

Intérêt des techniques de biologie moléculaire pour le diagnostic des infections ostéo-articulaires

Beate Heym

Groupe hospitalier Diaconesses Croix Saint Simon
Laboratoire des centres de santé et d'hôpitaux d'Ile-de-France

Pourquoi les techniques de biologie moléculaire seraient-elles utiles ?

Dans 5 – 15% des infections ostéo-articulaires aucun micro-organisme ne peut être mis en évidence (Trampuz *et al.* 2004)

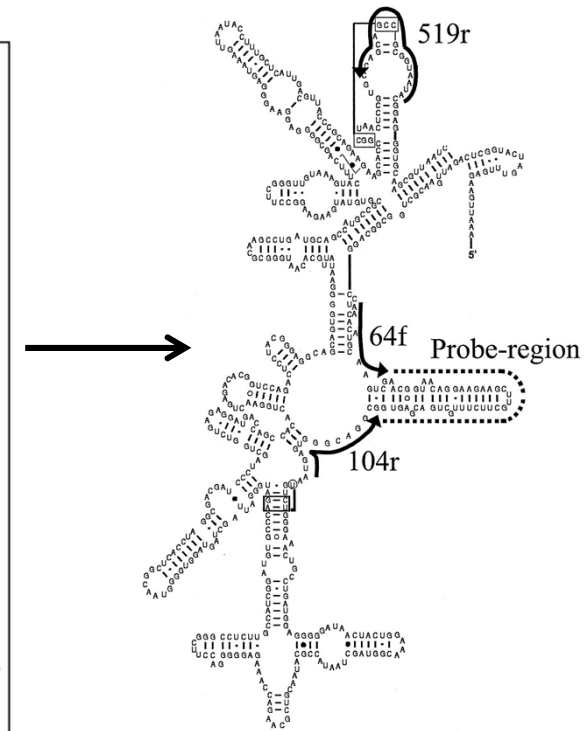
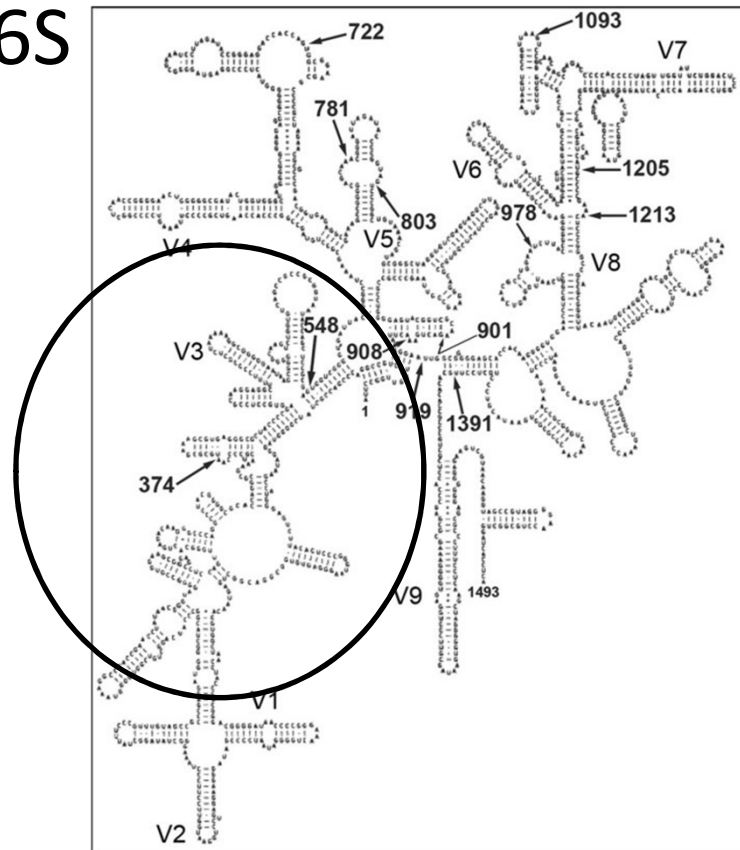
→ micro-organismes fastidieux (*Tropheryma whipplei*, *Granulicatella adjacens*, etc.)

→ Traitement antibiotique préalable

Quatre Stratégies

- 1) Amplification d'un gène avec des amorces universelles et séquence de l'amplificat; ARNr 16S
- 2) Amplification de plusieurs gènes d'un seul pathogène (ex.: *Staphylococcus aureus* et résistance à la méticilline)
- 3) Approche multiplex: divers microorganismes et quelques gènes de résistance
- 4) Analyse métagénomique

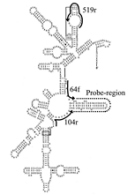
1) L'ARNr 16S



Stefan Bertilsson *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 2002; 6077-6086.2002

Z. J. Jay, W. P. Inskeep, July 2015, Biology Direct 10(35)

L'ARNr 16S



Recherche PUBMED « 16S rRNA bone joint infection »: 25 références

Advances in the diagnosis of infection in prosthetic joint implants

Brian D. Mariani and Rocky S. Tuan

Molecular Medicine Today, 1998

Box 3. Problems with synovial fluid as a sample

- Viscosity
- High macromolecular content
- Inability to fractionate
- Centrifugation leads to insoluble pellet
- Enzymatic inhibition

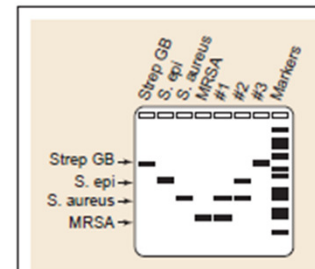


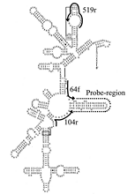
Figure 4. Analysis of multiplex PCR for bacterial

L'ARNr 16S

1998 – 2018 : Sensibilité 28 – 92%,
Spécificité 61 - 100%

Problèmes

- prélèvement (liquide articulaire)
- technique « maison »
- séquençage des prélèvements positifs à la PCR indispensable
- contaminations
- absence de contrôles de qualité



2) Amplification spécifique des gènes d'un seul pathogène (ex.: *Staphylococcus aureus* et résistance à la métilcilline)

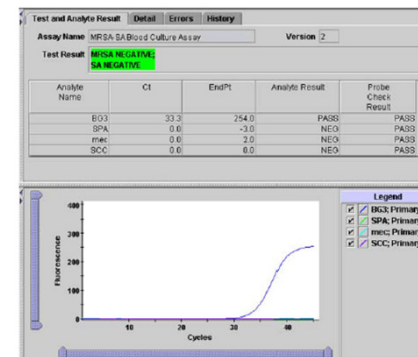


Figure 3. Exemple de résultat négatif

Amplification spécifique des gènes d'un seul pathogène



Gène *spa* (protéine A): présence de *S. aureus*

Gène *mecA* (PLP2a): résistance à la méticilline

SCCmec: cassette chromosomique porteuse du gène *mecA*

2011 – 2014 : Sensibilité 94 - 100%,
Spécificité 91 - 100%

3) PCR multiplex

Unyvero i60 ITI[®] (Curetis, Holzgerlingen, Allemagne)

Prove-it[®] bone&joint (Mobidiag, Espoà, Finlande)

SeptiFast[®] Test M^{grade} (Roche, Basel, Suisse)

FilmArray[®] en développement (BioMérieux, Craponne, France)

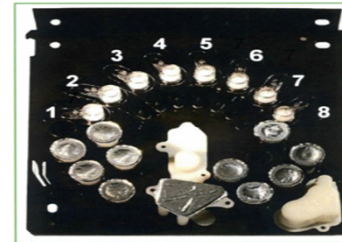
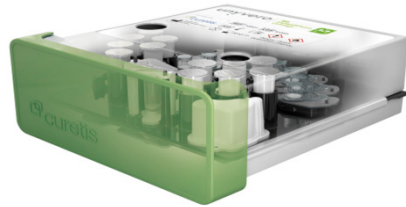


Unyvero i60 ITI[®] (Implant and tissue infection)



GROUP	PATHOGEN	GENE	RESISTANCE AGAINST
Gram-positive bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>mecA</i>	Oxacillin/ Methicillin
	<i>Coagulase negative staphylococci</i>	<i>mecC (LGA251)</i>	Oxacillin/ Methicillin
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>aac(6)aph(2')</i>	Aminoglycoside
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>ermA</i>	Macrolide
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>ermC</i>	Macrolide
	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>van A</i>	Vancomycin
Nutritionally variant Streptococci	<i>Granulicatella adiacens</i>	<i>vanB</i>	Vancomycin
	<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>rpoB</i>	Rifampin (<i>S. aureus</i>)
Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium spp.</i>	<i>gyrA</i>	Quinolones
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i>	<i>aacA4</i>	Aminoglycoside
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	<i>ctx-M</i>	3rd generation Cephalosporins
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>vim</i>	Carbapenem
	<i>Proteus spp.</i>	<i>imp</i>	Carbapenem
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>kpc</i>	Carbapenem
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>ndm</i>	Carbapenem
Non-fermenting bacteria	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	<i>oxa-23</i>	Carbapenem
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>oxa-24</i>	Carbapenem
Anaerobic bacteria	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>oxa-48</i>	Carbapenem
	<i>Propionibacterium avidum/granulosum</i>	<i>oxa-58</i>	Carbapenem
	<i>Fingoldia magna</i>		
	<i>Bacteroides fragilis</i> group		
Fungi	<i>Candida parapsilosis</i>		
	<i>Candida albicans</i>		

1 cassette → 8 chambres de PCR



Chambre 1	Chambre 2	Chambre 3	Chambre 4
<i>Proteus</i> spp.	<i>gyrA</i> (<i>E. coli</i>)	<i>ermA</i>	<i>ermC</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	Complexe <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>vanA</i>	<i>oxa-48</i>
<i>oxa-58</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>ctx-M</i>	Streptocoques à coagulase négative
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>imp</i>	<i>oxa-23</i>	<i>Granulicatella adiacens</i>
<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Fingoldia magna</i>	<i>Bacteroides fragilis</i> group	<i>Escherichia coli</i>
Complexe <i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Streptococcus pyogenes</i>
			<i>aacA4</i>
Chambre 5	Chambre 6	Chambre 7	Chambre 8
<i>gyrA</i> (<i>E. coli</i>)	<i>kpc</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>mecC</i>
<i>mecA</i>	<i>Propionibacterium avidum/granulosum</i>	<i>rpoB</i>	<i>oxa-24</i>
<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>vanB</i>	<i>aac(6')/aph(2'')</i>
<i>Corynebacterium</i> spp.		<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Candida albicans</i>		<i>ndm</i>	
<i>vim</i>		<i>Candida parapsilosis</i>	

Test Unyvero[®] ITI, Curetis,
for diagnosis of bone and joint infection
Protocole



Liquide articulaire (LA)

- culture négative à 48 heures (incubation 14 jours)
- nombre de leucocytes $> 2000/\text{mm}^3$
- taux de neutrophiles polymorphonucléaires (PNN) $> 60\%$
- Volume nécessaire: $180 \mu\text{l}$

Résultats



Total

33 patients

LA localisation	genou N=24	hanche N=9	NS
Prothèse totale	PTG N= 9	PTH N= 9	
Articulation native	N=15	N= 0	
Sexe	femmes N=15	hommes N=18	
Age moyen	72 ans	67 ans	NS

Microorganismes

Universal Bacteria

Gram-positif

<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus aureus	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	844
<input type="checkbox"/>	Coagulase negative staphylococci	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Streptococcus spp.	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Streptococcus pneumoniae	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Streptococcus agalactiae	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Streptococcus pyogenes/dysgalactiae	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Granulicatella adiacens	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Abiotrophia defectiva	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Enterococcus spp.	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Enterococcus faecalis	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0

Non-fermenting bacteria

<input type="checkbox"/>	Pseudomonas aeruginosa	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Acinetobacter baumannii complex	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0

Anaérobies

<input type="checkbox"/>	Propionibacterium acnes	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Finegoldia magna	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Bacteroides fragilis group	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0

Enterobacteriaceae

<input type="checkbox"/>	Escherichia coli	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Enterobacter cloacae complex	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Enterobacter aerogenes	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Proteus spp.	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Klebsiella pneumoniae	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Klebsiella oxytoca	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Klebsiella variicola	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	Citrobacter freundii/k	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	0

Corynebacteriaceae

<input type="checkbox"/>	Corynebacterium sp.		
--------------------------	---------------------	--	--

Fungi

<input type="checkbox"/>	Candida spp.		
<input type="checkbox"/>	Candida albicans		
<input type="checkbox"/>	Candida tropicalis		
<input type="checkbox"/>	Candida glabrata		
<input type="checkbox"/>	I. orientalis (Candida)		

Marqueurs de résistance

Gène de résistance	L'utilisation des classes de subst. actives suiv. peut entraîner l'échec thérapeutique	Prévalence élevée dans
<input checked="" type="checkbox"/> mecA	Oxacilline	Staphylococcus spp.
<input type="checkbox"/> mecC	Oxacilline	Staphylococcus spp.
<input type="checkbox"/> aac(6')yaph(2")	Aminoglycosides	Staphylococcus spp., Streptococcus spp.
<input checked="" type="checkbox"/> ermA	Macrolides/Lincosamides	Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Enterococcus spp.
<input type="checkbox"/> ermC	Macrolides/Lincosamides	Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Enterococcus spp.
<input type="checkbox"/> vanA	Glycopeptides	Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Enterococcus spp.
<input type="checkbox"/> vanB	Glycopeptides	Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Enterococcus spp.
<input type="checkbox"/> kpc	Carbapénèmes	Enterobacteriaceae, Non-fermenting bacteria
<input type="checkbox"/> oxa-23	Carbapénèmes	Enterobacteriaceae, Non-fermenting bacteria
<input type="checkbox"/> oxa-24/40	Carbapénèmes	Enterobacteriaceae, Non-fermenting bacteria
<input type="checkbox"/> oxa-48	Carbapénèmes	Enterobacteriaceae, Non-fermenting bacteria
<input type="checkbox"/> oxa-58	Carbapénèmes	Enterobacteriaceae, Non-fermenting bacteria
<input type="checkbox"/> vim	Carbapénèmes	Enterobacteriaceae, Non-fermenting bacteria
<input type="checkbox"/> imp	Carbapénèmes	Enterobacteriaceae, Non-fermenting bacteria
<input type="checkbox"/> ndm	Carbapénèmes	Enterobacteriaceae, Non-fermenting bacteria
<input type="checkbox"/> ctx-M	Céphalosporines de 3e génération	Enterobacteriaceae, Non-fermenting bacteria
<input type="checkbox"/> aacA4	Aminoglycosides	Enterobacteriaceae, Non-fermenting bacteria

Patients avec une PTH ou PTG (N=18)

	<u>N moyen leuco</u>	<u>% moyen PNN</u>
Culture négative/PCR négative N=10	11.449/mm ³	80%
Culture positive/PCR positive N = 7	51.697/mm ³	81%
Culture positive /PCR négative N=1*	90.900/mm ³	88%

*PTH, culture positive à *Streptococcus agalactiae*

Patients avec articulation native (N=15)

Culture négative/PCR négative N=12	N moyen leuco 21.866/mm ³	% moyen PNN 85%
Culture positive/PCR positive N = 1	104.400/mm ³	94%
Culture négative/ PCR positive N=2*	96.450/mm ³	91%

*culture négative, PCR positive à *Corynebacterium sp*
culture négative, PCR positive à *Propionibacterium acnes*

Résultats discordants

Culture positive/PCR négative: 1 patient

PTH, culture positive with *S. agalactiae*

→ Echec de la PCR car le LA et trois lavages étaient positifs à la culture

Culture négative/**PCR positive**:

1 patient avec la PCR positive à *Corynebacterium sp*

→ Considéré comme contamination de la PCR test, probable chondrocalcinose

1 patient avec la PCR positive à *Cutibacterium acnes*

→ Interprétation impossible, un seul prélèvement, patient perdu de vue

Conclusion

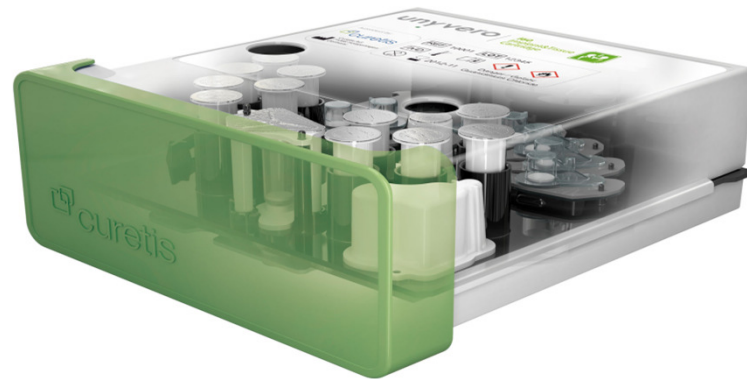
Résultats concordants : 30/33 (91%)

Avantages:

- Possibilité de détecter les microorganismes les plus impliqués dans les infections ostéo-articulaires en 4h30
- Possibilité de détecter des microorganismes malgré un traitement antibiotique

Désavantages:

- Panel fixe de microorganismes et de gènes de résistance
- Prix très élevé (250 €/test)



Sensibilité 60% - 78,8%
Spécificité 89% - 100%

Concordance avec la culture:
58% - 88%

Panel: trop de gènes de
résistance (carbapénèmases)

Prove-it[©] Bone&Joint



Gram+	Gram-
<p>Identified targets</p> <p><i>mecA</i> meticillin resistance marker <i>vanA</i> vancomycin resistance marker <i>vanB</i> vancomycin resistance marker</p> <p><i>Clostridium perfringens</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus gallinarum</i></p>	<p>Identified targets</p> <p><i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Fusobacterium necrophorum</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Kingella kingae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i></p>
<p><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subspecies <i>equisimilis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i></p> <p>Coagulase negative staphylococcus</p>	<p><i>Neisseria meningitidis</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i></p> <p><i>Bacteroides fragilis</i> group <i>Campylobacter jejuni/coli</i> Enterobacteriaceae <i>Neisseria sp. non-meningitidis</i></p>

Sensibilité 62 - 82%

Spécificité 74%

Concordance avec la culture 62%

Panel:

Absence de *Cutibacterium acnes* !

SeptiFast[®] (développé pour hémocultures positives)



Gram-negative bacteria	Gram-positive bacteria	Fungal pathogens
Escherichia coli	Staphylococcus aureus	Candida albicans
Klebsiella pneumoniae	Coagulase-negative Staphylococci†	Candida tropicalis
Klebsiella oxytoca	Streptococcus pneumoniae	Candida parapsilosis
Serratia marcescens	Streptococcus spp.‡	Candida krusei
Enterobacter cloacae	Enterococcus faecium	Candida glabrata
Enterobacter aerogenes	Enterococcus faecalis	Aspergillus fumigatus
Proteus mirabilis		
Pseudomonas aeruginosa		
Acinetobacter baumannii		
Stenotrophomonas maltophilia		

†Including S. epidermidis, S. haemolyticus, S. xylosum, S. hominis, S. cohnii, S. lugdunensis, S. saprophyticus, S. saprophyticus, S. capitis, S. pasteurii, S. warneri.

‡Including S. pyogenes, S. agalactiae, S. mitis, S. mutans, S. oralis, S. anginosus, S. bovis, S. constellatus, S. cristatus, S. vestibularis., S. gordonii, S. intermedius, S. milleri, S. salivarius, S. sanguinis, S. thermophilus, S. parasanguinis.

doi:10.1371/journal.pone.0062323.t001

Sensibilité 86%, Spécificité 100%
 Concordance avec la culture 57%

Panel:
 absence de *Corynebacterium*
sp., *Cutibacterium sp.*,
 absence de gènes de
 résistance



Achermann Y. 2010; Sancho-Tello S. 2011



4) Analyse métagénomique du prélèvement

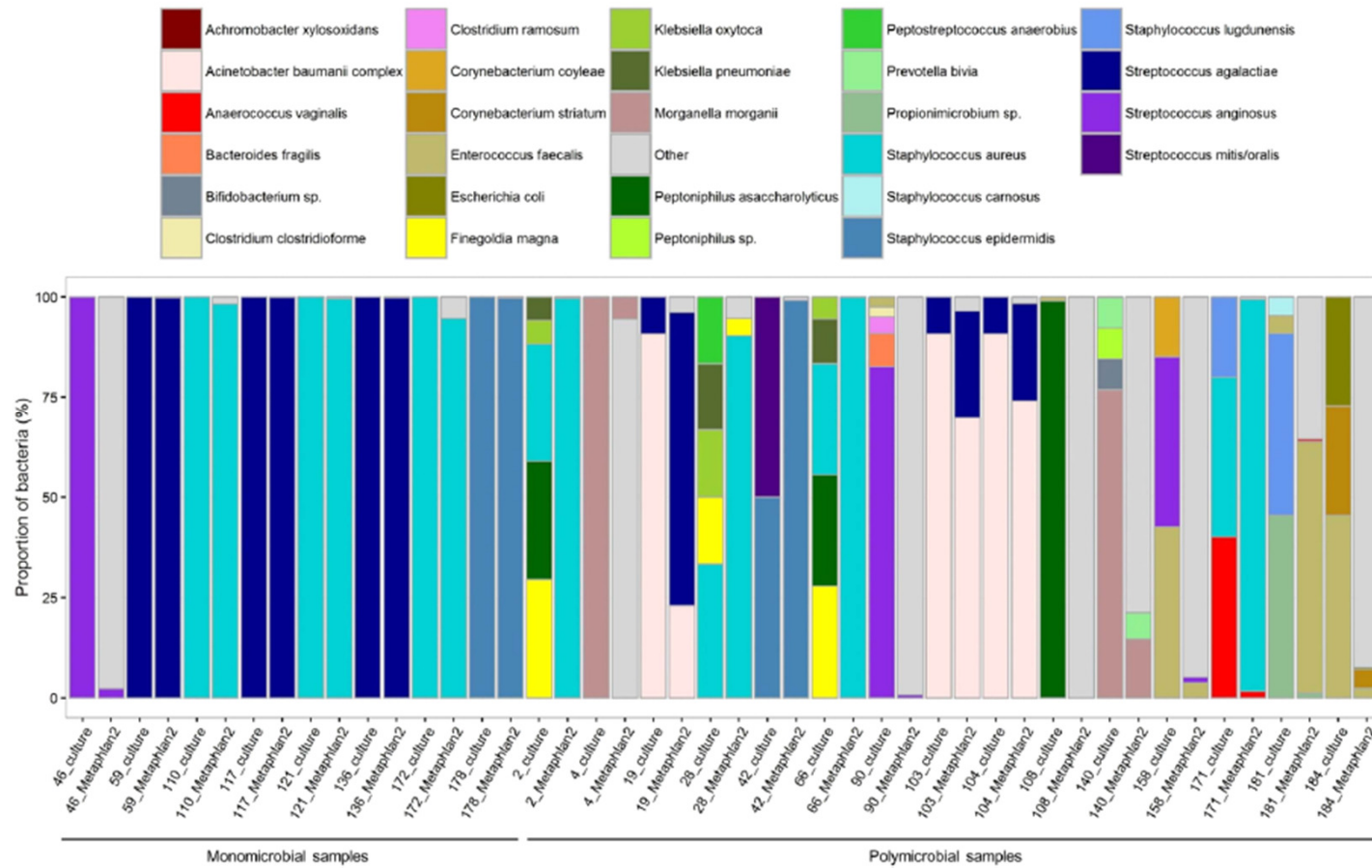
Extraction de l'ADN total du prélèvement

Soustraction de l'ADN humain

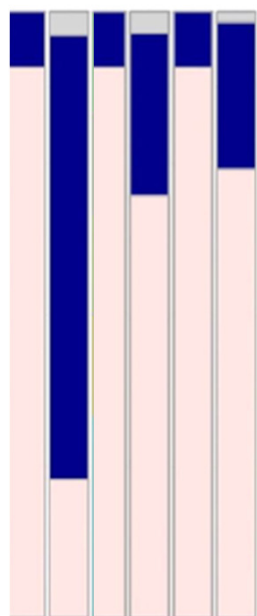
Séquençage de l'ADN restant

Problème de contamination d'ADN humain

Problème de contamination bactérienne: exclusion de 30% de prélèvements



Patient	Samples	Age	Gender	ASA score	Body mass index	Post-operative infection (type of surgery)	Delay between surgery and infection	Body site	Material involved
C	19, 103, 104	54	M	2	24.1	Yes (material)	<1 month	Toe	Osteosynthesis



19 103 104

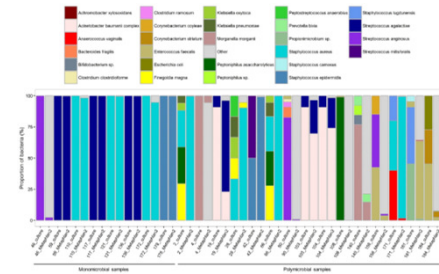
Patient	Sample number	Monomicrobial or polymicrobial	Culture (proportion in %)	Species identified in metagenomic sequencing ($\geq 0.1\%$ abundance)
C	19	Polymicrobial	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (90.8), <i>Streptococcus agalactiae</i> (9.2)	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (22.1), <i>Streptococcus agalactiae</i> (73.1), <i>Fingoldia magna</i> (1.7), <i>Acinetobacter/pittii/calcoaceticus nosocomialis</i> (0.9), <i>Corynebacterium resistens</i> (0.9), <i>Helcococcus kunzii</i> (0.7), <i>Advenella kashmirensis</i> (0.3), <i>Propionibacterium acnes</i> (0.2), <i>Achromobacter unclassified</i> (0.1), <i>Achromobacter piechaudii</i> (0.1)
C	103	Polymicrobial	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (90.8), <i>Streptococcus agalactiae</i> (9.2)	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (66.9), <i>Streptococcus agalactiae</i> (26.9), <i>Acinetobacter/pittii/calcoaceticus nosocomialis</i> (2.7), <i>Fingoldia magna</i> (1.5), <i>Corynebacterium resistens</i> (0.4), <i>Staphylococcus simulans</i> (0.4), <i>Propionibacterium acnes</i> (0.3), <i>Staphylococcus lugdunensis</i> (0.2), <i>Achromobacter unclassified</i> (0.1), <i>Helcococcus kunzii</i> (0.1), <i>Bordetella unclassified</i> (0.1), <i>Advenella kashmirensis</i> (0.1)
C	104	Polymicrobial	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (90.8), <i>Streptococcus agalactiae</i> (9.2), <i>Achromobacter xylosoxidans</i> (0.0)	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex (70.1), <i>Streptococcus agalactiae</i> (24.2), <i>Acinetobacter/pittii/calcoaceticus nosocomialis</i> (3.9), <i>Corynebacterium resistens</i> (1.1), <i>Propionibacterium acnes</i> (0.2), <i>Achromobacter unclassified</i> (0.1), <i>Bordetella unclassified</i> (0.1), <i>Enhydrobacter aerosaccus</i> (0.1)

La méthode est prometteuse mais

- l'extraction de l'ADN est compliquée
- elle est très couteuse
- le data management est extrêmement fastidieux

Il manque de l'expertise

- définition de standards de qualité
- critères d'interprétation
- définition des seuils de contaminants



Intérêt des techniques de biologie moléculaire pour le diagnostic des infections ostéo-articulaires

On n'est pas tout à fait prêt

- techniques « maison »
- contaminations
- méthodes pas encore suffisamment définies
- absence d'espèces importantes de panels
- absence de gènes de résistance des panels
- trop de gènes de résistance dans les panels
- absence de contrôles de qualité

ENSEMBLE, LA COMPLEXITÉ DEVIENT PLUS SIMPLE

CHIRURGIENS

Luc Lhotellier
Wilfrid Graff
Simon Marmor
Dorick Passeron
Antoine Mouton
Vincent Le Strat
Thomas Aubert
Blandine Marion
Florence Aim



INFECTIOLOGUES

Valérie Zeller
Vanina Meyssonier

MICROBIOLOGISTE

Béate Heym

ANESTHESISTE

Sabeha Kacimi

CENTRES DE RÉFÉRENCE DES INFECTIONS
OSTÉO-ARTICULAIRES COMPLEXES

CRIOAC

ILE DE FRANCE

RECHERCHE CLINIQUE

Younes Kerroumi

RADIOLOGIE

Pascal Jacquenod
Christiane Strauss

LES ANCIENS

Patrick Mamoudy
Nicole Desplaces
Philippe Leonard
Philippe Leclerc
Françoise Ducroquet

RHUMATO - INTERNISTE

Jean Marc Ziza

PSYCHIATRE

Laurence Duval Chopard



Merci de votre attention

