



Ian DORVAL<sup>1</sup>, Françoise GEFROY<sup>1</sup>

# Microbiologie, PCR en temps réel en routine : applications « maison » ou troussees ?

## RÉSUMÉ

Trois offres industrielles de systèmes d'amplification d'acides nucléiques en temps réel co-existent aujourd'hui sur le marché des charges virales. Il s'agit de systèmes marqués CE/IVD dédiés à la routine mais offrant déjà, ou à court terme, la possibilité d'exploitation de canaux ouverts pour l'adaptation de techniques « maison ».

Après un rapide panorama des technologies disponibles, nous en présentons la faisabilité avec l'exemple concret d'un transfert du diagnostic moléculaire d'une infection systémique à méningocoque du LightCycler® au Cobas TaqMan® 48.

## MOTS-CLÉS

PCR temps réel, NASBA temps réel, microbiologie, méningites

## Microbiology, Real-Time PCR in routine : « in house tests » or kits ?

### SUMMARY

Three industrial offers for real-time nucleic acids amplification systems coexist today on the market of the viral loads. They are CE/IVD marked systems dedicated to the routine, but offering already or at short-term, the possibility of exploitation of "open channels" for the adaptation of "in house applications".

After a rapid panorama of available technologies, we present the molecular diagnosis of a meningococcal systemic infection as the concrete example of a transfer from LightCycler® to Cobas TaqMan®48.

### KEYWORDS

Real-time PCR, real-time NASBA, microbiology, meningitidis.

## I - Introduction

Depuis l'apparition de techniques d'amplification des acides nucléiques par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) au milieu des années 80 (1), plusieurs « sauts » technologiques ont contribué à leur succès dont le dernier en date, est sans conteste la notion de suivi de l'amplification en temps réel (2).

Loin d'être un phénomène de mode, la PCR en temps réel possède sur les techniques en point final des avantages décisifs parmi lesquels nous soulignerons :

- l'absence d'étapes post-PCR qui réduit le temps opérateur et accélère significativement le rendu des résultats tout en limitant, en théorie, les risques de contamination en maintenant les tubes fermés.
- L'apport des sondes fluorescentes, permettant

l'identification fiable des séquences amplifiées.

- L'assurance qualité des étapes d'extraction et d'amplification (repérage des inhibiteurs à l'origine de faux négatifs) grâce à un contrôle interne, ADN ou ARN synthétique, ajouté avant extraction, co-amplifié avec les mêmes amorces et co-révéle par un jeu de sondes spécifiques marquées par des fluorophores différents.

- Un accès simple et reproductible à la PCR quantitative.

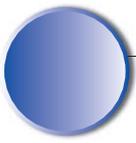
- L'analyse génotypique en post-PCR par réalisation de courbes de fusion.

- La possibilité d'adaptation rapide et reproductible de protocoles robustes issus de laboratoires de référence.

- L'apparition d'une véritable offre dans le domaine de la microbiologie, avec la commercialisation d'un catalogue plus étoffé de troussees dédiées au diagnostic *in vitro*.

Dès la mise à disposition de cette technologie, de

<sup>1</sup>Fédération de biologie - Centre Hospitalier de Cornouaille - 14 Av. Yves Thépot, 29107 Quimper cedex - Tél. : 02 98 52 60 92 - Fax : 02 98 52 63 37  
E-Mail : i.dorval@ch-cornouaille.fr, f.geffroy@ch-cornouaille.fr



nombreuses applications sont apparues dans le domaine de la microbiologie (3) mais un frein majeur à leur diffusion reste l'investissement important nécessaire pour l'acquisition de l'appareillage dédié au temps réel.

Notre propos sera donc d'examiner la possibilité d'utilisation, dans le respect de l'article L.5221-5 du code de la santé publique, des systèmes d'amplification en temps réel ouverts, pouvant faire l'objet d'une mise à disposition dans le cadre de marchés portant sur des paramètres à forte demande comme la détection de *Chlamydia trachomatis* ou la mesure des charges virales VIH et VHC.

## II- Panorama des équipements et technologies disponibles en France

Trois offres industrielles sont aujourd'hui disponibles dans ce cadre.

Deux font appel à la technologie d'amplification par PCR :

- Abbott Molecular Diagnostic ;
- Roche Diagnostics.

Une seule utilise une technologie d'amplification de type NASBA (Nucleic Acid Sequenced Based Amplification) :

- bioMérieux.

La solution de PCR temps réel proposée par Abbott est issue d'une association entre, Abbott et Celera Diagnostics (coentreprise entre le groupe Applied Biosystems et le groupe Celera Genomics d'Appera Corporation), pour développer et commercialiser une gamme de diagnostics moléculaires *in vitro*. Les paramètres déjà disponibles (kits RealTime CE/IVD) sont la détection qualitative et quantitative du VIH et du VHC ainsi que de *Chlamydia trachomatis* couplée ou non avec *Neisseria gonorrhoeae*.

Certaines applications développées par la société Artus compléteront la gamme sous la dénomination RealArt® après évolution du logiciel (VHB, Génotypage VHC, Coronavirus, HSV1+2, EBV, VZV, Parvovirus B19, *Mycobacterium tuberculosis*).

La plate-forme M2000RT® proposée dans ce cadre est construite par ABBOTT sur une base dérivée d'un ABI PRISM® 7500.

Il s'agit d'un thermocycleur muni d'un bloc à effet Peltier de 96 puits, équipé d'une source tungstène-halogène et d'une caméra CCD susceptible de suivre la fluorescence pour 7 fluorophores différents (SYBR green®, FAM, NED, JOE, VIC, ROX et Cy5).

Les principes de détection en temps réel utilisent soit les agents intercalants (SYBR green) soit les sondes à double marquage de type 5' nucléotidases (Taqman®) n'autorisant pas d'analyses en post-amplification.

Il n'existe pas de kits de réactifs génériques dédiés mais ceux fournis par Applied, Qiagen, ou d'autres

industriels de la biotechnologie peuvent tout à fait être utilisés.

Le logiciel du M2000RT® ne permet pas pour l'instant le paramétrage de « canaux ouverts » mais cette évolution est d'ores et déjà prévue pour les prochaines versions du logiciel.

Roche Diagnostics propose le Cobas TaqMan® 48, présenté comme un analyseur de routine en PCR temps réel (VIH, VHC, VHB).

Cette plate-forme est en fait constituée de deux thermocycleurs totalement indépendants de 24 positions chacun.

Chaque tube est sous la dépendance d'une fibre optique pour l'excitation et l'émission à partir d'une source halogène et d'un jeu de filtres compatibles avec 5 fluorophores différents (SYBR green®, FAM, HEX, LC Red 640 et LC Red 705)

Les principes de détection en temps réel utilisent soit un agent intercalant (SYBR green®) soit des sondes à hydrolyse (TaqMan®) doublement marquées. Le logiciel permet en outre le suivi de l'amplification grâce à un couple de sondes utilisant le principe de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert). Cette technologie a l'avantage d'autoriser une analyse des polymorphismes en post-PCR après réalisation de courbes de fusion (génotypage).

Le logiciel, AmpliLink® permet la gestion en routine des échantillons et des paramètres de l'amplification. Un logiciel de traitement des données UCDA (Utility Chanel Data Analysis) permet de traiter les signaux des canaux ouverts du Cobas TaqMan®48 sur le logiciel Light Cycler® Analysis V3.5.

La société Roche commercialise des réactifs génériques spécialement conçus pour le Cobas TaqMan®48 (Taqman® DNA Amplification kit) comprenant les tampons, les nucléotides et les enzymes (polymérase et uracyl-N glycosylase) nécessaires à la réalisation de 96 réactions de PCR.

D'autres kits génériques sont également utilisables à condition de respecter un volume réactionnel de 100µl indispensable à un bon trajet optique lors de l'acquisition de la fluorescence.

Si les deux précédentes solutions font appel à la technologie très répandue de PCR avec une ADN polymérase thermostable, l'offre bioMérieux temps réel exploite un autre type d'amplification, isotherme cette fois, la NASBA (Nucleic Acid Sequenced Based Amplification) (4) (5).

Brièvement, grâce à la conjonction de trois activités enzymatiques (transcriptase inverse AMV, Rnase-H et polymérase-ARN T7), associées à des amorces oligonucléotidiques, il se produit une amplification des ARN cibles plus d'un milliard de fois en 90 minutes. La réaction se produit à 41°C et donne des molécules d'ARN simple brin comme produit final.

La réaction est suivie en temps réel grâce à une sonde ADN de type « Molecular beacons » qui devient fluorescente lors de son hybridation avec les

## Microbiologie, PCR en temps réel en routine : applications «maison» ou trousse ?

ARN simples brins amplifiés (6). Elle possède une structure de type tige-boucle et contient un « fluorophore reporteur » et un groupe « quencheur ». La fixation de la séquence de la boucle avec sa séquence complémentaire d'acide nucléique cible néo-synthétisée au cours de la réaction NASBA, provoque une ouverture de la tige, l'éloignement des deux fluorophores et l'émission d'un signal fluorescent lors de l'excitation à la longueur d'onde spécifique du « fluorophore reporteur ».

La plate-forme NucliSens EasyQ® permet l'incubation de 48 tubes ainsi que l'acquisition de la fluorescence. Le logiciel Nuclisens V2 assure la gestion des échantillons et le traitement du signal. Actuellement deux fluorophores seulement sont lus FAM et ROX, un troisième le Cy5 étant annoncé.

Sur le plan des réactifs, la société bioMérieux commercialise un kit générique, le BasicKit®, contenant le mélange enzymatique et l'ensemble des constituants nécessaires à la réaction de type NASBA.

Sondes et amorces sont fournies par l'utilisateur en fonction de l'application souhaitée. Un site internet (<http://www.basic-kit-support.com>) propose différentes modélisations issues de laboratoires de référence.

Parallèlement, il existe une gamme de kits TSR® (Target Specific Reagents) validés et marqués CE par Biomérieux et qui couplés au BasicKit®, permettent à ce jour l'amplification spécifique des Entérovirus, des VRS et du Metapneumovirus humain. Des kits TSR® non marqués sont également disponibles pour le SRAS et le virus de la grippe aviaire H5N1. D'autres détections d'agents pathogènes sont annoncées, comme HSV 1+2 et un panel respiratoire (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* et *Legionella*).

### III - Matériel et méthodes : exemple d'une application « maison »

Nous l'avons vu, toutes les solutions temps réel du marché proposent, aujourd'hui ou à court terme, la possibilité de protocoles ouverts donnant libre choix à l'utilisateur de développer ses propres applications diagnostiques.

Même si l'offre industrielle marquée CE s'étoffe de jour en jour, dans le domaine de la microbiologie, il est évident que certains micro-organismes ou des agents pathogènes émergents ne feront pas l'objet de tels développements.

De telles applications sont d'ailleurs formellement autorisées et encadrées depuis la transcription en droit français de la directive 98/79/CE : « les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* fabriqués par un établissement dispensant des soins, pour son propre usage et utilisés exclusivement au sein de ce même établissement, sur leur lieu de fabrication ou dans des locaux situés à proximité immédiate, peuvent être dispensés des procédures de certification de conformité prévues à l'article L.

5221-2 dans des conditions prévues dans le décret mentionné au 2° de l'article L. 5221-8. » (article L 5221-5 du code de la santé publique).

Dès lors il est tentant de chercher à exploiter en canal ouvert les différents appareils d'amplifications temps réel proposés dans le cadre du diagnostic *in vitro*.

A titre d'exemple nous présentons ici le transfert d'un protocole rodé sur une plate-forme plutôt orientée recherche, le LightCycler® version 1 de la société Roche sur un système CE/IVD de la même société, le Cobas TaqMan®48.

Nous avons choisi une application typiquement hospitalière, le diagnostic en urgence d'une infection systémique à méningocoque.

Les infections invasives à méningocoques sont des infections caractérisées par un début souvent brutal, qui surviennent chez des personnes en bonne santé et dont une forme clinique, le purpura fulminans, constitue une véritable urgence thérapeutique.

Malgré l'amélioration des moyens thérapeutiques, la létalité et le taux de séquelles graves restent élevés.

Depuis le 15 juillet 2002, (7) les critères diagnostiques se sont élargis et comprennent en plus des arguments cliniques et bactériologiques classiquement retenus, la notion de LCR évocateur de méningite bactérienne purulente et de PCR positive à partir du LCR ou du sérum.

Tout laboratoire de bactériologie traitant en urgence ce type de prélèvements devrait donc tirer bénéfice de la mise en place du diagnostic moléculaire de ces infections.

La PCR temps réel de part la rapidité, la sensibilité et la spécificité de ses résultats prend ici toute sa place.

Notre laboratoire utilise depuis 2002 une technique de PCR temps réel avec sonde à hydrolyse de type TaqMan® adaptée sur LightCycler® à partir de la publication de Corless *et al.* (8) utilisant un couple d'amorces et une sonde ayant pour cible le gène *ctrA* et spécifiques de tous les méningocoques groupables et non groupables.

Nos résultats ont montré dans une série prospective sur 18 mois et 7 infections invasives à méningocoques une sensibilité accrue de la PCR par rapport à la culture sur LCR (6 PCR positives versus 3 cultures positives) et sur plasma (6 PCR positives et aucune hémoculture positive).

Devant l'intérêt manifeste de cette approche, nous avons cherché à transférer la technique sur notre analyseur de routine.

Afin de tester les performances relatives des deux systèmes par une estimation des rendements d'amplification, nous avons réalisé une gamme de dilution de raison 10 à partir des acides nucléiques totaux extraits de 200µl d'un LCR positif pour *Neisseria meningitidis* de sérotype B. Nous avons utilisé le MagNA Pure Compact® Nucleic Acid Isolation Kit 1 sur automate MagNA Pure Compact® en protocole plasma avec 100µl de tampon d'élution.



Le détail du mélange réactionnel sur LightCycler® est précisé sur le Tableau I, les réactifs sont ceux recommandés par Roche (LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes) et les oligonucléotides sont synthétisés par MWG Biotech (Roissy CDG). La prise d'essai est de 5µl.

Les paramètres de l'amplification sont :

- Dénaturation initiale : 5 min 95°C
- Nombre de cycles : 45
- Vitesse de transition en température : 20°/s
- Dénaturation 95°C, 5 s
- Hybridation / Elongation : 60° C, 30 s avec prise de la fluorescence.

Ce protocole « transcrit » pour le Cobas Taqman®48 est détaillé sur le Tableau II.

Les paramètres de l'amplification définis dans AmpliLink® sont indiqués dans le Tableau III.

## IV - Résultats

Les sensibilités de détection qualitative (dernière dilution à donner un signal positif) se sont révélées identiques et le calcul du rendement d'amplification à partir de la pente donne une légère supériorité au Cobas TaqMan®48 (Pente : - 3,508 ; Coefficient d'amplification  $E = 101/3,508 - 1 = 0,93$ ) par rapport au LightCycler® (Pente : - 3,619 ; Coefficient d'amplification  $E = 101/3,619 - 1 = 0,89$ ).

## V - Discussion

La technologie d'amplification par PCR est aujourd'hui la plus commune et son aspect technique est sans doute mieux maîtrisé par rapport à la technique NASBA. Nous n'avons pas dans notre laboratoire l'expérience de l'étude et de la mise au point de test NASBA en temps réel, mais il nous semble évident que la conception des amorces et des sondes compatibles avec la bonne marche de l'amplification fasse appel à une autre culture que celle acquise par des années de pratique de la PCR. Dès lors nous pensons préférable pour cette technologie de privilégier un transfert de protocoles déjà validés sur BasicKit®.

Nous rapportons ici une expérience de transfert de PCR sur une machine marquée CE/IVD avec possibilité d'exploitation de canaux ouverts d'un protocole mis au point sur un thermocycleur non dédié au diagnostic.

Aucune adaptation n'a été nécessaire, mis à part l'ajustement des volumes réactionnels aux impératifs du consommable Cobas TaqMan®48 (K tubes) et du volume réactionnel recommandé de 100µl. Les quantités de sondes, d'amorces ainsi que la prise d'essai sont identiques dans les deux systèmes.

Seule la durée totale de l'amplification diffère puisque le Cobas TaqMan®48 utilisant un bloc à effet Peltier et des tubes de 100µl, n'autorise pas une

	qsp 1 tube en µl
H <sub>2</sub> O	2
MgCl <sub>2</sub> (qsp 3mM)	0,8
Amorce NM 5' (100pm/µl)	0,1
Amorce NM 3' (100pm/µl)	0,1
Sonde TaqMan NM 5pmol/µl	1
Mix d'hybridation FastStart DNA Master Hybridization Probes	1
<b>TOTAL</b>	<b>5</b>

**Tableau I**

Mélange réactionnel utilisé sur le LightCycler®.

	qsp 1 tube en µl
H <sub>2</sub> O	61,8
MgCl <sub>2</sub> (qsp 3 mM)	12
Amorce NM 5' (100pm/µl)	0,1
Amorce NM 3' (100pm/µl)	0,1
Sonde TaqMan NM 5 pmol/µl	1
Mix d'hybridation TaqMan DNA Amplification Kit	20
<b>TOTAL</b>	<b>95</b>

**Tableau II**

Protocole "transcrit" pour le Cobas Taqman®48

vitesse de transition en température équivalente à celle d'un bain d'air et aux petits volumes réactionnels du LightCycler®. Le délai d'obtention des résultats y compris l'étape d'extraction des acides nucléiques est d'environ 3 heures.

Le coût en consommables pour un diagnostic moléculaire d'une infection à méningocoques a été estimé dans notre laboratoire à une vingtaine d'euros. Ce prix inclut deux extractions d'ADN (LCR et plasma) et une série de PCR comprenant témoins positifs et négatifs ainsi que l'amplification en double des échantillons avec contrôle d'absence d'inhibiteurs par amplification concomitante du gène de l'albumine humaine.

Ce type de transfert s'adressant à des laboratoires ayant déjà mis en place une organisation compatible avec l'assurance qualité d'une paillasse de biologie moléculaire, avec du personnel formé et sensibilisé à ce type de technique, le seul problème reste la mise à disposition en garde de cette technologie.

## Microbiologie, PCR en temps réel en routine : applications «maison» ou trousse ?

Étapes	Type	Paramètres			
		Ramp Slope (°C/10)	Cycle Temperature	Cycle Time	Cycle Delay
Step 1	CoverHeating	3	100		
Step 2	Denaturation	1	95	240	0
Step 3	SequenceStart				
Step 4	Denaturation	1	95	10	0
Step 5	Extension	1	60	30	15
Step 6	SequenceEnd				
Step 7	PostCycle	1	40	120	0

**Tableau III**

Paramètres d'amplification mis en oeuvre sur l'AmpliLink®

## VI - Conclusion

Les méthodes d'amplification en temps réel de part leurs nombreux avantages sont en pleine expansion. Les industriels du diagnostic *in vitro* ont très vite compris l'intérêt de ces technologies notamment du fait de leur polyvalence et du peu de maintenance liée à l'appareillage.

Il faut donc s'attendre à un remplacement rapide des systèmes conventionnels par une technolo-

gie en temps réel dans les laboratoires réalisant en routine la mesure des charges virales.

A nous biologistes, de savoir saisir cette opportunité pour dans un premier temps, « appriivoiser » ces technologies nouvelles, puis se les approprier et enfin les maîtriser pour en accroître la diffusion dans tous les domaines du laboratoire. Rapidité, spécificité et sensibilité leur confèrent des atouts incontournables face aux techniques conventionnelles.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) MULLIS K.B. *et al.*, Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 1987, 155, 335-350.
- (2) HIGUCHI R., *et al.*, Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. 1993, 11(9), 1026-1030.
- (3) CHOMARAT M. *et al.*, PCR en temps réel en bactériologie. *Spectra Biologie 2004*, 23, 137, 56-61.
- (4) COMPTON J. *et al.*, Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 1991, 350 (6313), 91-92.
- (5) Kievits T. *et al.*, NASBA isothermal enzymatic *in vitro* nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J. Virol. Methods*, 1991, 35(3), 273-286.
- (6) LEONE G., *et al.*, Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA. *Nucleic Acids Res.*, 1998, 26, 2150-2155.
- (7) Circulaire n°DGS/SD5C/2002/400 du 15 juillet 2002.
- (8) CORLESS C.E., *et al.*, Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39, 1553-1558.