



**Unité des Rickettsies - CNRS UMR 6020
Fédération de Microbiologie Clinique
Hôpital de la Timone
Marseille**



Méthodes de diagnostic moléculaire en microbiologie

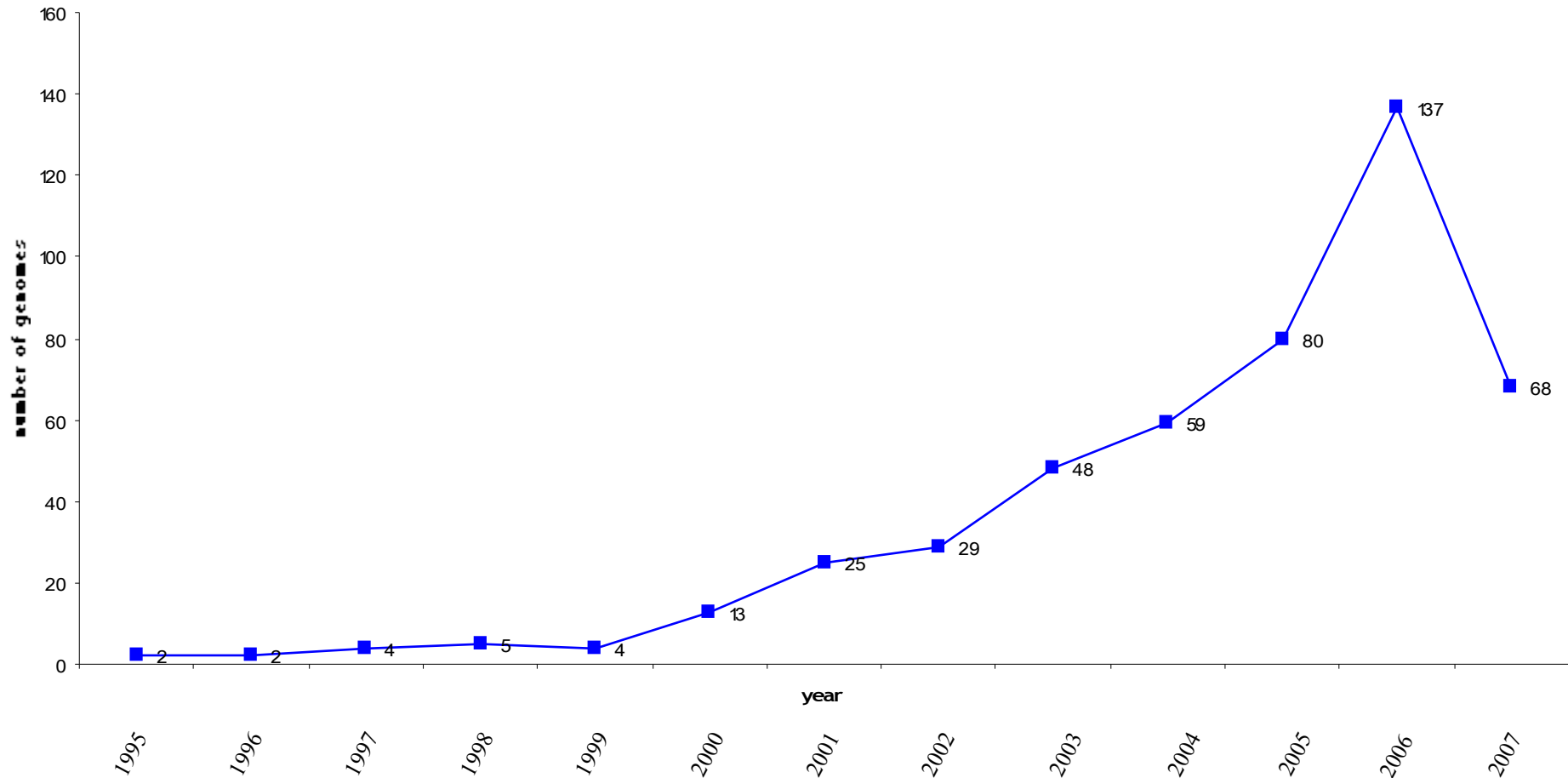
Pr Jean-Marc ROLAIN

JNI - Dijon - 13 Juin 2007

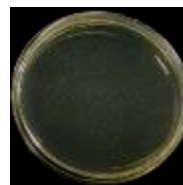


Évolution annuelle du nombre de génomes séquencés

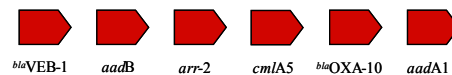
Nombre de génomes séquencés (Juin 2007) : 573 dont ~ 200 pathogènes humains
Nombre de génomes en cours (Juin 2007) : 1133



TAAAGTTTTTAAGCCATCTTTTAAAGCTTACA
 TAAAGTTTTTAAGCCCTCTTTTAAAGCATGCA
 TAAAGTTTTTAAGCCATCTTTTAAAGCTTACA
 TAAAGTTTTTAAGCCATCTTTTAAAGCTTACA

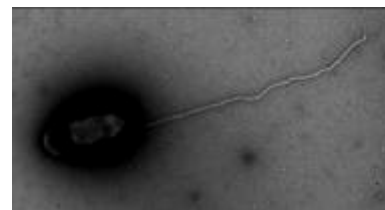


Identification de signatures
spécifiques



Milieux de culture

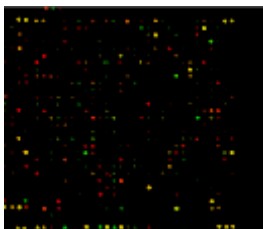
Prédiction de résistance aux antibiotiques
Et design d'antibiotiques



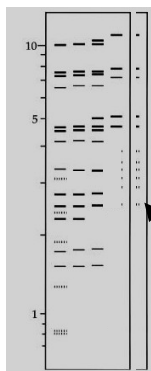
Prédiction de
virulence

ATGTTCAAGGACTATCATGAACATCGGCTATGTTGATGATGTACAACCTTTAAAACAGGGAGTACGTT
 TAAATTTTCTACGCGCTATGACATACAGAGTTTGGAAATGGTGATCGATTGCGTGTTCATGGATTTG
 TCTGACAATTGTCGAGCGGGGGTAAAACAAGCGACTGCTGGTTGGTTGCTGTAGAAGCATGGGAAGAA
 GCATTGCGTTTGACTAATCTTGACAATGGACAAAAGGAACCTTTGTTAATTGGAACTGCTCGTTCGAT
 TAGGTGATGAAATAGGAGGACATTTGGTTCCGGTCATATTGATGGTTGGCTGAAATCATTGATCAAAA
 AAATGAAGGGGATGCAATTCGTTTTATTAAAAGTTGTAAGACAATTTATGCCTTTCATTGCAATAAG
 GGATCTATTGCACCTAATGGGACATCTTGACTGTTAATGGTGTGAGGATTTGTTTTGATGTTCTTA
 TTATTCGCCATACACTCGAAATGACAACGTGGGGACAAGCTAGAAATGGAGATTGGGTCAATTTGGAAAT
 TGATCAACTTGCCTTATGCTCGGAACTTTTTGCTTTAAAAAGAGAATGAATAA

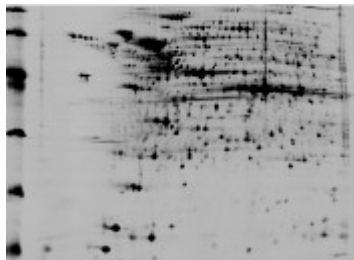
DNA micro-arrays



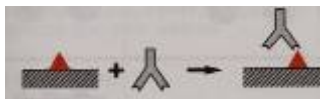
Profils de restriction



Identification
d'épitopes antigéniques



Développement d'anticorps
monoclonaux



Vaccins

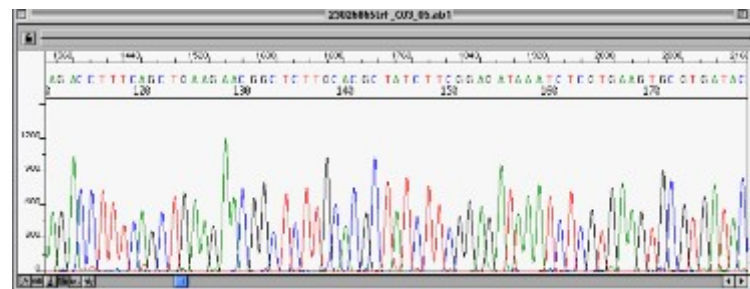
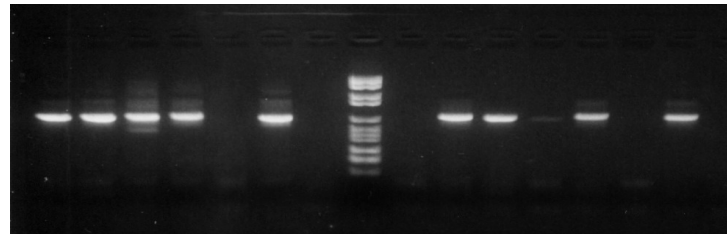
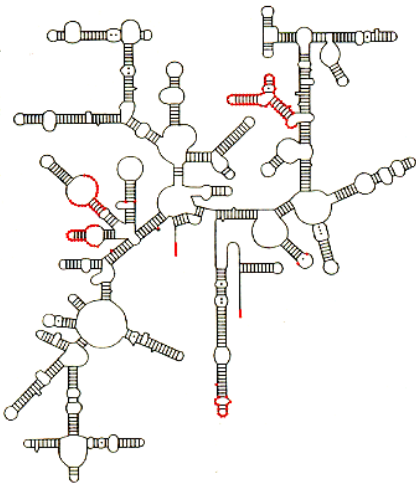


Détection moléculaire & identification

PCR, séquençage
PCR en temps réel
PCR multiplex
Micro-array

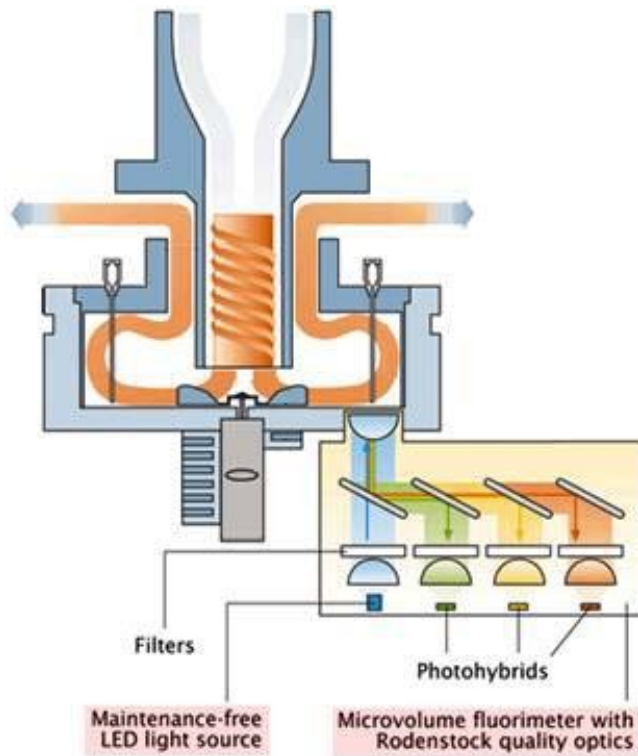
1 - PCR/SEQUENCAGE

- * Caractérisation d 'isolats cliniques non identifiés par les techniques classiques
- * Mise en évidence de bactéries au sein de prélèvements biologiques (LCR, sang, LBA, ganglions, valves cardiaques...)
 - Bactéries non cultivables ou à culture lente (bactéries intracellulaires).
- * Utilisation d 'amorces choisies sur le gène codant l 'ARN 16S, rpoB



2 – PCR en temps réel

La PCR en temps réel avec sondes



- * **Mesure d'une intensité de fluorescence**
- * **Excitation à 470 nm**
- * **Détection à 530 nm, 640 nm et 710 nm**

Lightcycler*

Exemple : Détection et typage du méningocoque

Besoin d'une identification rapide et du typage du méningocoque.

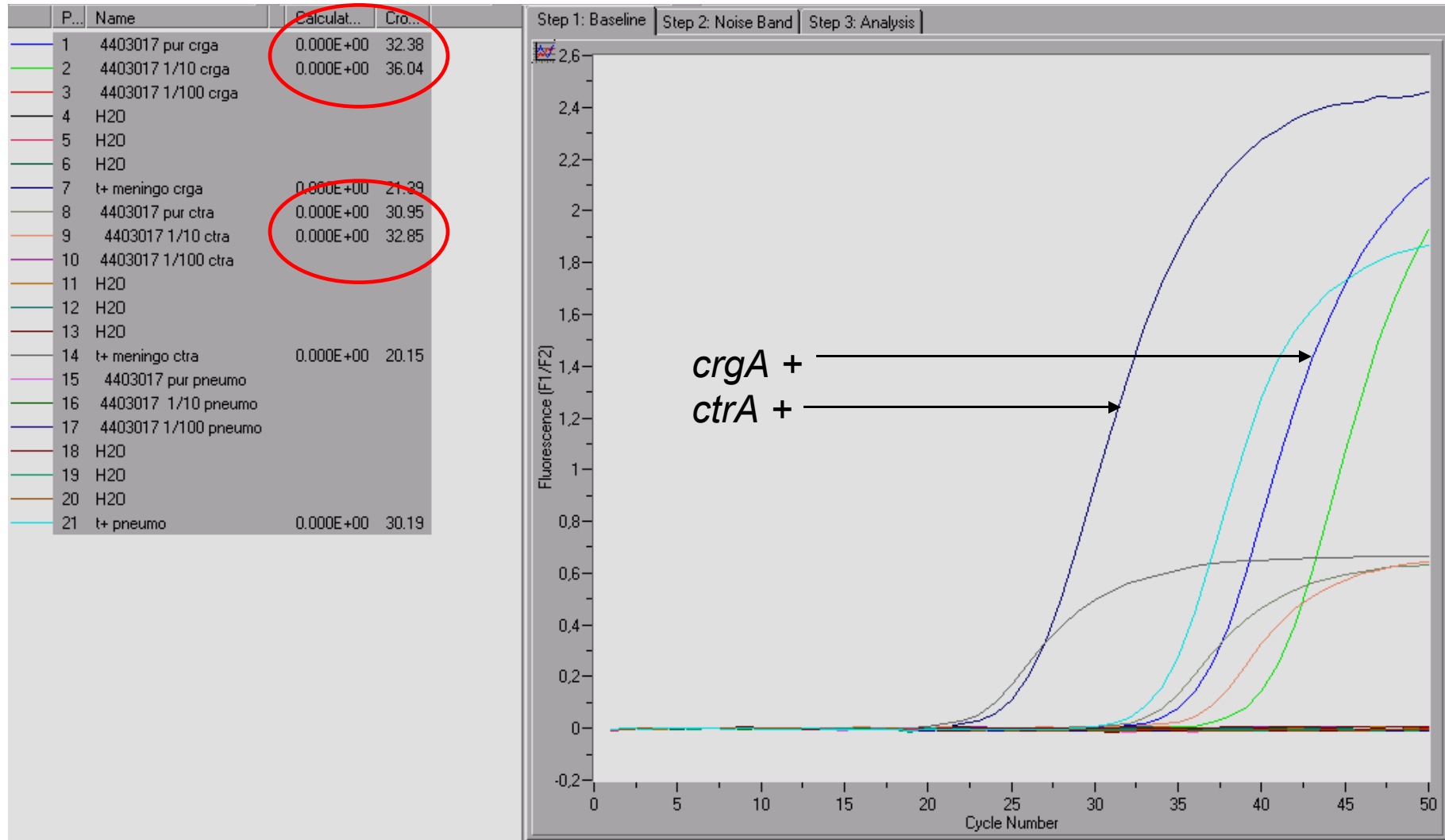
Il existe des vaccins bivalents et tétravalents contre les sérogroupes A/C et A/C/W135/Y mais pas contre le séro groupe B.

Identification: gène *crgA* et *ctrA*

Typage: gène *siaD* (B, C, Y, W135) et gène *orf-2* (A).

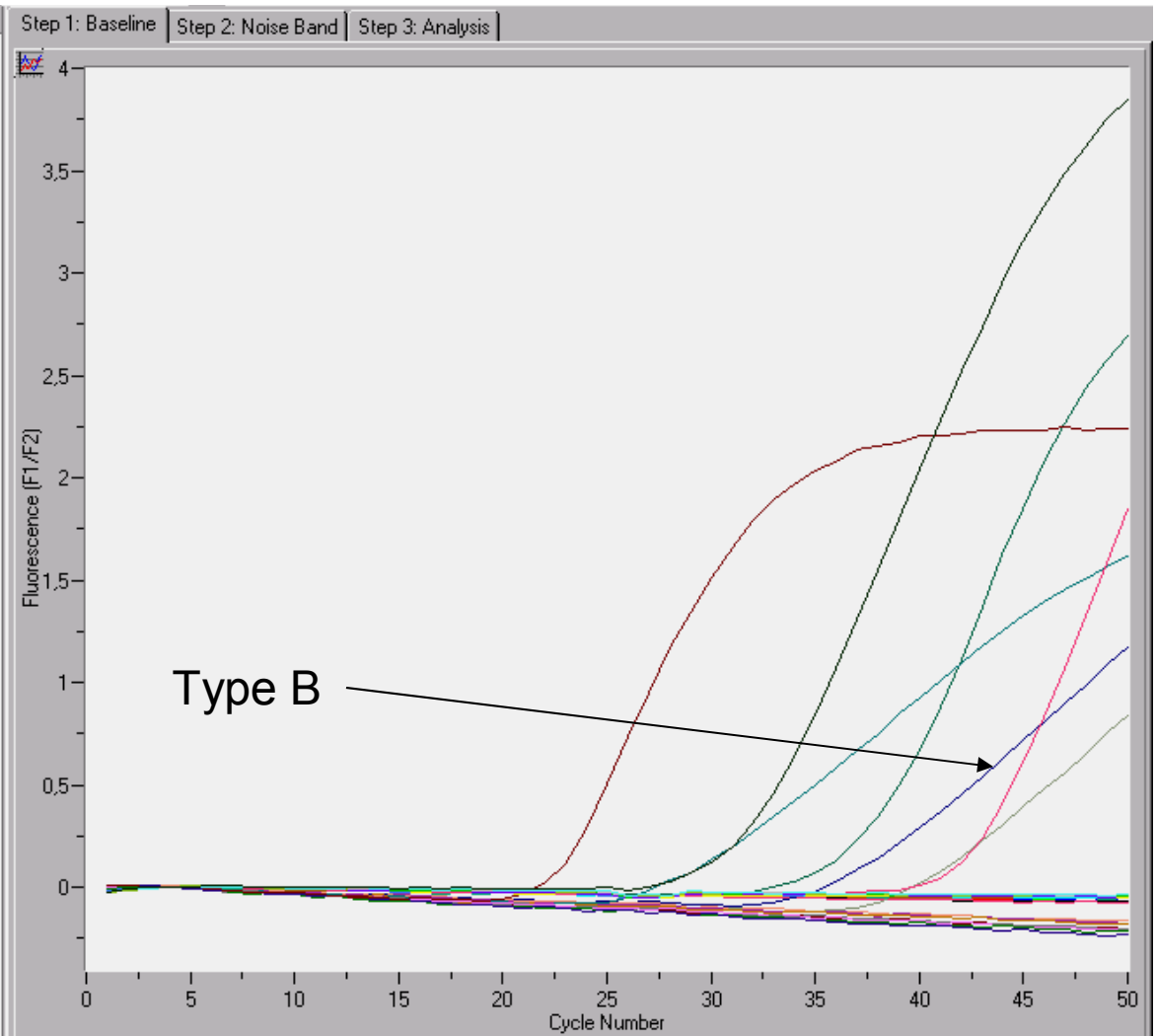
Identification et typage du meningocoque en 3 heures.

EXEMPLE DE DETECTION DU MENINGOCOQUE



EXEMPLE DE TYPAGE DU MENINGOCOQUE

P...	Name	Calculat...	Cro...
1	4403017 pur AMGB		
2	4403017 10		
3	4403017 100		
4	H2O		
5	H2O		
6	T+	0.000E+00	34.28
7	4403017 pur B1	0.000E+00	35.72
8	4403017 10	0.000E+00	39.93
9	4403017 100		
10	H2O		
11	H2O		
12	T+	0.000E+00	28.17
13	4403017 pur CMGB		
14	4403017 10		
15	4403017 100		
16	H2O		
17	H2O		
18	T+	0.000E+00	21.88
19	4403017 pur W135		
20	4403017 10		
21	4403017 100		
22	H2O		
23	H2O		
24	T+	0.000E+00	40.86
25	4403017 pur Y		
26	4403017 10		
27	4403017 100		
28	H2O		
29	H2O		
30	T+	0.000E+00	27.81



Systemes commercialises

Le test IDI-Strep B est realise a partir d'un ecouvillon vaginal.

L'analyse de l'echantillon clinique est effectuee grace a la technologie du PCR en temps reel sur l'appareil Smart Cycler, commercialise par l'entreprise Cepheid



75 minutes



Enterovirus:

The Enterovirus ASR contains primers, a FAM-labeled probe and an Alexa 532-labeled probe that are designed to detect a 115 bp region of the 5' UTR. In addition, the EV ASR contains primers and a Texas Red-labeled probe for a separate sample processing control sequence. This ASR requires an instrument that can detect FAM, Alexa 532 and Texas Red reporter dyes like the Cepheid SmartCycler® System.

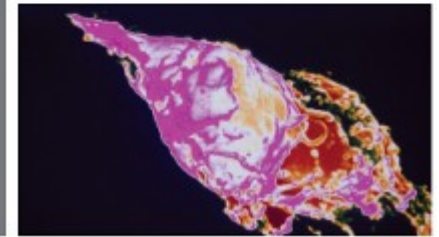
Xpert EV

Consistent
Manufactured under cGMP for maximum product consistency and quality.

Quality Control
Contains an internal control to check for sample inhibition.

Easy to Use
Provided in a lyophilized bead format for increased consistency, ease of use, and greater stability. Each lyophilized bead is sufficient for two 25µl reactions.

Rapid
Designed for rapid results on real-time PCR instruments like the Cepheid SmartCycler.



Comprehensive: Complete coverage of significant serotypes

Table 3: Enterovirus serotypes detected by the Xpert EV Assay:

Species	Serotypes
A	Coxsackie A2-A8, A10, A12, A14, A16, EV71
B	Coxsackie A9, B1-B6, Echo 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33, EV69
C*	Coxsackie A11, A13, A15, A17-22, A24
D	EV68, EV70
Poliovirus	Poliovirus 1-3

2.5 heures

*Coxsackie A1 not available for testing

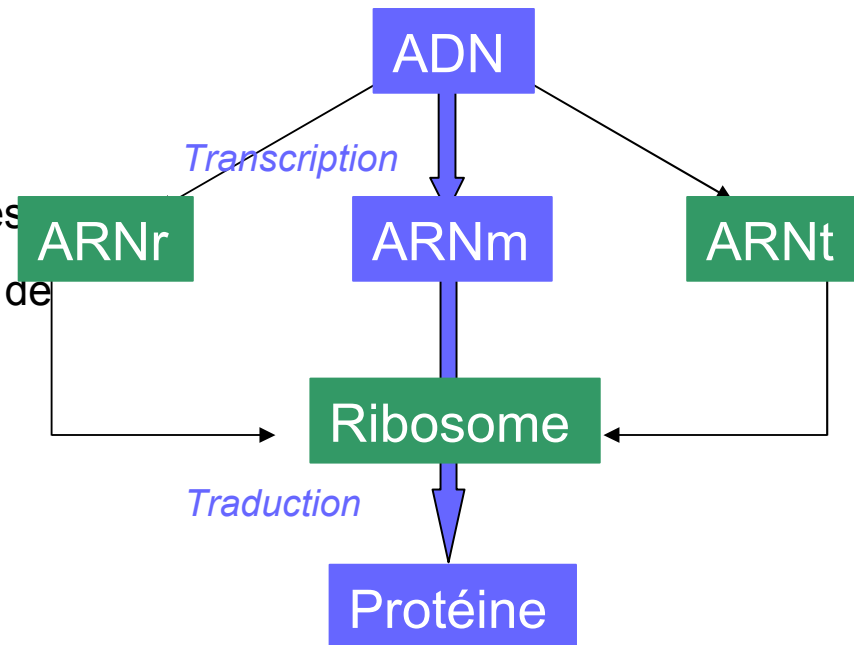
3 – Puces à ADN



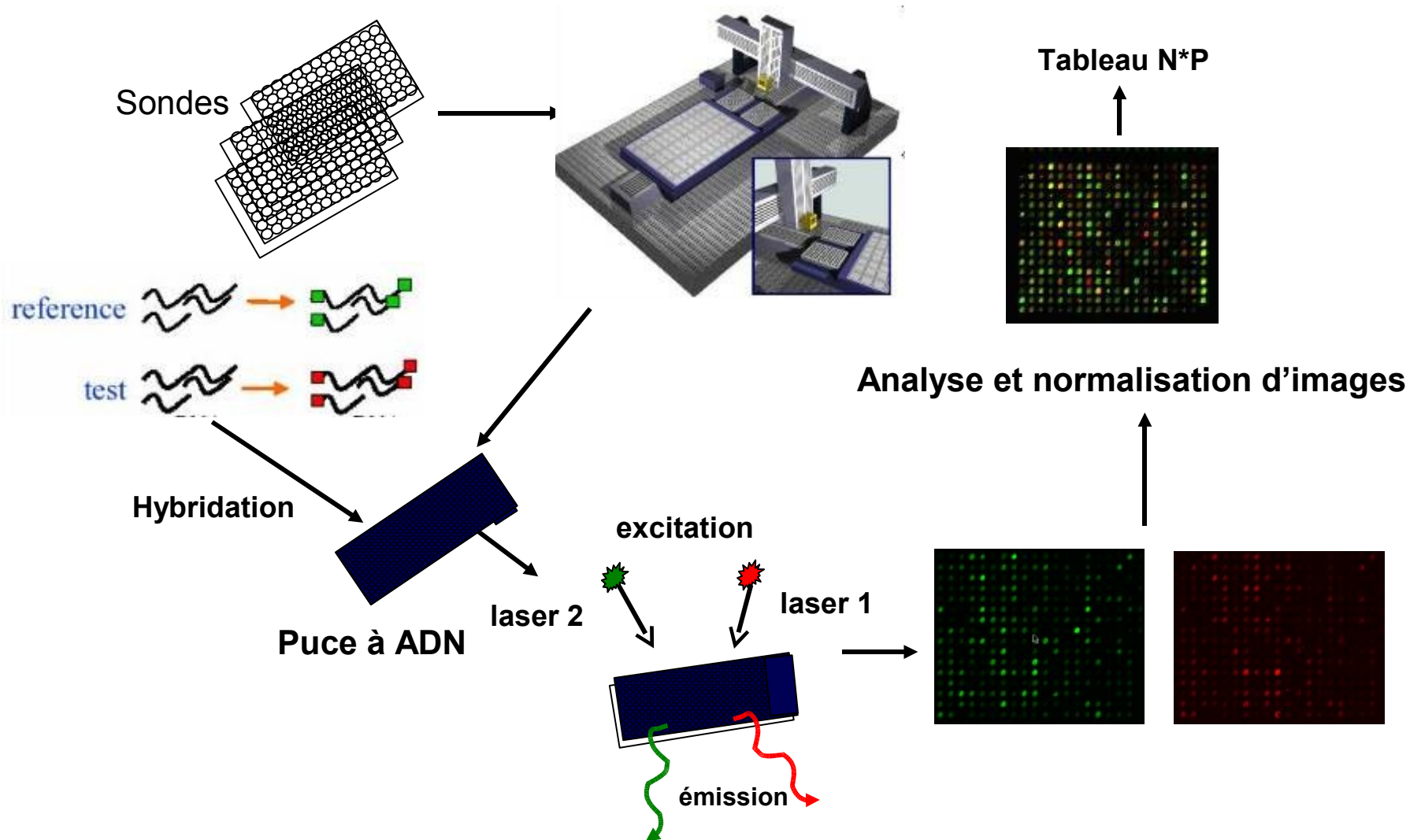
Microarrays



- Technologie en plein essor en microbiologie
- Les puces à ADN permettent de mesurer globalement le niveau d'expression de l'ARNm
- Nombreuses applications
- Kits commercialisés



Puces à ADN



Exemples d'applications

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 2005, p. 2291–2302
0095-1137/05/\$08.00+0 doi:10.1128/JCM.43.5.2291–2302.2005
Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 43, No. 5

Microarray-Based Detection of 90 Antibiotic Resistance Genes of Gram-Positive Bacteria

Vincent Perreten,^{1*} Lorianne Vorlet-Fawer,¹ Peter Slickers,² Ralf Ehricht,²
Peter Kuhnert,¹ and Joachim Frey¹

*Institute of Veterinary Bacteriology, University of Berne, CH-3001 Bern, Switzerland,¹ and
Clondiag Chip Technologies GmbH, D-07743 Jena, Germany²*

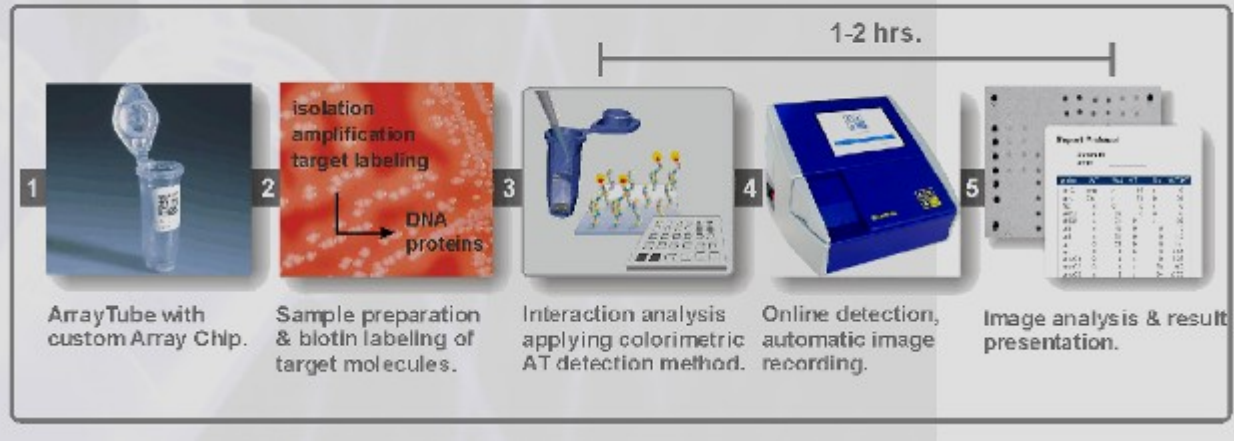
JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 2003, p. 2113–2125
0095-1137/03/\$08.00+0 DOI: 10.1128/JCM.41.5.2113–2125.2003
Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 41, No. 5

Rapid Identification of *Escherichia coli* Pathotypes by Virulence Gene Detection with DNA Microarrays

Sadjia Bekal,^{1,2} Roland Brousseau,¹ Luke Masson,¹ Gabrielle Prefontaine,¹
John Fairbrother,² and Josée Harel^{2*}

Staph ArrayTubes test principle



Ivagen

List of genes detected on Staph ArrayTubes:

S. aureus species marker :

Gene	Notes
catA	catalase
coA	coagulase
femA	Species marker

Antibiotic resistance marker

Gene	Notes
blaZ	penicillin G resistance/beta-lactamase
mecA	Methicillin resistance
aacA-aphD	Aminoglycoside resistance
aadD	Aminoglycoside resistance
aphA3	Aminoglycoside resistance
dfrA	Trimethoprim resistance
tetM	Tetracycline resistance
tetK	Tetracycline resistance
vatA, B	Streptogramin resistance
vga, vgaA, vgb	Streptogramin resistance
ermA, C	Erythromycin/clindamycin resistance

Gene	Notes
msrA	Erythromycin resistance
linA	Clindamycin resistance
far1	Fusidic acid resistance
sat	Streptothricin resistance
vanA, B, Z	Vancomycin, teicoplanin resistance
norA	Membrane associated protein

Antiseptic resistance marker

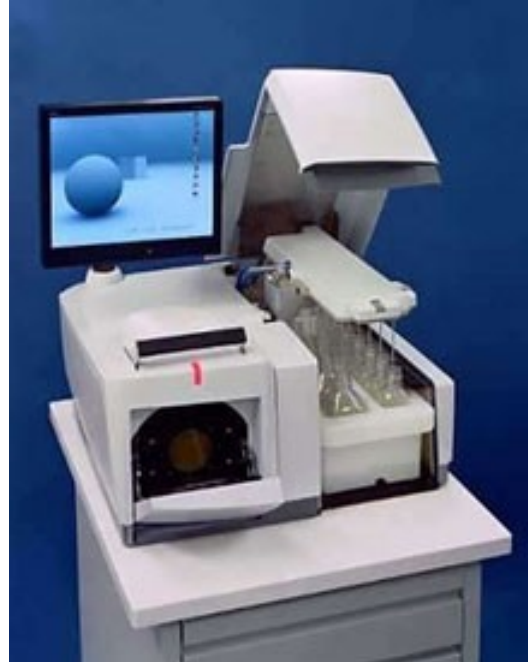
Gene	Notes
mupR	Mupirocin resistance
qacA	Efflux mediated antiseptic resistance

Toxicity marker

Gene	Notes
etA, B	Exfoliatine
lukS,F, F-PV, S-PV	Panton valentine leukocidine
entA,B,C,Q,K	Enterotoxin
tst-1	Toxic shock syndrome

Technologie d'avenir : pyroséquençage

- Pyroséquençage:
 - Courtes séquences d'ADN (<50 bases) spécifiques
 - Séquençage à haut débit (454 Technologie)
 - GS 20 → GS 100
 - Détection rapide de millions de cibles



L'information génétique n'est pas suffisante!



Phenotype



Genotype



- Intéraction entre les gènes (sensibilité aux antibiotiques) nécessite une analyse simultanée du phénotype
- PM Microarray Biolog*

Conclusion

- Il est maintenant possible d'analyser l'expression de milliers de gènes en parallèle et à haut débit.

⇒ Révolution technologique

⇒ Changement d'échelle de la recherche biologique

- Domaine pluridisciplinaire

- Applications multiples

- Détection, en moins d'une heure, des agents infectieux présents dans un échantillon clinique

- Détection de l'éventuelle présence d'une multitude de micro-organismes en même temps