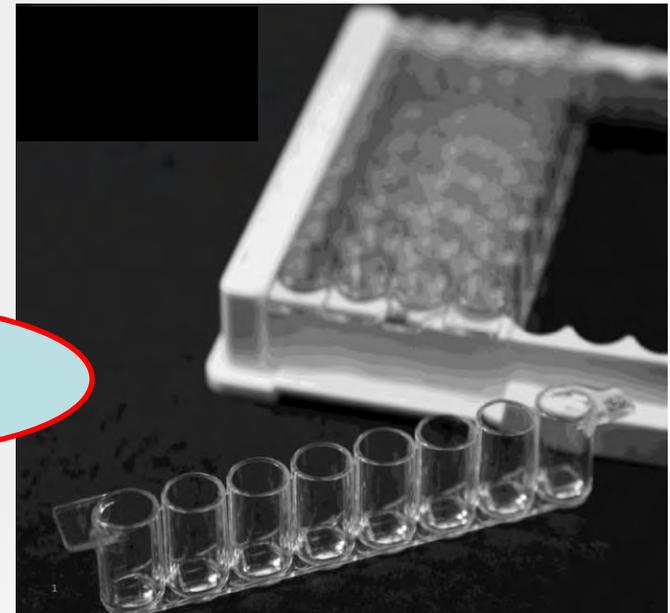
Avant les puces ... avec les puces



+ 4 autres réaction de PCR multiplex

Total = 22 gènes criblés

Versus



1 réaction PCR + 1 puce

Les mêmes 20 gènes

+ 300 autres gènes ou allèles

Puce à ADN *S. aureus*

- **Facteurs de virulence :**
 - Toxines : PVL, TSST-1, toxines superantigéniques, ...
 - Résistance particulière (*mecA*, *ermA,B,C*, *mupA*, *VanA*, ...)
- **Epidémiologie globale : nature du clone**
 - Clone ST80 PVL+
 - USA300 PVL+
 - Clone Géraldine TSST1+ SARM
- **Epidémiologie locale:**
 - Epidémie ou non ?
- **Phylogénie / perte-gain d'éléments mobiles**

StaphyType Test Report

| | |
|------------------|--|
| Operator | |
| Sample ID | ST20101102 |
| Experiment ID | ST20101102 - {6EA479EF-1DC3-4333-B4A4-E89DB5BFDC8} |
| Date of Result | Tue May 04 14:33:39 2010 |
| Assay Name | StaphyType |
| Assay ID | 10248 |
| Well Position | 06 (01-F) |
| Software Version | 2009-07-09 |
| Device | 01a0010 |
| Data Quality | passed |

Genetic markers for *S. aureus* / MRSA / PVL

| | |
|-------------|--|
| Taxonomy | Species Marker (<i>S.aureus</i>) positive |
| MRSA (mecA) | positive |
| PVL | negative |

| | | |
|--------------------------|----------|---|
| vatB | negative | Streptogramin |
| vga | negative | Streptogramin |
| vgaA | negative | Streptogramin |
| vgb | negative | Streptogramin |
| aacA-aphD | negative | Aminoglycoside (Gentamicin, Tobramycin) |
| aadD | negative | Aminoglycoside (Tobramycin, Neomycin) |
| aphA | negative | Aminoglycoside (Kanamycin, Neomycin) |
| sat | negative | Streptothricin |
| dfrA | negative | Trimethoprim |
| far | negative | Fusidic acid |
| Q6GD50 | negative | Putative Fusidic Acid Resistance Protein |
| mupR | negative | Mupirocin |
| tetK | negative | Tetracycline |
| tetM | negative | Tetracycline |
| tetEfflux | negative | Tetracyclin Efflux Protein (Putative Transport Protein) |
| cat | negative | Chloramphenicol |
| fexA | negative | Chloramphenicol |
| cfi | negative | Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones (Linezolid), Pleuromutilins, Streptogramin A |
| fosB | negative | Putative Marker For Fosfomycin, Bleomycin |
| vanA | negative | Vancomycin |
| vanB | negative | Vancomycin |
| vanZ | negative | Vancomycin |
| mercury resistance locus | negative | Mercury resistance operon |
| qacA | negative | Unspecific efflux pump |
| qacC | negative | Unspecific efflux pump |

Species Markers / Regulatory Genes

| Gene/Probe | Result | Explanation |
|------------|-----------------|--|
| 23S-rRNA | positive | 23S-rRNA Gene |
| gapA | positive | Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase |
| kata | positive | Catalase |
| coa | positive | Coagulase |
| Protein A | positive | Staphylococcus Protein A |
| sbi | positive | IgG-binding protein |
| nuc | positive | Thermostable Nuclease (DNase) |
| fnbA | positive | Fibronectin-binding Protein A |
| vraS | positive | vraS Sensor Protein |
| sarA | positive | Staphylococcal Accessory Regulator A |
| eno | positive | Enolase, Phosphopyruvate Hydratase |
| saeS | positive | Histidine Protein Kinase (sae Locus) |

| Gene/Probe | Result | Explanation |
|------------|-----------------|-----------------------------------|
| agrI | positive | Accessory Gene Regulator - Type 1 |
| agrII | negative | Accessory Gene Regulator - Type 2 |
| agrIII | negative | Accessory Gene Regulator - Type 3 |
| agrIV | negative | Accessory Gene Regulator - Type 4 |

SCCmec-Typing

| Gene/Probe | Result | Explanation |
|----------------|-----------------|--|
| mecA | positive | Methicillin, Oxacillin and all Beta-Lactams, defining MRSA |
| mecR | negative | Signal Transducer Protein MecR1 |
| mecR_truncated | positive | Signal Transducer Protein MecR1 - truncated |
| mecI | negative | Methicillin-Resistance Regulatory Protein |
| ugpQ | positive | Glycerophosphoryl-diester-Phosphodiesterase (next to mecA) |
| ccrA-1 | negative | Cassette Chromosome Recombinase A, type 1 |
| ccrA-2 | positive | Cassette Chromosome Recombinase A, type 2 |
| ccrA-3 | negative | Cassette Chromosome Recombinase A, type 3 |
| ccrAA-MRSAZH47 | negative | Cassette Chromosome Recombinase A, type ZH47 |
| ccrA-4 | negative | Cassette Chromosome Recombinase A, type 4 |
| ccrB-1 | negative | Cassette Chromosome Recombinase B, type 1 |
| ccrB-2 | positive | Cassette Chromosome Recombinase B, type 2 |
| ccrB-3 | negative | Cassette Chromosome Recombinase B, type 3 |
| ccrB-4 | negative | Cassette Chromosome Recombinase B, type 4 |
| ccrC | negative | Cassette Chromosome Recombinase C |
| merA | negative | Mercuric Reductase (SCCmec type III) |
| merB | negative | Alkylmercury Lyase (SCCmec type III) |
| kdpA-SCC | negative | Potassium-transporting ATPase A chain |
| kdpB-SCC | negative | Potassium-transporting ATPase B chain |
| kdpC-SCC | negative | Potassium-transporting ATPase C chain |
| kdpD-SCC | negative | Sensor Histidine Kinase (Sensor Protein located in KDP Operon Transcriptional Regulatory Protein (|
| kdpE-SCC | negative | |

Resistance Genotype

| Gene/Probe | Result | Explanation |
|------------|-----------------|--|
| mecA | positive | Methicillin, Oxacillin and all Beta-Lactams, defining MRSA |
| blaZ | positive | Beta-Laktamase |
| blaI | positive | Beta Lactamase Repressor (Regulatory Protein) |
| blaR | positive | Beta Lactamase Regulatory Protein |
| ermA | negative | Macrolide, Lincosamide, Streptogramin |
| ermB | negative | Macrolide, Lincosamide, Streptogramin |
| ermC | positive | Macrolide, Lincosamide, Streptogramin |
| linA | negative | Lincosamides |
| msrA | negative | Macrolide |
| mefA | negative | Macrolide |
| mpbBM | negative | Macrolide |
| vata | negative | Streptogramin |

Virulence Genotype

| Gene/Probe | Result | Explanation |
|-------------------------|-----------|---|
| tst-1 | negative | Toxic Shock Syndrome Toxin |
| tst-RF122 | negative | Toxic Shock Syndrome Toxin, allele from bovine strain |
| entA | negative | Enterotoxin A |
| entA-320E | negative | Enterotoxin A, allele from 320E |
| entA-N315 | negative | Enterotoxin A, allele from N315 |
| entB | negative | Enterotoxin B |
| entC | negative | Enterotoxin C |
| entCM14 | negative | Enterotoxin -like Protein (ORF CM14 of U10927.2) |
| entD | negative | Enterotoxin D |
| entE | negative | Enterotoxin E |
| entG | positive | Enterotoxin G |
| entH | negative | Enterotoxin H |
| entI | positive | Enterotoxin I |
| entJ | negative | Enterotoxin J |
| entK | negative | Enterotoxin K |
| entL | negative | Enterotoxin L |
| entM | positive | Enterotoxin M |
| entN | positive | Enterotoxin N |
| entN_1 | positive | Enterotoxin N - other than RF122 |
| entO | positive | Enterotoxin O |
| entQ | negative | Enterotoxin Q |
| entR | negative | Enterotoxin R |
| entU | positive | Enterotoxin U |
| egc-cluster | positive | Enterotoxins seg/sei/sem/sen/seo/seu |
| PVL | negative | Pantone-Valentine Leukocidin |
| lukM/lukF-P83 | negative | Bovine Leukocidin |
| lukF | positive | Haemolysin Gamma, Component B |
| lukS | ambiguous | Haemolysin Gamma, Component C |
| lukS-ST22+ST45 | positive | Haemolysin Gamma, Component C, allele from ST22 |
| hlgA | ambiguous | Haemolysin Gamma, Component A |
| lukD | negative | Leukocidin D Component |
| lukE | negative | Leukocidin E Component |
| lukX | positive | Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein |
| lukY-var1 | positive | Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein |
| lukY-var2 | negative | Leukocidin/Haemolysin Toxin Family Protein, allele from |
| hl | positive | Hypothetical Protein similar to Haemolysin |
| hla | positive | Haemolysin Alpha (Alpha Toxin) |
| hld | positive | Haemolysin Delta (Amphiphilic Membrane Toxin) |
| hlIII | negative | Putative Haemolysin III |
| hl_III_Other than RF122 | negative | Putative Haemolysin III (other than RF122) |
| hib | positive | Haemolysine Beta (Phospholipase C) |
| un-truncated hib | positive | Haemolysine Beta (Phospholipase C / un-truncated) |
| sak | negative | Staphylokinase |
| chp(CHIPS) | ambiguous | Chemotaxis Inhibitory Protein (CHIPS) |
| scn | negative | Staphylococcal Complement Inhibitor (SCIN) |
| eTA | negative | Exfoliative Toxin A |
| erB | negative | Exfoliative Toxin B |
| etD | negative | Exfoliative Toxin D |
| edinA | negative | Epidermal cell differentiation inhibitor A |
| edinB | negative | Epidermal cell differentiation inhibitor B |
| edinC | negative | Epidermal cell differentiation inhibitor C |
| aur | positive | Aureolysin |
| aur - OtherThan252 | negative | Aureolysin, allele from other than MRSA252 |
| aur-MRSA252 | positive | Aureolysin, allele from MRSA252 |
| spA | negative | Serine Protease A |
| spB | negative | Serine Protease B |
| spE | negative | Serine Protease E |
| sspA | positive | Glutamyl Endopeptidase / V8-Protease |
| sspB | positive | Staphopain B |
| sspP | positive | Staphopain A (Staphylopain A) |
| ACME-locus | negative | Arginine catabolic mobile element |
| arcA-SCC | negative | arginine deiminase |
| arcB-SCC | negative | ornithine transcarbamoylase |
| arcC-SCC | negative | carbamate kinase, locus 2 |
| arcD-SCC | negative | arginine/ornithine antiporter |

Capsule / Biofilm

| Gene/Probe | Result | Explanation |
|------------|----------|--|
| capsule-1 | negative | Capsule Type 1 |
| capsule-5 | positive | Capsule Type 5 |
| capsule-8 | negative | Capsule Type 8 |
| capH1 | negative | Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapH Capsule type 1 |
| capJ1 | negative | O-Antigen Polymerase CapJ Capsule Type 1 |
| capK1 | negative | Capsular Polysaccharide Biosynthesis Protein CapK Capsule Type 1 |
| capH5 | positive | Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapH Capsule type 5 |
| capJ5 | positive | O-Antigen Polymerase CapJ Capsule Type 5 |
| capK5 | positive | Capsular Polysaccharide Biosynthesis Protein CapK Capsule Type 5 |
| capH8 | negative | Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapH Capsule type 8 |
| capI8 | negative | Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme CapI Capsule type 8 |
| capJ8 | negative | O-Antigen Polymerase CapJ Capsule Type 8 |
| capK8 | negative | Capsular Polysaccharide Biosynthesis Protein CapK Capsule Type 8 |
| icaA | positive | Intercellular Adhesion Protein A (N-glycosyltransferase) |
| icaC | positive | Intercellular Adhesion Protein C |
| icaD | positive | Biofilm PIA Synthesis Protein D |
| bap | negative | Surface Protein Involved In Biofilm Formation |

MSCRAMMs / Adhaesion Factors

| Gene/Probe | Result | Explanation |
|-------------------|-----------|--|
| bbp-all | positive | Bone Sialoprotein-Binding Protein |
| bbp-COL+MW2 | negative | Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from COL and MW2 |
| bbp-MRSA252 | negative | Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from MRSA252 |
| bbp-Mu50 | negative | Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from Mu50 |
| bbp-RF122 | negative | Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from RF122 |
| bbp-ST45 | ambiguous | Bone Sialoprotein-Binding Protein, allele from ST45 |
| clfA-all | positive | Clumping Factor A |
| clfA-COL+RF122 | negative | Clumping Factor A, allele from RF122 |
| clfA-MRSA252 | negative | Clumping Factor A, allele from MRSA252 |
| clfA-Mu50/MW2 | positive | Clumping Factor A, allele from MU50 / MW2 |
| clfB-all | positive | Clumping Factor B |
| clfB-COL+Mu50 | negative | Clumping Factor B, allele from COL / MU 50 |
| clfB-MW2 | negative | Clumping Factor B, allele from MW2 |
| clfB-RF122 | ambiguous | Clumping Factor B, allele from RF122 |
| cna | positive | Collagen-Binding Adhesin |
| ebh-all | negative | Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein |
| ona | positive | Enolase, <i>Staphylococcus aureus</i> |
| fib | negative | Fibrinogen Binding Protein |
| fib-MRSA252 | positive | Fibrinogen Binding Protein, allele from MRSA252 |
| ebpS | positive | Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein |
| ebpS-01-1111 | negative | Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein, allele from |
| ebpS-COL | positive | Cell Wall Associated Fibronectin-Binding Protein, allele from |
| fibA-all | positive | Fibronectin-Binding Protein A |
| fibA-COL | negative | Fibronectin-Binding Protein A, allele from COL |
| fibA-MRSA252 | negative | Fibronectin-Binding Protein A, allele from MRSA252 |
| fibA-Mu50+MW2 | positive | Fibronectin-Binding Protein A, allele from MU50 / MW2 |
| fibA-RF122 | negative | Fibronectin-Binding Protein A, allele from RF122 |
| fibB-COL | negative | Fibronectin-Binding Protein B |
| fibB-COL+Mu50+MW2 | negative | Fibronectin-Binding Protein B, allele from COL / MU50 / MV |
| fibB-Mu50 | negative | Fibronectin-Binding Protein B, allele from MU50 |
| fibB-MW2 | negative | Fibronectin-Binding Protein B, allele from MW2 |
| fibB-ST15 | negative | Fibronectin-Binding Protein B, allele from ST15 |
| fibB-ST45-2 | negative | Fibronectin-Binding Protein B, allele from ST45 |
| map | positive | Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein |
| map-RF122 | negative | Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein, al RF122 |
| map-MRSA252 | negative | Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein, al MRSA252 |
| map-Mu50+MW2 | positive | Major Histocompatibility Complex Class II Analog Protein, al MU50 / MW2 |
| sdrC-all | positive | Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding C |
| sdrC-B1 | negative | Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding C, allele from B1 |
| sdrC-COL | negative | Ser-Asp Rich Fibrinogen-Binding, Bone Sialoprotein-Binding |

Puce à ADN *S. aureus*

- **Facteurs de virulence :**
 - Toxines : PVL, TSST-1, toxines superantigéniques, ...
 - Résistance particulière (mecA, ermA,B,C, mupA, VanA, ...)
- **Epidémiologie globale : nature du clone**
 - Clone ST80 PVL+
 - USA300 PVL+
 - Clone Géraldine TSST1+ SARM
- **Epidémiologie locale:**
 - Epidémie ou non ?
- **Phylogénie / perte-gain d'éléments mobiles**

Assignement des souches cliniques à un clone

Database versus données de la souche de Mr XXX + algorithme

Typing and Strain Affiliation

MLST and
agr Group Assignment
Strain Assignment
Strain Synonymes

agr_III /CC80 (score
CC80-M
WA-M

**MRSA communautaire
Epidémique en Europe,
Endémique au maghreb
SSTIs, furonculose, P. nécosante**

Database versus données de la souche de Mme YYY + algorithme

Typing and Strain Affiliation

MLST and
agr Group Assignment
Strain Assignment
Strain Synonymes

agr_I/CC398 (score
ST398-M
None

**MRSA d'origine porcine
Endémique en Europe du Nord**

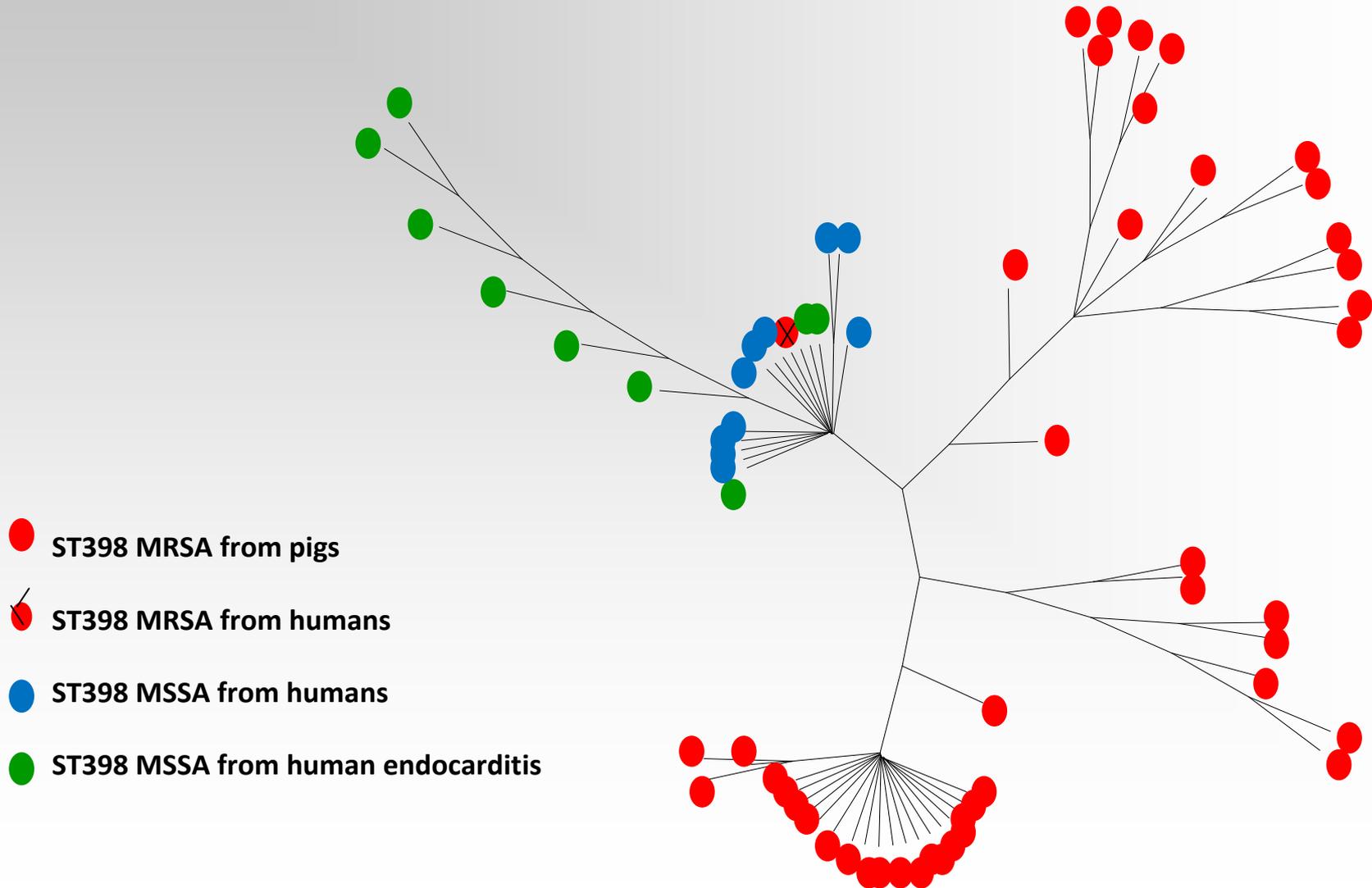
Puce à ADN *S. aureus*

- **Facteurs de virulence :**
 - Toxines : PVL, TSST-1, toxines superantigéniques, ...
 - Résistance particulière (mecA, ermA,B,C, mupA, VanA, ...)
- **Epidémiologie globale : nature du clone**
 - Clone ST80 PVL+
 - USA300 PVL+
 - Clone Géraldine TSST1+ SARM
- **Epidémiologie locale:**
 - Epidémie ou non ?
- **Phylogénie / perte-gain d'éléments mobiles**

Puce à ADN *S. aureus*

- **Facteurs de virulence :**
 - Toxines : PVL, TSST-1, toxines superantigéniques, ...
 - Résistance particulière (mecA, ermA,B,C, mupA, VanA, ...)
- **Epidémiologie globale : nature du clone**
 - Clone ST80 PVL+
 - USA300 PVL+
 - Clone Géraldine TSST1+ SARM
- **Epidémiologie locale:**
 - Epidémie ou non
- **Phylogénie / perte-gain d'éléments mobiles**

Puce à ADN *S. aureus* et phylogénie



Conclusioon

- **Avenir très prometteur ... pour 30 à 60 euros**
- **Combinaison possible:**
 - bactérie/virus
 - résistance virulence
 - typage de souches
- **Puces par syndrome: notion de "panel"**
 - Puce IOA
 - Puce Endocardite
 - Puce Méningite

... mais . optimisation de la sensibilité
. pas quantitatif ... pour l'instant

remerciements



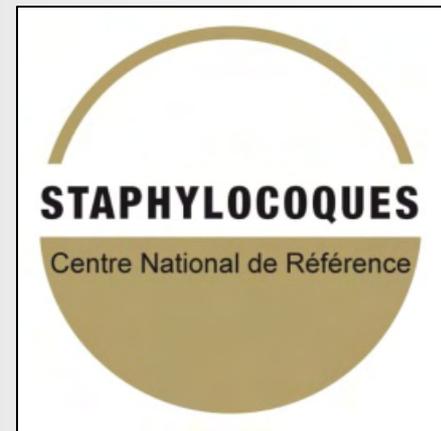
Emilie Allais

INSERM U851:

- ◆ Jérôme Etienne
- ◆ François Vandenesch,
- ◆ Gerard Lina
- ◆ Anne Tristan
- ◆ Michele Bes
- ◆ Olivier Dauwalder
- ◆ Sandrine Boisset
- ◆ Mona Dumitrescu
- ◆ Florence Couzon
- ◆ Yvonne Benito
- ◆ Tristan Ferry
- ◆ Cédric Badioux
- ◆ Muriel Croze
- ◆ ...

Laboratoire de Bactériologie
Groupement Hospitalier Nord
S. Tigaud
C. Roure Sobas
H. Salord
O. Raulin
et l'ensemble des techniciennes ...





SympoStaph

14-15 Octobre 2010

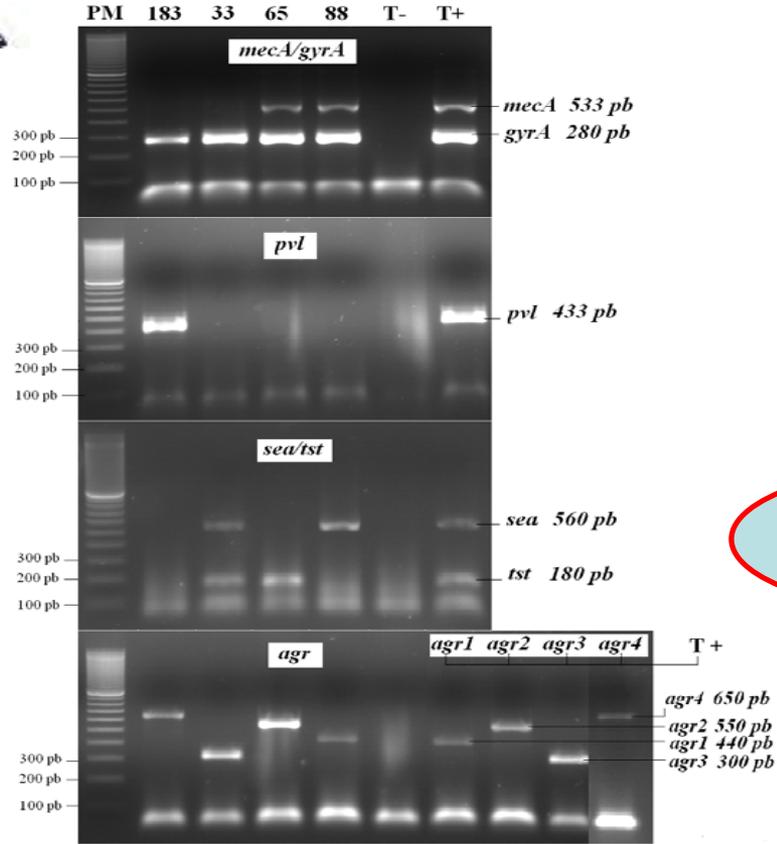
Des infections staphylococciques à la biologie du microorganisme

Colloque translationnel à l'ENS Lyon

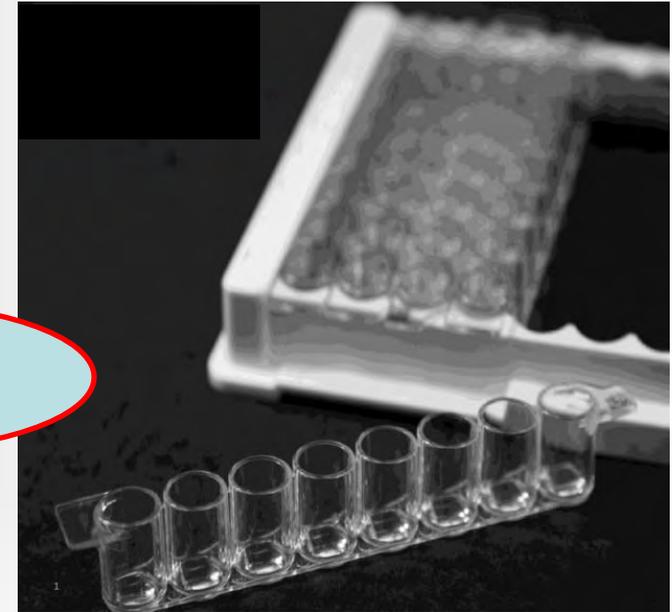
**Amphithéâtre Charles Mérieux
Ecole Normale Supérieure de LYON
46, Allée Italie
69007 Lyon**

http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/hcl2004/CNR_staphylocoques/

Avant les puces ... avec les puces



Versus



1 réaction PCR + 1 puce

+ 4 autres réaction de PCR multiplex
Total = 20 gènes +/- déterminés

Les mêmes 20 gènes
+ 300 autres gènes ou allèles