

Apport de la biologie moléculaire au diagnostic des infections ostéo-articulaires

Infections sur prothèses

*Pascale Bémer, Bactériologie-Hygiène, CHU Nantes
CRIOAC Lyon, 4^{ème} journée de formation, 4 mars 2015*

Problématique à plusieurs niveaux

- ❑ Choix du type de PCR
 - Large spectre, PCR universelle (PCR 16S)
 - PCR spécifique, cible unique ou multiplex
 - Plateforme de microbiologie moléculaire (PCR ESI-MS)
- ❑ Choix du matériel à amplifier
 - Prélèvements tissulaires ou liquidiens
 - Liquides de sonication
- ❑ Moment de la réalisation de la PCR
 - D'emblée dans un but diagnostique
 - D'emblée dans un but thérapeutique
 - Après les premiers résultats des cultures

Diagnostic de l'IP

Pas de consensus : recommandations de niveau 2/3 ou avis d'expert

SPILF 2009

- ❑ Infection sur matériel
- ❑ Infection certaine
 - Prélèvements positifs
 - ☞ ≥ 3 si flore cutanée
 - ☞ ≥ 1 pathogène strict
- ❑ 5 prélèvements
- ❑ Non réalisées en routine
 - Culture du biofilm après sonication
 - Détection du gène codant l'ARN 16S

IDSA 2012

- ❑ Infection sur prothèse certaine
 - Prélèvements positifs
 - ☞ ≥ 2 si flore cutanée
 - ☞ ≥ 1 pathogène strict
 - Culture ultrasonnat positive
- ❑ ≥ 3 prélèvements (5 à 6)
- ❑ Culture du sonicat possible
 - Meilleure sensibilité/culture
- ❑ Biologie moléculaire
 - Pas encore disponible pour une utilisation en routine

PCR universelle

- ❑ ADN ribosomal 16S (ADNr 16S)
 - Absent des génomes viraux et fongiques
- ❑ Phylogénie moléculaire : base de l'identification
 - Approche large, « toute bactérie »
- ❑ Bactéries de culture difficile, pathogènes rares
- ❑ Limites
 - Bioinformatique, expertise nécessaire
 - Infections polymicrobiennes :
 - ☞ Clonage parfois nécessaire

Choix du matériel à amplifier

PCR 16S sur tissus ou liquide
synovial

Etude prospective monocentrique

- ❑ 525 patients
 - 1 prélèvement/patient
 - IP, n=33
- ❑ Culture mil. solides 10j
- ❑ PCR 16S (séquençage, clonage)

Test	Sensibilité	Spécificité
	%	%
Culture	87	89
PCR	92,5	96

- ❑ Infections polymicrobiennes
 - 3 ostéites sur fracture ouverte
 - 3 arthrites chez paraplégiques
 - ↳ 6 à 8 bactéries par clonage
 - ↳ 1 à 2 bactéries par culture
- ❑ Bactéries rarement décrites
 - *Alcaligenes faecalis*
 - *Comamonas terrigena*
- ❑ 21 espèces d'anaérobies

Etude prospective
Monocentrique

- ❑ 91 révisions PTG/PTH
- ❑ Prélèvements
 - Liq. synovial
 - ☞ PCR + Hémocultures
 - ≥ 3 tissus :
 - ☞ Culture
- ❑ 12 IP
 - 32 cas de PCR positive
- ❑ Suivi de 2 ans
 - Ni récurrence, ni nouveau cas

	SE	SP	VPP
	%	%	%
Ponction pré-op	70	95	78
Culture tissus	75	96	75
PCR liq synovial	92	74	34

Diminution de la sensibilité dans le diagnostic des IP

Etude rétrospective
monocentrique

- ❑ 51 patients inclus
 - 15 IP
- ❑ Extraction semi-automatique
 - NucliSens miniMAG
- ❑ SE plus faible de la PCR 16S
 - Pas de pré-traitement à la pK
- ❑ SE élevée de la culture
 - Aucun patient traité

Discordances dans les IP

6 faux négatifs de PCR	<i>S. aureus</i> <i>S. oralis</i> <i>S. epidermidis</i>
1 faux positif de culture	<i>S. epidermidis</i>
1 faux positif de culture et PCR	<i>M. osloensis</i>

Test	SE %	SP %
PCR	53.8 (7/13)	85.7 (6/7)
Culture	92.3 (12/13)	71.4 (5/7)

Choix du matériel à amplifier

PCR 16S à partir du liquide
de sonication

PCR 16S sur les descellements de prothèse

Résultats contradictoires

10% PTH reprises à 10 ans pour descellement : septique ?

Ince, CID 2004

- ❑ 24 prothèses reprises pour descellement
- ❑ Cultures des prélèvements
 - liq synovial et tissus d'interface ou néocapsule
- ❑ PCR 16S sur les prélèvements
 - 1 tissu pos à *P. acnes*
 - PCR 16S toutes négatives

Dempsey, 2004 Arth Res Ther

- ❑ 10 sonications de PTH
 - 5 infections-5 descellements
- ❑ PCR 16S +/- clonage
 - *Lysobacter*
 - *Gammaproteobacterium*
 - *Methylobacterium*
 - *Bradyrhizobium ...*
 - Très grande diversité bactérienne du biofilm
 - Pathogènes non cultivables...

Gomez, Patel, JCM, 2012 **PCR 16S ou culture sur sonicats ?**
absence de différence significative

Etude prospective
monocentrique

- ❑ 366 prothèses analysées
 - 135 infections (34 tt)
 - 231 reprises aseptiques
- ❑ Cultures sur :
 - ≥2 prélèvements per-op
 - ↳ après homogénéisation
 - Sonicats
- ❑ PCR 16S sur sonicats

	SE %	SP %
Cult sur tissus	70.4	98.7
Cult sur sonicats	72.6	98.3
PCR sur sonicats	70.4	97.8
Cult + PCR sur sonicats	78.5	97.0

Différence
non
significative

- ❑ 34 IP traitées
 - Sensibilité de la PCR 73% vs 67% de la culture de sonicat

Choix du type de PCR

PCR spécifique d'espèce
ou multiplex

Documentation moléculaire des IP à germes rares ou fastidieux

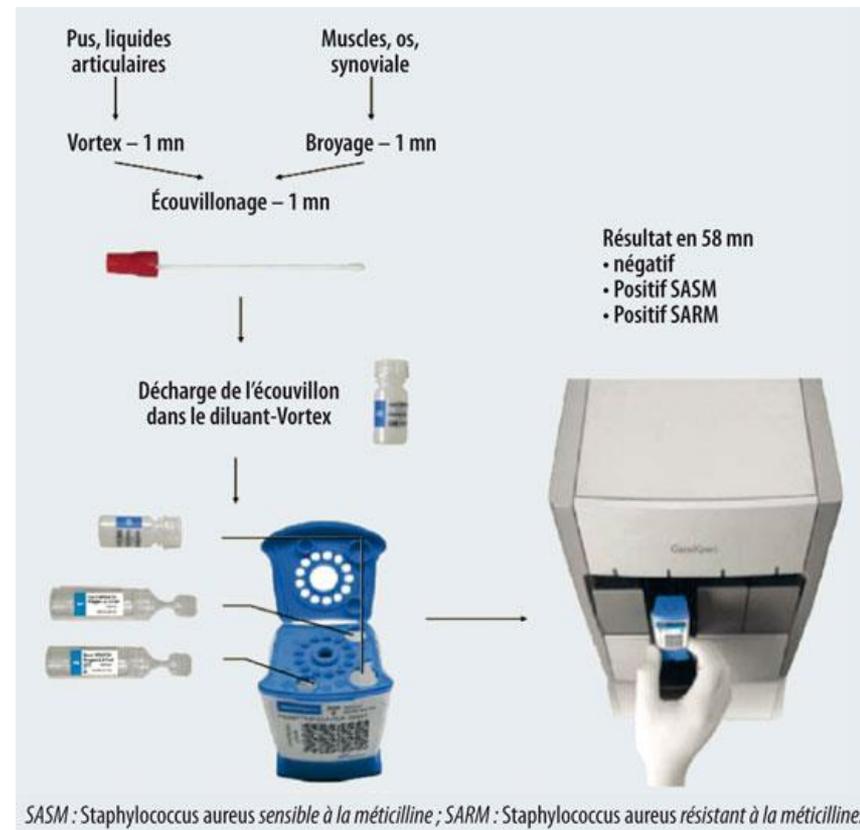
- ❑ IP à *Tropheryma whipplei*, Fresard, CID, 1996
 - Infection chronique sur PTG
 - Patiente atteinte de maladie de Whipple
 - PCR spécifique *T. whipplei* positive
- ❑ IP à *Coxiella burnetii*, Tande, JCM 2012
 - Infection chronique sur PTG, avec inflammation à l'histologie
 - Sérologie très positive pour la fièvre Q
 - PCR positive pour *C. burnetii*

PCR en temps réel-*Systeme GeneXpert®* pour les staphylocoques

Dubouix-Bourandy
JCM, 2011

Etude prospective
monocentrique

- ❑ 105 patients, 135 prélèvements
 - 46 IP
- ❑ Excellents résultats
 - SE 100% : SASM/SARM/SCNMR
 - SP \geq 95%
- ❑ Résultats en 72 min en moyenne
- ❑ Mais ...absence d'analyse
 - Patients traités vs non traités



Systeme GeneXpert® au service d'une stratégie antibiotique

Etude prospective monocentrique

- ❑ 30 IP
 - 104 prélèvements
- ❑ ≥ 3 Prélèvements per-op
 - Avant antibioprophylaxie
- ❑ 2 prélèvements par site
 - 1 en milieu Rosenow, 15 j
 - 1 homogénéisé
 - Vortexage (liquide+billes)
 - Milieu chocolat+BCC 5 j
 - Technologie GeneXpert®

Data after interpretation of
discordant results

	All samples (N = 104)	All patients (N = 30)
--	--------------------------	--------------------------

Sensitivity (%)	87.1	92.3
Specificity (%)	100	100
PPV (%)	100	100
NPV (%)	94.5	94.4

Gain thérapeutique

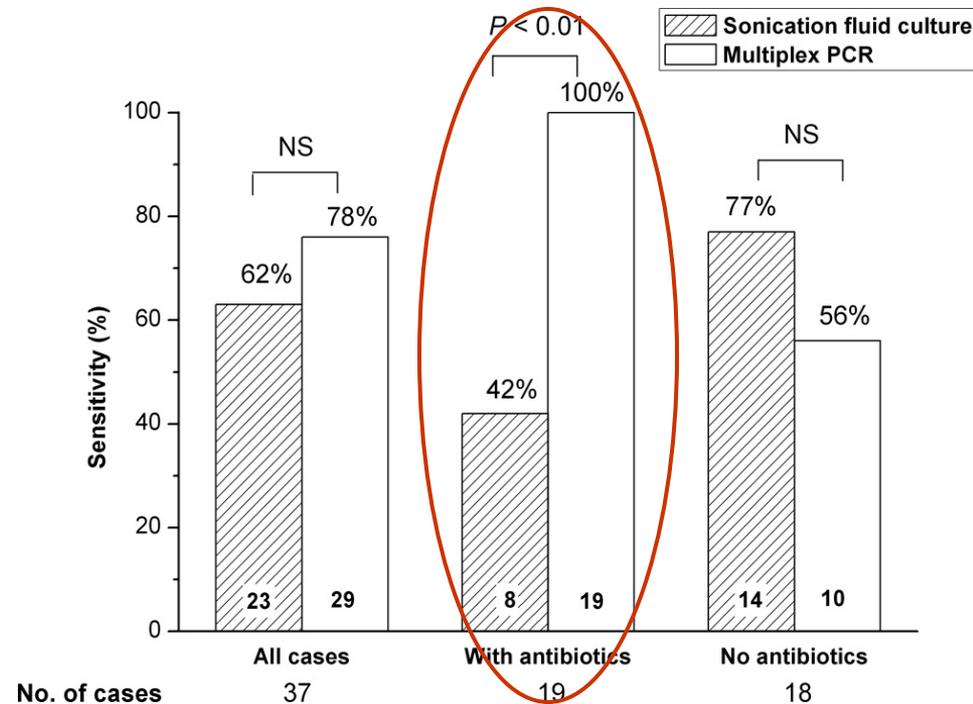
- ❑ 17 adaptations précoces
 - ☞ 11 VA, 4 LZD, 3 DPT

PCR multiplex sur sonicats Système SeptiFast®

Etude prospective
monocentrique

- 37 IP
- Prélèvements tissulaires
 - Homogénéisation manuelle
 - Cultures
- Sonication des prothèses
 - Cultures
 - PCR SeptiFast®
- PCR SeptiFast® (Roche)
 - PCR temps réel multiplex
 - 25 bactéries les plus fréquentes
 - (hors *P. acnes*, corynébactéries)
 - Pathogènes fongiques

	37 IP	Cult tissus	Cult sonicat	PCR sonicat
Sensibilité globale		24 (65%)	23 (62%)	29 (78%)



Gain chez les patients traités !!

Portillo,
J Infection, 2012

Systeme SeptiFast® sur sonicats sepsis et descellements aseptiques

Etude prospective
monocentrique

- 86 prothèses explantées
 - 24 IP
 - 62 descellements aseptiques
- Prélèvements tissulaires
 - Homogénéisation
 - Cultures
- Sonication des prothèses
 - Cultures
 - PCR SeptiFast®

	24 IP	Cult tissus	Cult sonicat	PCR sonicat
Monomicrobien		14	12	16
Polymicrobien		3	4	7
Sensibilité		17 (71%)	16 (67%)	23 (96%)

- 12 infections traitées
 - ☞ Sensibilité de la culture 67%
vs 92% pour la PCR
- 62 descellements aseptiques
 - ☞ 62 PCR neg
 - ☞ 10% des cultures positives à *S. epidermidis* ou *P. acnes*

Etude prospective monocentrique

- ❑ 434 patients
 - 144 infections (34 avec ATB)
 - 290 reprises aseptiques
- ❑ Prélèvements tissulaires
 - Homogénéisation manuelle
 - Cultures
- ❑ Sonication des prothèses
 - Cultures
 - PCR multiplex
- ❑ PCR multiplex
 - Spécifique de genres/espèces
 - Incluant *P. acnes* et les corynébactéries

	SE %	SP %
Cult sur tissus	70.1	97.9
Cult sur sonicats	72.9	98.3
PCR sur sonicats	77.1	97.9

Différence significative
P=0,04

- ❑ 11 IP polymicrobiennes
- ❑ 33 IP traités (15j)
 - Sensibilité de la PCR 88% vs 70% de la culture de sonicat
- ❑ 33 IP PCR-neg
 - Fongique, mycobactéries
 - 5 IP culture-pos à *S. aureus*

Biologie moléculaire du futur (proche): PCR ESI-MS



Plateforme moléculaire PCR ESI-MS

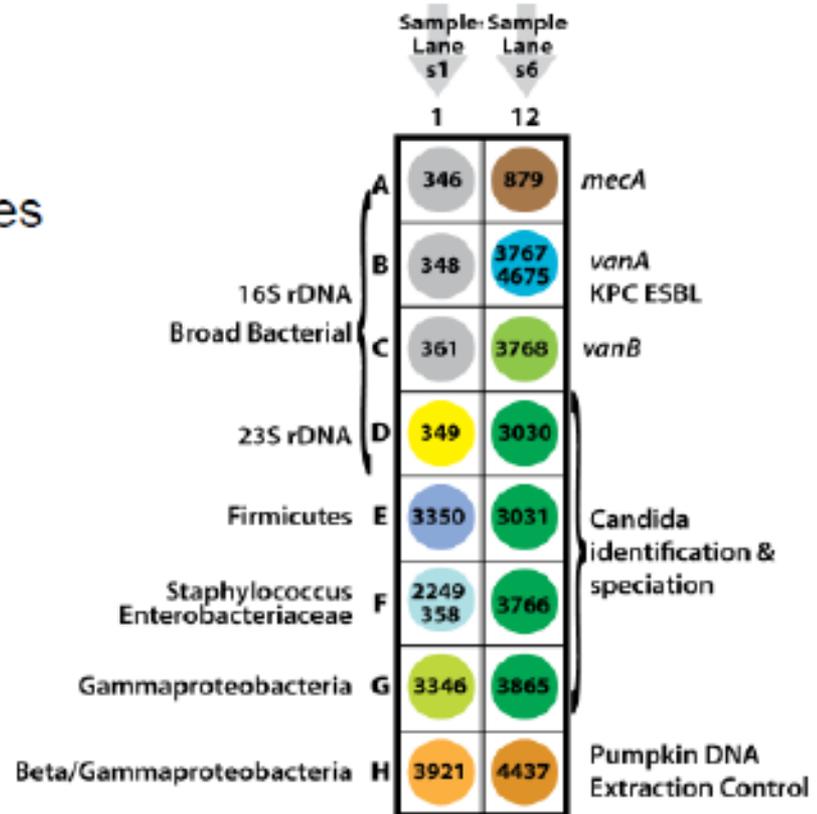
Un très grand nombre de cibles amplifiées

„Bacteria Antibiotic Resistance *Candida*“

Essai à 16 puits

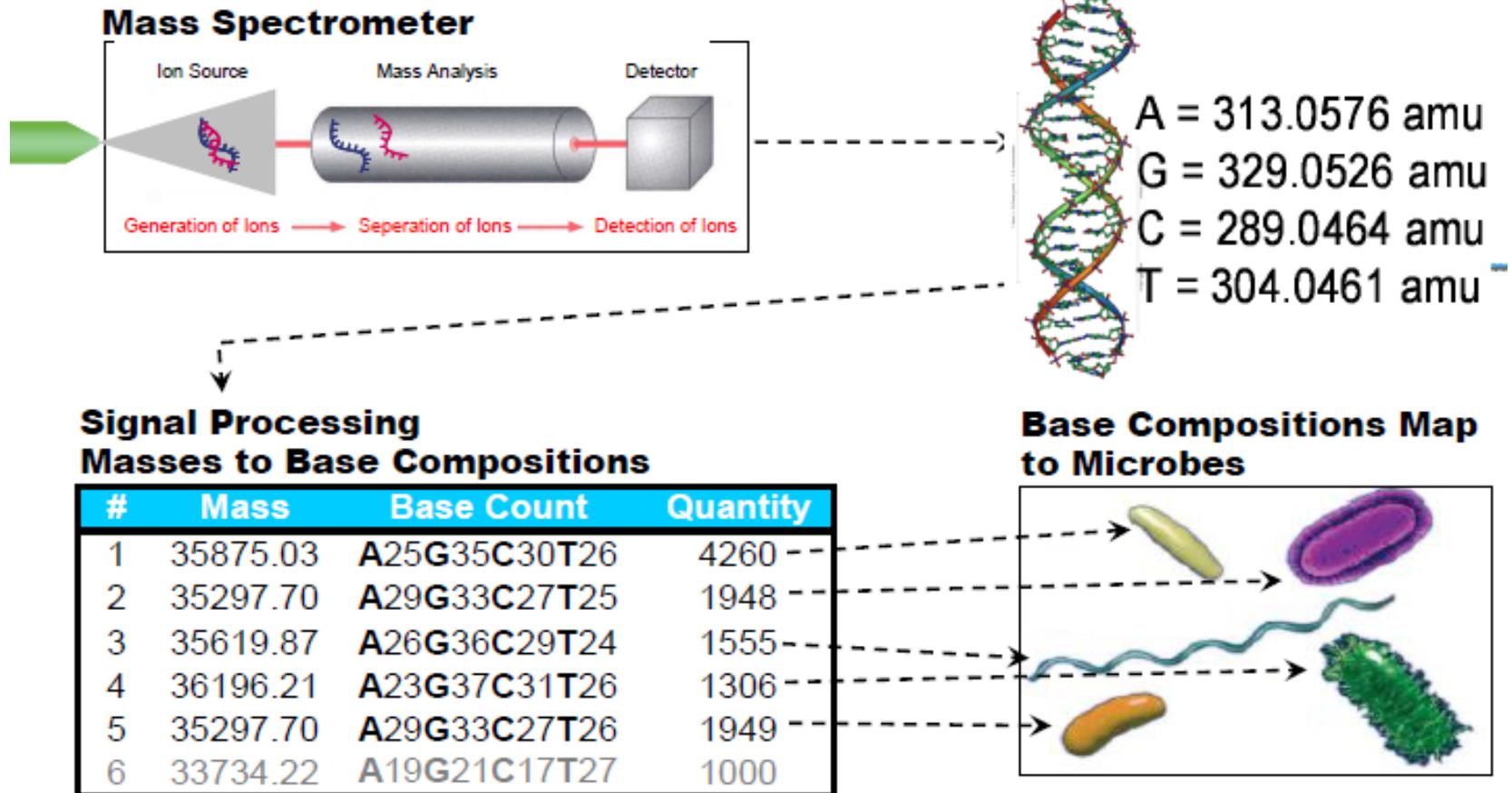
Identification: > 6000 espèces
et > 10000 souches de
bactéries / *Candida*.

Micro-organismes inconnus
reliés aux genres / espèces
les plus proches



Plateforme moléculaire PCR ESI-MS

PCR couplée à la spectrométrie de masse



PCR ESI-MS

Premières études

- ❑ **Jacovides, JBJS 2012, ponctions articulaires**
 - 23 IP cultures-négatives, 57 descellements aseptiques (DA)
 - Bonne sensibilité, spécificité désastreuse : 88% DA positifs
- ❑ **Patel, JCM 2012, liquides de sonication**
 - 152 IP, 279 descellements aseptiques
 - Sensibilité 77.6% PCR ESI vs 69.7% culture (p=0.0105)
 - Spécificité 93.5% PCR ESI vs 99.3% culture (p=0.0002)
- ❑ **Ehrlich, J Applied Biomater Funct Mater 2014, ponctions articulaires**
 - Arthroplasties primaires ou descellements aseptiques
 - Bactéries de gingivites ou parodontites dans le genou (48%)

MICROBIOS

Évaluation de la PCR 16S

dans le diagnostic des infections sur prothèses étude prospective multicentrique PHRC interrégional 2011

Co-investigateurs :

Angers : J. Cottin, C. Lemarié, M. Kempf

Brest : D. Tande, G. Héry-Arnaud

Nantes : P. Bémer, S. Corvec, S. Gibaud, ME Juv

Orléans : L. Bret, A. Guigon

Poitiers : C. Burucoa, C. Plouzeau-Jayle

Rennes : A. Gougeon, P. Vincent

Tours : AS. Valentin, L. Bernard, G. de Pinieux,

Méthodologistes : J. Léger, M.E. Juvin, B. Giraudeau,

Attachées de recherche clinique : K. Fèvre, L. Happi



Descriptifs de l'étude

- ❑ Objectif principal
 - Evaluer les performances diagnostiques de la PCR 16S dans le diagnostic d'IP
- ❑ Schéma d'étude
 - Etude transversale et multicentrique (interrégionale)
 - Inclusion consécutive des patients repris pour suspicion d'infection
- ❑ Définition de l'IP (IDSA 2012) : ≥ 1 critère positif
 - Clinique (pus per-opératoire et/ou fistule), Histologique
 - Bactériologique (≥ 1 germe strict, ≥ 2 germes flore cutanée)

MICROBIOS



**5 prélèvements
pour la bactériologie**

+

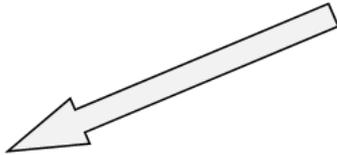
**1 prélèvement pour
l'anatomopathologie**



BROYAGE X5



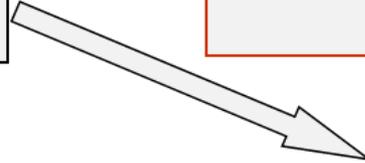
**Capsule ou
pseudocapsule**



**CULTURE
X5**



**CONGELATION
X5**



**BIOLOGIE
MOLECULAIRE X5**

299 patients inclus



Microbios : partie biologique



Dans 7 établissements hospitaliers

Homogénéisation

- ❑ Du pré-traitement des prélèvements
- ❑ Des méthodes de culture
- ❑ Du pré-traitement des extraits

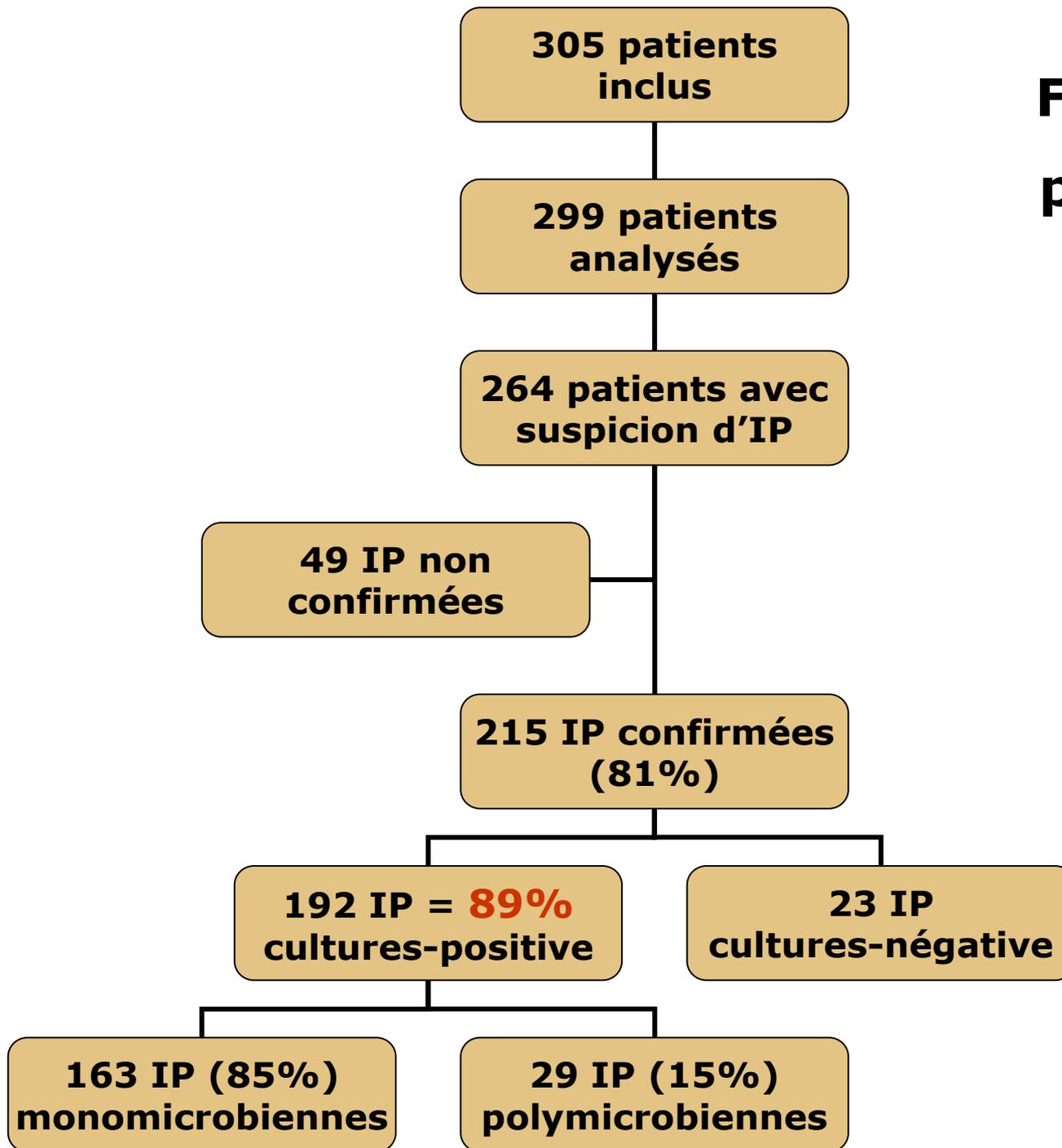
Culture (5 prélèvements)

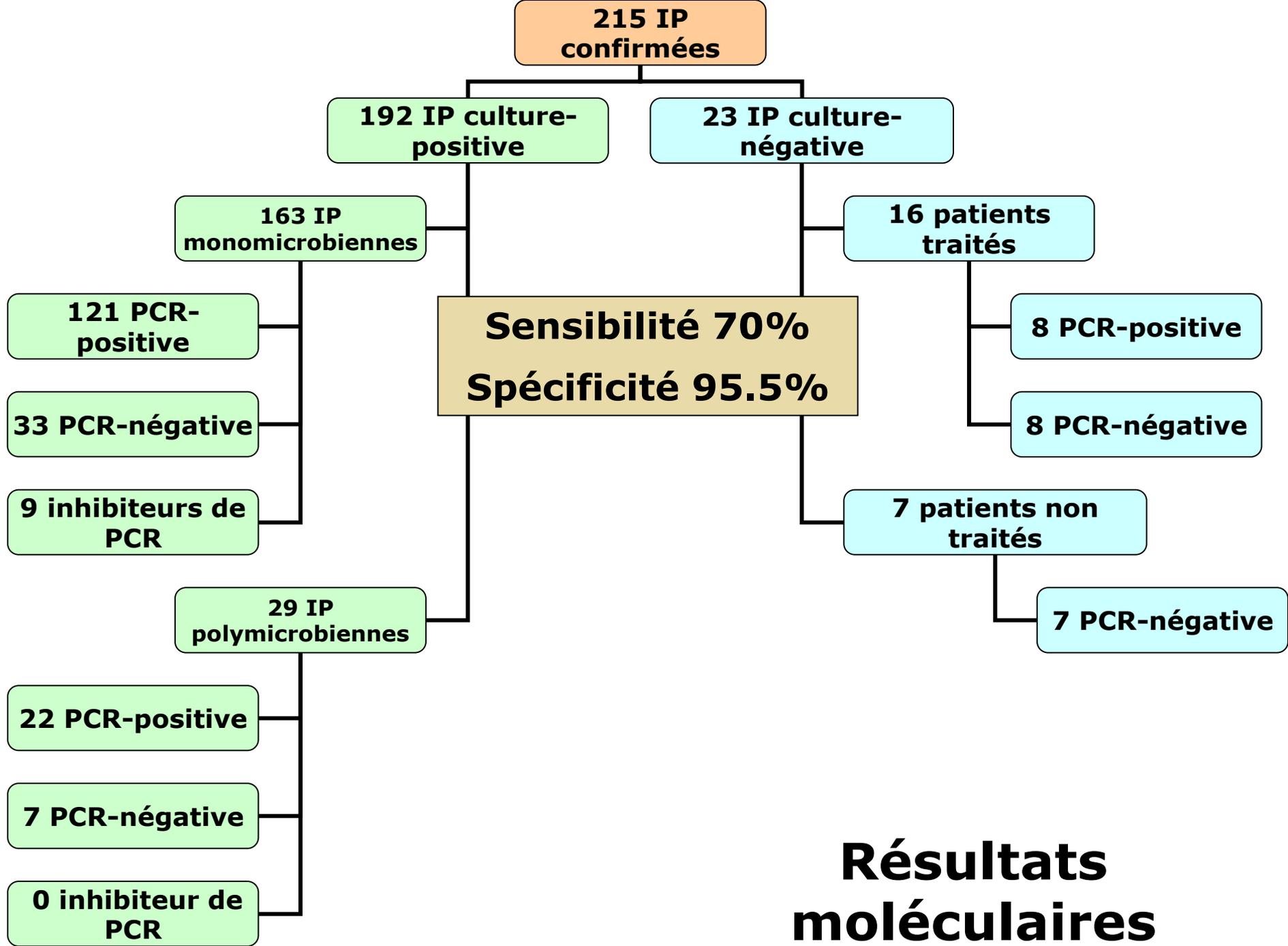
- ❑ Milieux solides ae/ana
- ❑ 1 milieu liquide anaérobie
- ❑ 1 flacon d'hémoculture pédiatrique (2 ml broyat)
- ❑ Incubation 7/14 j
- ❑ PCR (5 prélèvements)
 - 200 µl de broyat extrait (pK)
 - Amorces 16S identiques
 - 1 contrôle interne par extrait
 - 3 contrôles de qualité
 - ✓ 4 broyats et 4 souches
 - ✓ envoyés aux 7 centres
 - ✓ début-milieu-fin de protocole

Description des patients à l'inclusion

Variables		Sepsis (%)
Nombre de suspicions de sepsis		264
Hommes		150 (50)
Femmes		149 (49.8)
Prothèse	Hanche	165 (63)
	Genou	88 (33)
Epaule/Coude		11
En faveur d'une infection	Aigüe	50 (18.9)
	Chronique	214 (81.1)
Antibiothérapie (15 jours précédent la chirurgie)		76 (29.1)

Flow-chart des patients inclus





Résultats moléculaires

Biologie moléculaire et diagnostic des IP :

Quel type de PCR choisir ?

- ❑ PCR 16S séduisante avec des limitations importantes
 - Risque de contamination
 - Sensibilité insuffisante
 - Clonage nécessaire
 - Impossible à instaurer en routine de laboratoire
- ❑ Préférer les PCR spécifiques de genres/espèces
 - 1 espèce ou 1 genre bactérien : GenXPert
 - Panel « maison » à valider à l'aide de contrôles int/ext-ernes
 - Systèmes commercialisés (Septifast) : onéreux
 - Avenir : PCR ESI-MS : très onéreux, monosite...

Biologie moléculaire et diagnostic des IP :

Faut-il faire de la PCR en routine ?

- ❑ En première intention ?
 - Patients traités quel que soit le résultat des cultures
 - Screening sur 1 ou 2 prélèvements (os, contact matériel...)
- ❑ En deuxième intention ? Chez les patients traités ?
 - Et à quel délai de culture : 1^{ère} semaine, fin des 15 jours requis ?
- ❑ Que dit la littérature, JAC 2014, Hartley/Harris ?
 - En cas de suspicion d'infection avec cultures négatives...
 - Surtout si traitement antibiotique
 - PCR spécifiques : *S. aureus*, SCN, *P. acnes*
 - 2^{ème} temps : PCR à large spectre (16S, 23S..)

Biologie moléculaire et diagnostic des IP :

Dans tous les cas...

- ❑ Etudes prospectives multicentriques nécessaires
 - Fédération des CRIOAC ?
 - PHRC national ?
- ❑ Etudes cliniques avant tout
- ❑ Comparaison à la culture
 - Optimisation maximale de la culture