

TD Biologie Moléculaire

PCR Multiplex pour la détection de *Campylobacter*, *Salmonella* et *Shigella*

1. Présentation de la technique

Les genres *Campylobacter*, *Salmonella* et *Shigella* sont impliqués dans des infections intestinales. Ils sont recherchés dans les selles diarrhéiques dans un but diagnostique et épidémiologique. Les techniques conventionnelles d'identification permettent de rendre un résultat entre 30 et 72h après prélèvement, c'est le cas par exemple pour *Salmonella* et *Shigella* lorsqu'un enrichissement est nécessaire. La PCR permet de mettre en évidence la présence de bactéries recherchées directement à partir d'un échantillon de selles. Compte tenu de la sensibilité de cette technique certains prélèvements peuvent s'avérer positifs en PCR alors qu'ils auraient été négatifs par méthode conventionnelle.

La PCR multiplexe permet d'identifier simultanément plusieurs agents dans un même échantillon. L'intérêt est le gain de temps et l'économie de matériel.

Les amorces utilisées dans cette étude permettent d'amplifier :

- Le gène *invA* des *Salmonella* ;
- Le gène *ipaH* des *Shigella* ;
- Le gène ARNr 16S de *Campylobacter*.

Tableau 1 : séquence des amorces utilisées :

Primers for multiplex real-time PCR

Pathogen	Gene	Orientation ^a	Primer (5'→3')	Final concn (μM)	Amplicon size (bp)	Amplicon T_m (mean ± SD)
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	F	CATTTCATATGTTTCGTCATTCCATTACC	0.40	132	82.96 ± 0.05
		R	AGGAAACGTTGAAAACTGAGGATTCT			
<i>Shigella</i> spp.	<i>ipaH</i>	F	CGCGACGGACAACAGAATACACTCCATC	0.20	108	85.56 ± 0.28
		R	ATGTTCAAAGCATGCCATATCTGTG			
<i>Campylobacter</i> spp.	16S rRNA	F	GGATGACACTTTTCGGAGC	0.40	812	89.21 ± 0.24
		R	CATTGTAGCACGTTGTGTC			

^aF, forward; R, reverse.

Le mix de réaction contient :

- Les dXTP (nucléotides) ;
- La Taq polymérase ;
- Les amorces ;
- Le tampon.

On utilise la technique du "Hot-start" pour éviter des amplifications non spécifiques. Chaque cycle est composé d'une :

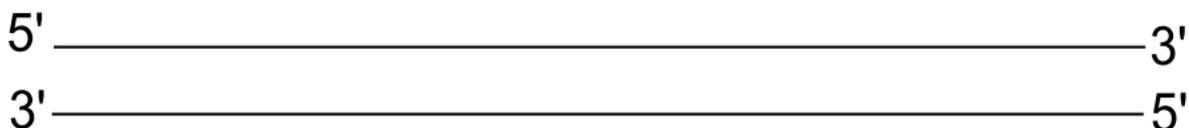
- Incubation de 30s à 98°C ;
- Incubation de 30s à 65°C ;
- Incubation de 30s à 72°C.

Après 30 cycles une électrophorèse est réalisée pour mettre en évidence s'il y a eu amplification. La présence d'une bande correspondant à un amplicon recherché permet de mettre en évidence la présence de la souche dans l'échantillon de départ.

2. Répondre aux questions suivantes

Q1 Expliquer la raison pour laquelle un résultat PCR peut être positif alors qu'un ensemencement peut s'avérer négatif à partir du même prélèvement.

Q2 Sur la représentation schématique ci-dessous d'un gène à amplifier, placer l'amorce F et l'amorce R qui permettraient de l'amplifier. Votre schéma doit préciser l'orientation de chaque amorce et visualiser sur quel brin du gène elle s'hybride. Rappel : la Taq polymérase réalise l'élongation dans le sens 5' → 3' à partir de l'amorce. Schéma du gène à amplifier :

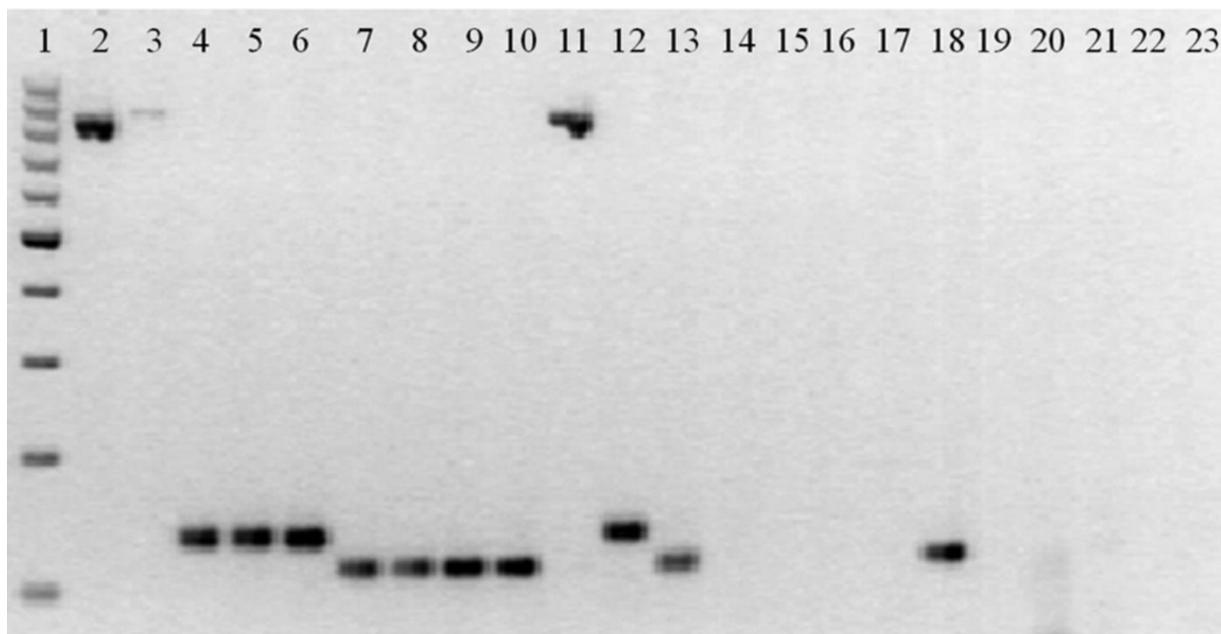


Q3 Indiquer le nom des dXTP présents dans le mix.

Q4 Expliquer la raison pour laquelle une PCR multiplexe est plus économique en temps et en matériel qu'une PCR classique.

Q5 Le document ci-dessous présente des résultats obtenus lors de la validation de la méthode. Actuellement la mise en évidence des micro-organismes par cette technique dans les selles est toujours suivie d'une identification classique et d'un sérotypage. Commenter ces résultats et expliquez l'intérêt de maintenir une identification classique.

Résultats obtenus pour la PCR multiplexe sur différentes souches témoins :



Électrophorèse en gel d'agarose (2%) pour différents échantillons. De gauche à droite : 1 marqueurs de taille d'échelle 100pb 2 Témoin *Campylobacter coli*; 3 Témoin *Campylobacter jejuni*; 4, *Salmonella enteritidis*; 5, *S. infantis*; 6, *Salmonella* spp.; 7, *Salmonella boydii*; 8, *S. dysenteriae*; 9, *S. flexneri*; 10, *S. sonnei*; 11, *C. jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 33560; 12, *S. enteritidis* ATCC 13076; 13, *S. flexneri* ATCC 12022; 14, diffusely adherent *E. coli*; 15, enteroaggregative *E. coli*; 16, enteropathogenic *E. coli*; 17, enterotoxigenic *E. coli*; 18, enteroinvasive *E. coli*; 19, Shiga-like toxin producer *E. coli*; 20, *E. coli* K-12; 21, *Pseudomonas aeruginosa*; 22, *Klebsiella pneumoniae*; 23, *Proteus mirabilis*.

Q6 On envisage d'adapter la technique afin de réaliser une PCR en temps réel ou QPCR (quantitative PCR). Proposer une piste de modification du mix qui permettrait de réaliser une QPCR.

Bibliographie : Multiplex Real-Time PCR for detection of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella* [E. Barletta](#),^a [E. H. Mercado](#),^a [A. Lluque](#),^a [J. Ruiz](#),^{c,d} [T. G. Cleary](#),^b and [T. J. Ochoa](#)^{a,b} - J Clin Microbiol. 2013 Sep.