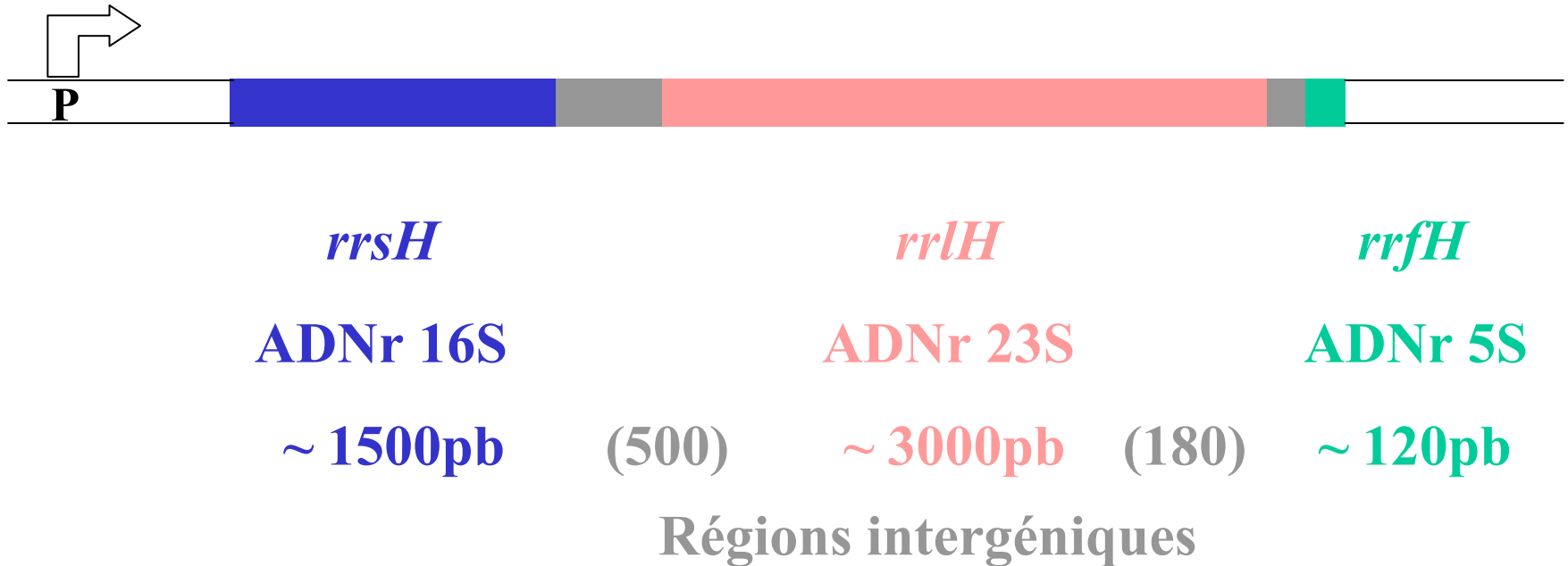


# **Apport de la biologie moléculaire au diagnostic bactériologique des maladies infectieuses : endocardites et septicémies**

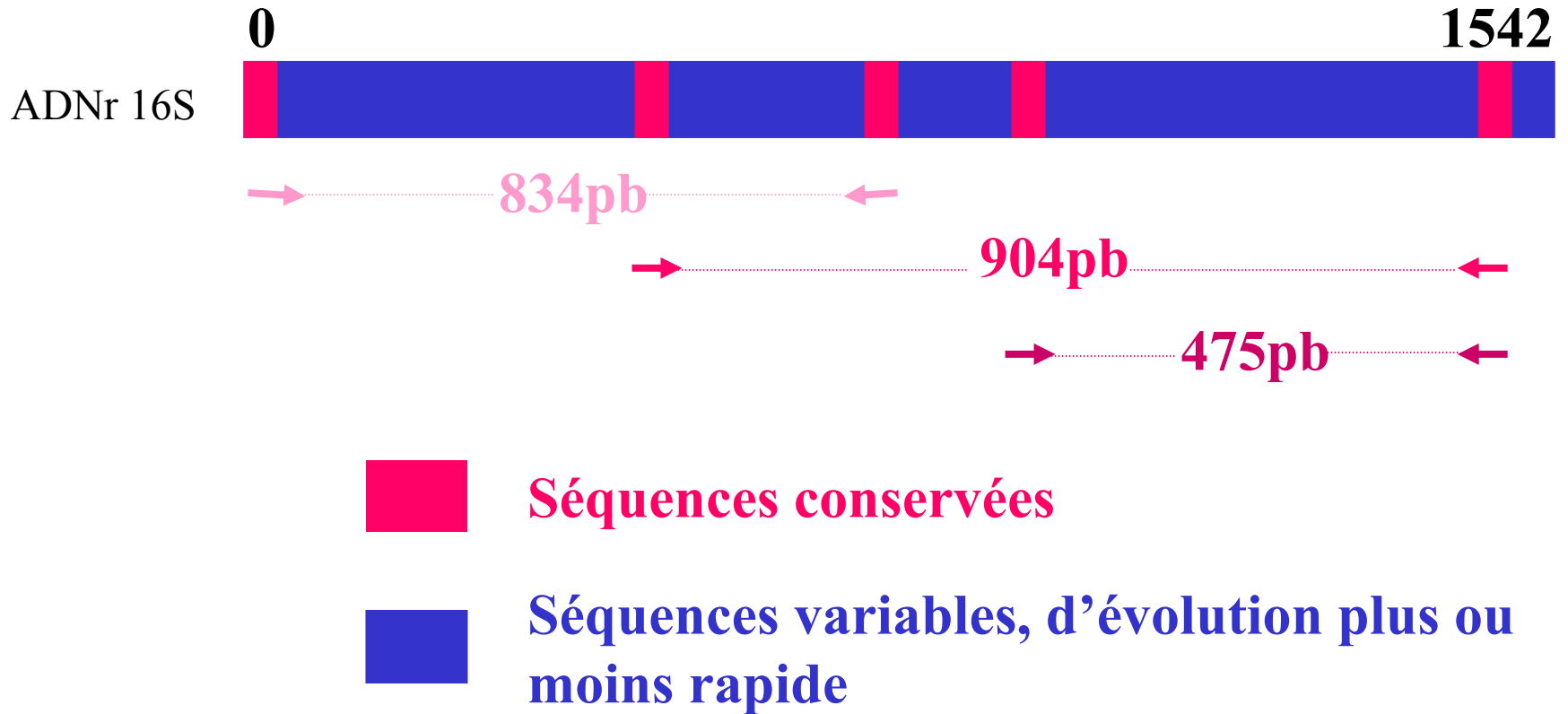
**Isabelle Podglajen, MCU-PH, Microbiologie  
Jean-Luc Mainardi, MCU-PH, Unité Mobile de Microbiologie Clinique  
HEGP, Juin 2004**

# Organisation de l'opéron codant pour les ARN ribosomiaux chez *Escherichia coli*



Plusieurs copies d'opéron dans le chromosome;  
le nombre dépend de l'espèce (7 chez *E. coli* : *H*, *G*, *D*, *C*, *A*, *B*, *E*)

# ADNr 16S, *rrs*



**PCR universelle : amplification possible pour la plupart des bactéries**

# Applications des techniques d'amplification et de séquençage de l'ADNr 16S

- **Diagnostic non spécifique** avec recherche de bactéries dans tous les prélèvements suspects (stériles en culture conventionnelle)
  - \* liquides articulaires
  - \* pus "aseptiques"
  - \* biopsies diverses (rein, rate, foie, valve cardiaque, ...)
- **Diagnostic spécifique** avec recherche de germes de culture lente ou difficile (intra-cellulaires) ou présent en faible quantité dans l'échantillon :
  - \* *Tropheryma whipplei*
  - \* *Bartonella*, *Coxiella*
  - \* *Chlamydia*, *Mycoplasma*
  - \* *Legionella* spp.
- **Identification et taxonomie bactérienne**

# Méthodologie

- **Prélèvement clinique** (conditions de stérilité maximale)
- **Extraction ADN** (eucaryote et procaryote)
- **PCR et détermination des séquences nucléotidiques** des fragments de l'ADN codant pour l'ARNr 16S
- **Analyse critique des séquences**
- **Comparaisons des séquences** avec les données des banques de séquences :
  - GenBank (NCBI Blast)
  - Ribosomal Database Project
  - BiBi Database

**Définition moléculaire de l'espèce bactérienne :**

**Homologie de séquence des ADNr 16S > 97 %**

# Gènes alternatifs utilisés pour identification

Gène	Espèce
<i>rpoB</i>	Entérobactéries, <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Bartonella</i> spp., <i>Rickettsia</i> spp.
<i>sodA</i>	<i>Streptococcus</i> spp., Staphylocoques à coagulase négative, <i>Enterococcus</i> spp.
<i>gltA</i>	<i>Rickettsia</i> spp., <i>Bartonella</i> spp.
<i>rompA</i>	<i>Rickettsia</i> spp. (gpe boutonneux)
<i>omp2</i>	<i>Chlamydia</i> spp.
<i>hsp</i>	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Mycobacterium</i> spp.
<i>gyrB</i>	<i>Acinetobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.
<i>groEL</i>	<i>Borrelia</i> spp.

# Exemple de la recherche et de l'identification de bactéries dans les valves cardiaques

- But A : **identifier les agents infectieux impliqués dans des endocardites dites « à hémocultures négatives »**
  - \* infection décapitée par traitement ATB préalable
  - \* germe de culture difficile ou impossible
  - \* nouveaux pathogènes émergents
- But B : **confirmer ou infirmer l'identification de certaines bactéries isolées d'endocardites à hémoculture positives**
- Prélèvement : végétations, valves, tissus péri-prothétiques

## **Population étudiée (2000/2001)**

- 46 endocardites validées selon la classification de Duke
  - 36 endocardites certaines
    - \* 30 à hémoculture positive
    - \* 6 à hémoculture négative
  - 10 endocardites possibles
- 25 témoins négatifs



# Endocardites certaines (36)

Hémocultures positives (30)			Hémocultures négatives (6)	
PCR -		PCR +	PCR -	PCR +
4		26	1	5
Concordance		Discordance (Hémoc/valve, 16S)	<i>S. gallolyticus</i> <i>B. quintana</i> (3) <i>B. henselae</i>	
16		10		
<i>S. aureus</i>	<i>C. fetus</i>	Strepto. Gpe B / <i>L. crispatus</i>		
<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i> *			
<i>S. caprae</i>	<i>P. acnes</i>	Strepto. Gpe C / <i>A. adjacens</i>		
	<i>S. aureus</i> (2)	<i>Streptococcus sp.</i> / <i>S. gordonii</i>		
<i>S. aureus</i> +	<i>S. mutans</i>	<i>S. mitis</i> (2) / <i>S. sanguis</i> (2)		
<i>S. pneumoniae</i> +	<i>S. sanguis</i>	<i>S. sanguis</i> / <i>S. oralis</i> *		
<i>E. coli</i>	<i>S. gallolyticus</i> (4)	<i>S. salivarius</i> / <i>S. oralis</i> *		
	<i>S. oralis</i> (2) *	<i>H. influenzae</i> / <i>H. aphrophilus</i>		
	<i>S. mitis</i> (2) *	<i>H. aphrophilus</i> / <i>H. paraphrophilus</i>		
	<i>S. pneumoniae</i> *			
		<i>Gemella sp.</i> / <i>Aerococcus urinae</i>		

# Endocardites possibles (10)

Hémoculture	PCR 16S	Histologie
-	-	-

# **Amplification universelle de l'ADNr 16S dans le sang ou le sérum (données de la littérature)**

- Cliquer pour ajouter du texte

# PCR spécifiques sur sang ou sérum (données de la littérature)

- ***Brucella* spp. :**
  - ADNr 16S; sang;
  - 100% spécificité; > 85 % sensibilité(Nimri L.F., BioMed Central Infect. Dis., 2003, 3:5-12)
- ***Coxiella burnetii* :**
  - *htpAB*-séquence répétée; sérum; LCN PCR;
  - 100 % spécificité; 24% sensibilité dans les deux semaines suivant le début des signes cliniques (versus 14 % pour la sérologie)(Fournier *et al.*, J. Clin. Micro., 2003, 41:5094-98)
- ***Borrelia burgdorferi* :**
  - ADNr 16S; sang
  - 100 % spécificité; < 10 % sensibilité(Chmielewski *et al.*, Mol. Diagn., 2003, 7:3-4)
- ***Tropheryma whippelii* :**
  - ADRr 16S; séquence répétée
  - 100 % spécificité; ?(Fenolla *et al.*, J. Clin. Microbiol., 2004, 42:401-3)
- ***Bartonella* spp. :**
  - *ribC*; sérum
  - 100 % spécificité; 58 % sensibilité(Zeaiter *et al.*, J. Clin. Microbiol., 2003, 41:919-925)

# Limites des techniques de biologie moléculaire (1)

- **Validation clinique** nécessaire
- **Faux négatif :**
  - \* Choix du fragment de biopsie à traiter
  - \* Bactéries difficile à lyser
  - \* Présence d'inhibiteurs de la Taq dans certains tissus ( $\beta$ -globine)
  - \* Seuil théorique de détection (1 copie d'ADN)/  
Détection reproductible (20 à 40 UFC/ml pour *M. tuberculosis*)
- **Faux positif et problèmes d'interprétation:**
  - \* Contaminations
  - \* Non adapté pour les infections plurimicrobiennes
  - \* Discrimination insuffisante

# **Limites de ce type de technique pour une exploitation à plus vaste échelle (2)**

- Coût
- Absence de Kit sur le marché; standardisation
- Locaux adaptés
- Compétences en BM et entraînement nécessaires