



Génétique

Electrophorèse d'ADN

Réf : 117 232

Kit Détection Résistance aux antibiotiques (électrophorèse d'ADN)

Français – p 1

Version : 2301

1 Introduction

❖ Les infections nosocomiales

5 % des patients hospitalisés sont concernés, on estime à plus de 4000 décès causés directement par ces infections.

Contractées le plus souvent au cours d'une hospitalisation, les infections nosocomiales sont directement liées aux pratiques médicales qu'a subi le patient. Les germes sont apportés par le patient ou par le matériel utilisé ou l'environnement hospitalier.

La nature des infections est fréquemment liée à la typologie de l'intervention médicale.

Acte médical	Infection communément associée	Fréquence
Pose de sonde urinaire	Urinaire	30 %
Intubation/ventilation	Pneumonies	16,7 %
Infection du site opératoire	Des Infections	13,5 %
Introduction de cathétérisme dans les voies sanguines	Bactériémies/septicémies	10 %

Les infections pulmonaires et les septicémies sont les plus graves et peuvent entraîner la mort.

❖ La résistance bactérienne : un phénomène préoccupant dans la lutte contre les infections nosocomiales

3 bactéries représentent 50 % des germes isolés à partir d'une infection nosocomiale :

- ***Escherichia coli*** (26%), Entérobactérie du microbiote intestinal
- ***Staphylococcus aureus*** (16%), bactérie de la flore cutanée, présente dans la muqueuse du nez, de la gorge et sur le périnée, 30 à 50 % de la population est porteur sain
- ***Pseudomonas aeruginosa*** (8,4%), qui se développe dans les sols, l'eau et en milieu humide (robinets, tuyauteries...).

Parmi les bactéries détectées, on retrouve un nombre croissant de souches porteuses de résistances aux antibiotiques.

Ainsi pour *Pseudomonas aeruginosa*, 20 % sont résistantes à la ceftazidime ou aux carbapénèmes.

Pour *Staphylococcus aureus*, 38 % sont résistantes à la méticilline (SARM) et 1,5 % présentent en plus une sensibilité diminuée aux glycopeptides.

<https://www.inserm.fr/dossier/infections-nosocomiales/>
<https://www.inserm.fr/dossier/resistance-antibiotiques>

❖ SARM : un problème pour l'hôpital

Staphylococcus aureus ou staphylocoque doré, est une bactérie que l'on retrouve normalement sur la peau ou dans le nez d'un tiers de la population sans pour autant déclencher une infection. Dans certaines conditions, en fonction de l'état physique de la personne et de la voie de pénétration de la bactérie, celle-ci peut provoquer une infection (infection de la peau, arthrite, pneumonie, septicémie, etc.).

Staphylococcus aureus et les staphylocoques à coagulase négative (SCN) occupent une place importante en pathologie nosocomiale. Ces micro-organismes présentent très souvent une résistance multiple aux antibiotiques.

Staphylococcus aureus résistantes à la méticilline (SARM) est responsable de pathologies : graves infections pulmonaires, osseuses ou septicémies.

La pénicilline M (Méticilline) a été commercialisée en 1961, les premières résistances sont apparues dès 1962.

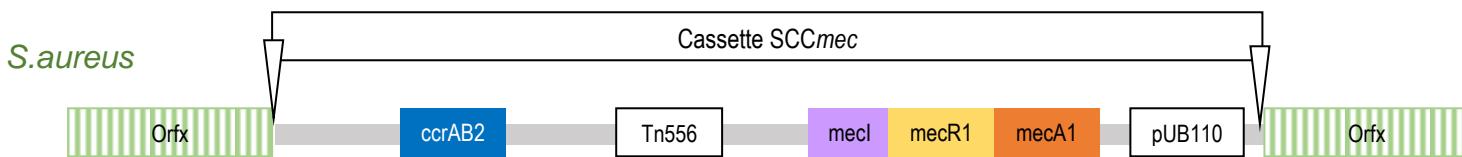
Jusqu'en 1993, les contaminations restèrent confinées aux structures médicales, puis sont apparues les premières épidémies de SARM communautaires, en dehors du secteur médical. De nouveaux clones indépendants des 5 clones hospitaliers référencés sont alors apparus principalement en Europe et en Amérique du Nord.

Le mécanisme de résistance à la méticilline est déterminée par la présence d'un gène chromosomique *mecA* qui code pour la PLP2a.

❖ Le gène *mecA*

Le gène *mecA* code pour une enzyme β -lactamase.⁽¹⁾ Ce gène de résistance est présent chez 90 % des isolats cliniques de *s.aureus*, c'est l'acquisition de ce fragment d'ADN de 2,1 kb qui confère à la bactérie le caractère résistant aux β -lactamines. Le *mecA* code pour une protéine : la β -lactamase. Cet enzyme est capable d'hydrolyser le cycle lactame des pénicillines, les rendant inactives. La production de cette pénicillinase entraîne une résistance à la pénicilline G et aux pénicillines A (ampicilline, amoxicilline...), aux carboxypénicillines (ticarcilline), et aux uréidopénicillines (pipéracilline).

Le gène *mecA* est inclus dans un élément génétique mobile, dénommé la cassette staphylococcique SCCmec (staphylococcal cassette chromosome *mec*)



Cassette SCCmec présente, le complexe *mec*, des gènes régulateurs de l'expression de *mecA*, ainsi qu'un complexe de gènes de recombinases, responsables de la mobilité de la cassette. Il existe au moins 8 types de cassettes SCCmec identifiés⁽²⁾.

❖ Le principe de l'électrophorèse d'ADN en gel

En milieu légèrement basique, l'ADN se comporte comme une chaîne polyanionique (groupements phosphates ionisés). Placés dans un gel d'agarose et soumis à un champ électrique, des fragments d'ADN de tailles différentes migrent plus ou moins rapidement suivant leur masse moléculaire. La charge relative des fragments étant la même, c'est essentiellement l'effet de tamisage exercé par le gel qui influe sur la migration. La vitesse de déplacement diminue donc avec la taille des fragments, celle-ci étant exprimée en nombre de paires de bases (pb) ou en kb (1 kb = 1000 pb).

Le kit se présente sous la forme de solutions d'ADN prêt à déposer dans le gel : les solutions d'ADN sont calibrées et ne nécessitent aucune préparation. Ces solutions contiennent le tampon de charge et les colorants témoins de migration.

Format 40 élèves : 20 tests soit 80 dépôts à analyser

1 test correspond à :

- 1 dépôt contrôle négatif (8 µl)
- 1 dépôt contrôle positif (8 µl)
- 1 dépôt souche patient 1 Hopital (8 µl)
- 1 dépôt souche patient 2 Hopital (8 µl)

+ 10 dépôts Echelle de poids moléculaire (jusqu'à 10 gels)
1 dépôt échelle de poids moléculaire par gel électrophorèse

Durée globale de la séance 30 à 40 minutes
Dont migration électrophorèse : 15 - 20 minutes

2 Matériels et produits nécessaires

Composition du kit :

- Tube 1 contrôle négatif 175 µL
- Tube 2 contrôle positif 175 µL
- Tube 3 Souche patient 1 Hôpital 175 µL
- Tube 4 Souche patient 2 Hôpital 175 µL
- Marqueur de taille 90 µL

Consommables nécessaires (non fournis)

Agarose
Tampon TAE
Colorant

Réf. 107646 : cette référence regroupe tous les consommables indispensables pour réaliser 10 mini gels d'agarose pour système compact avec fluorescence (Agarose 4 g / TAE 10 x 200mL / colorant GelGreen 30 µl)

Matériels complémentaires :

- Cuve à électrophorèse ADN
- Micropipettes 2-20 µl

3 Principe de l'expérience

Contextualisation : Les tubes de ce kit contiennent des produits d'amplification par PCR. Le scénario se situe dans un contexte d'infection nosocomiale à *staphylococcus aureus* résistant à la méticilline. La présence d'une souche multirésistante est suspectée dans un service hospitalier. L'électrophorèse va étudier le résultat de PCR des prélèvements réalisés sur 2 patients.

❖ Principe du dépistage génétique

Pour caractériser la nature exacte de l'infection, on réalise une recherche par amplification PCR sur 3 zones spécifiques du génome bactérien *s aureus* SARM

Gène ARNr 16S

Gène ARNr 16S, codant pour ARN ribosomique (petite sous-unité des ribosomes), constituant communs aux procaryotes
Fragment PCR amplifié : 850pb

Gène nuc

Gène nuc spécifique de *s.aureus* ⁽³⁾, code pour une nucléase thermostable
Fragment PCR amplifié : 260 pb

Gène mecA

Gène mecA est spécifique de *s.aureus*, résistante à la méticilline (SARM) code pour pénicillinase (PLP2a)
Fragment PCR amplifié : 533pb

L'objet de ce TP est la réalisation d'une électrophorèse sur gel d'agarose qui va permettre de visualiser les résultats de l'amplification PCR des prélevements réalisés sur 2 patients.

❖ **Résultat attendu du test génétique**

La présence de bactéries dans le prélevement est caractérisée par une bande d'ADN de 850 pb (ARNr 16S).

La présence de *staphylococcus aureus* dans le prélevement est caractérisée par une bande de 260pb (*nuc*)

La présence de *staphylococcus aureus* souche résistants à la méticilline (SARM) dans le prélevement est caractérisée par une bande de 533 pb (*mecA*)

4 Mode opératoire

4.1 Préparation des solutions

❖ **Préparation du tampon TAE 1X :**

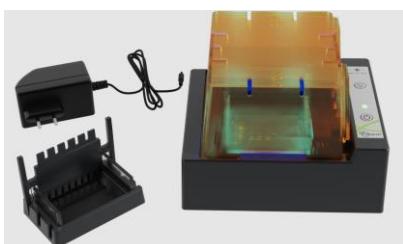
- Le volume de tampon nécessaire par cuve est d'environ 150 mL (gel + tampon migration).
- Verser le contenu du flacon de tampon TAE 10X (Tris Acétate EDTA) dans 900 ml d'eau distillée, bien mélanger.

❖ **Préparation et coulage d'un gel d'agarose à 1,5%* :**

- Verser 15 mL de tampon TAE 1X dans un erlenmeyer de 50 mL.
- Peser 0,22 g d'agarose dans une capsule et le verser en pluie fine dans le tampon TAE.
- Mettre l'erlenmeyer contenant le TAE et l'agarose au micro-onde pendant 20 à 30 secondes – stopper à l'apparition de l'ébullition - (*ou sur un agitateur magnétique chauffant avec un turbulent jusqu'à dissolution complète*).
- S'assurer que la solution est parfaitement translucide
- Ajouter 2 µl de colorant GelGreen à l'aide de la micropipette, bien agiter l'erlenmeyer
- Laisser l'erlenmeyer refroidir quelques instants sur la paillasse 2 à 3 min, puis verser dans le moule équipé du peigne à petites dents.

* La concentration en agarose à 1,5 % permet d'avoir une résolution optimale de la séparation des fragments d'ADN afin obtenir la lecture la plus juste des tailles des fragments. Des gels à 1 % ou 2 % conviennent également pour obtenir des résultats exploitables.

phorEasy



Dispositif électrophorèse tout en un



❖ Préparation de l'ADN

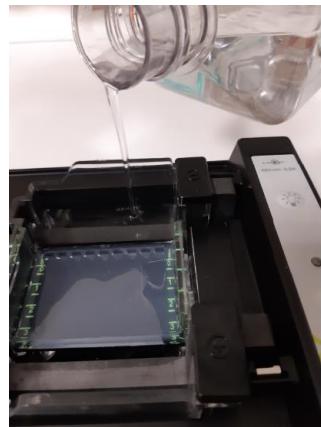
- Les solutions sont directement prêtes à l'emploi, il convient à l'enseignant de faire des aliquots de chaque échantillon avant la séance.

4.2 Dépôt de l'ADN

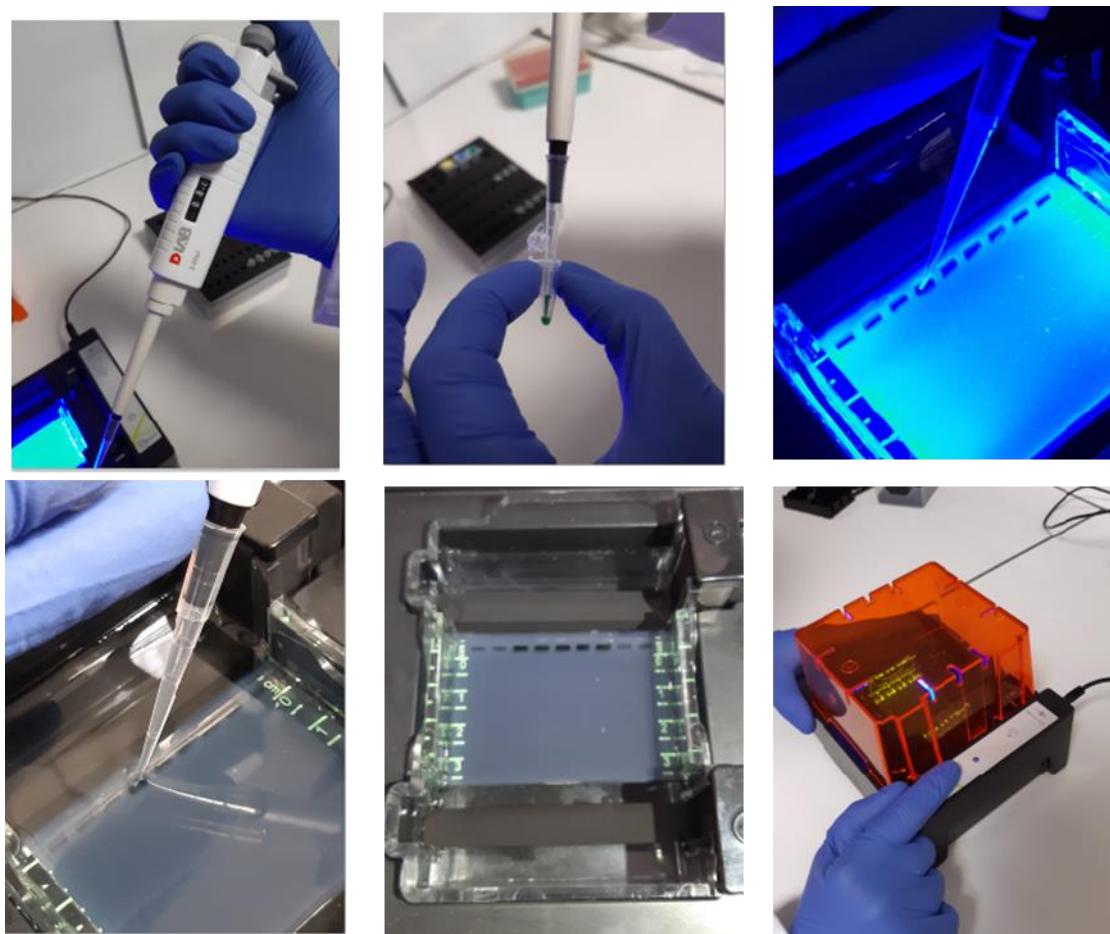
A l'aide d'une micropipette, déposer :

- 8 µL d'ADN Tubes patients ou témoins à déposer
- 8 µL pour l'échelle de poids moléculaire

Durée de migration environ 20 minutes pour les systèmes compacts à minigel.

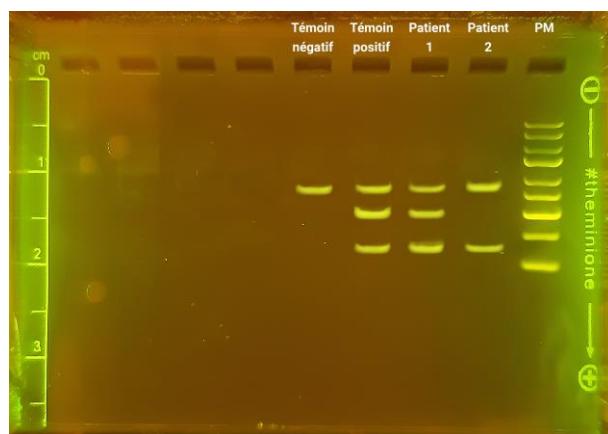


L'éclairage LED permet de mieux visualiser les puits



5 Résultats et exploitations

Pour rappel :
 850 pb ARNs 16S positive,
 533 pb = mecA positive
 279 pb = nuc positive.



- 1- Témoin négatif : ARNr 16S positive, présence de bactéries mais aucune de genre *s.aureus* identifiée.
- 2- Témoin positif : souche de contrôle *Staphylococcus aureus* ATCC 46300, ARNr 16S positive, mecA positive et nuc positive.
- 3- Souche patient 1 Hôpital, *Staphylococcus aureus* de SARM , ARNr 16S positive, mecA positive et nuc positive.
- 4- Souche patient 2 Hôpital *Staphylococcus aureus* type sauvage, ARNr 16S positive et nuc positive

6 Bibliographie

1- Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*. Les points-clés en 2010
 Oana Dumitrescu, Olivier Dauwalder, Sandrine Boisset, Marie-Élisabeth Reverdy, Anne Tristan et François Vandenesch*
 Med Sci (Paris). Volume 26, Number 11, Novembre 2010. Page(s) 943 – 949

2- A Review of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Types in Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) Species
 Huda Saber, Azmiza Syawani Jasni, Tengku Zetty Maztura Tengku Jamaluddin, and Rosni Ibrahim
 Malays J Med Sci. 2017 Oct; 24(5): 7–18.

3- Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene
 O.G. Brakstad, K. Aasbakk, J.A. Maeland
 J Clin Microbiol, 30 (7) (1992), pp. 1654-1660

7 Assistance Technique

Pour toute question, veuillez contacter
 N° Cristal : 09 69 32 02 10

Appel non surtaxé