



5èmes Journées scientifiques du CRIOGO

Angers

17 octobre 2014

Groupe des Microbiologistes du GRIOGO

Quoi de neuf en Bactériologie?

Chloé PLOUZEAU

Laboratoire de Bactériologie CHU de POITIERS

Evaluation of 16S rRNA Gene PCR Sensitivity and Specificity for Diagnosis of Prosthetic Joint Infection: a Prospective Multicenter Cross-Sectional Study

Pascale Bémer,^a Chloé Plouzeau,^b Didier Tande,^c Julie Léger,^d Bruno Giraudeau,^d Anne Sophie Valentin,^e Anne Jolivet-Gougeon,^f Pascal Vincent,^f Stéphane Corvec,^a Sophie Gibaud,^a Marie Emmanuelle Juvin,^a Genevieve Héry-Arnaud,^c Carole Lemarié,^g Marie Kempf,^g Laurent Bret,^h Roland Quentin,^e Carine Coffre,^d Gonzague de Pinieux,ⁱ Louis Bernard,^j Christophe Burucoa,^b the **Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest (CRIOGO) Study Team**

CHU Nantes, Laboratoire de Bactériologie, Nantes, France^a; CHU Poitiers, Laboratoire de Bactériologie, Poitiers, France^b; CHU Brest, Laboratoire de Bactériologie, Brest, France^c; INSERM, CIC 1415, Tours, France^d; CHU Tours, Laboratoire de Bactériologie, Tours, France^e; CHU Rennes, Laboratoire de Bactériologie, Rennes, France^f; CHU Angers, Angers, France^g; CHU Orléans, Laboratoire de Bactériologie, Orléans, France^h; CHU Tours, Laboratoire d'Anatomo-Pathologie, Tours, Franceⁱ; CHU Tours, Service des Maladies Infectieuses, Tours, France^j

JUILLET 2014

“First experience of multicenter external quality assessment for molecular 16S rDNA detection in bone and joint infections”

Rewiew en cours JCM

- 3ème article :
 - quels sont les milieux de culture les plus pertinents ?
 - 5 prélèvements sont-ils vraiment nécessaires?

- Projet Microbios II : test PCR multiplex rapide sur la cohorte Microbios

- Projets prospectifs: Sonication?
PCR ESI-TOF??

Quoi de neuf ? : la PCR ESI -TOF

PCR couplée à la
spectrométrie de masse

Technique diagnostique :
rapidité / automatisation/ spectre large

Identification
(bactéries / levures)
Très bonne sensibilité

Données de résistance ou
de virulence



PLEX-ID

Technologie qui devrait être disponible à
Angers dans les mois à venir
(IRIDICA, Abbott)



La PCR –ESI-TOF

Electro
Spray
ionisation

Time
of
Flight

Principes :

Technique génomique amplifiant des cibles multiples

Détection des amplicons en spectrométrie de masse

La masse des amplicons = «signature moléculaire»

Identification par comparaison à une base données



Un grand nombre de cibles amplifiées

Bactéries

- Amorces universelles 16s et 23s
- Gènes de ménages couvrant l'ensemble du règne
- Gènes de résistance (mecA, vanA, VanB, blaKPC)

Champignons

- Amorces universelles ribosomal
- ADN mitochondrial

- Virus

- Gènes hautement conservés d'un grand nombre de famille virale

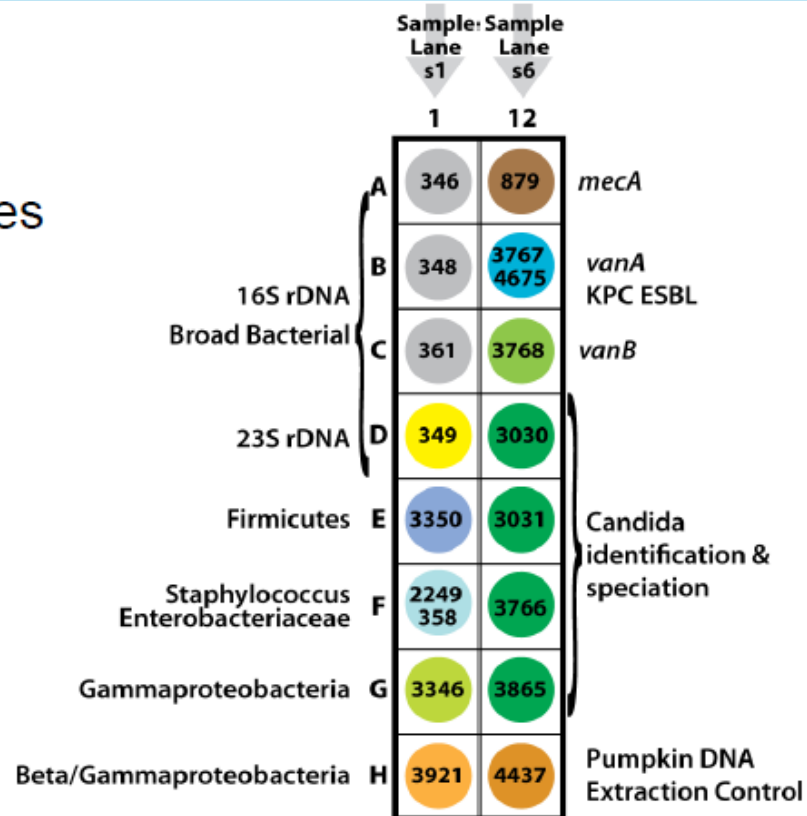
Première étape PCR avec de multiples amorces

„Bacteria Antibiotic Resistance *Candida*“

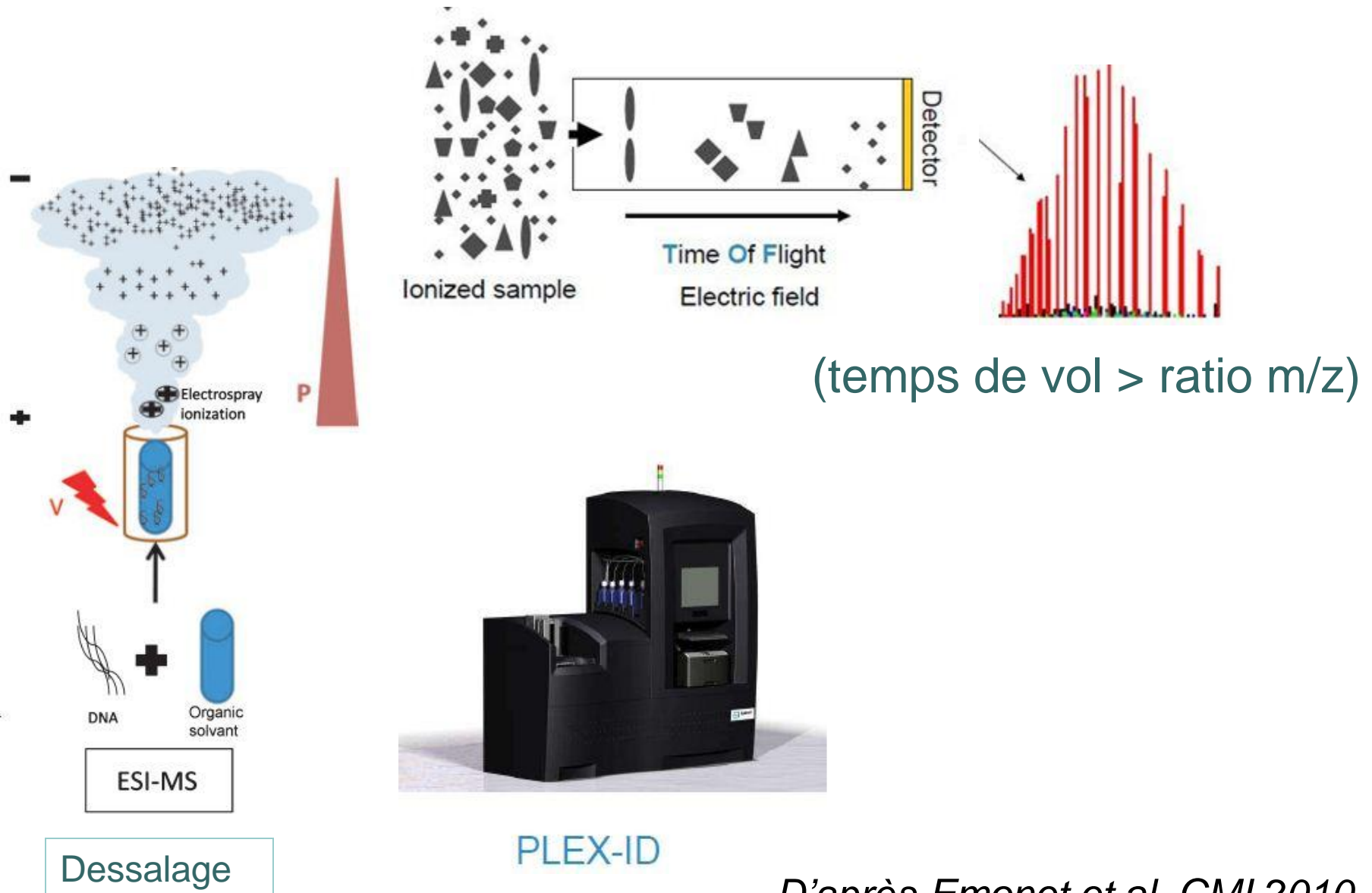
Essai à 16 puits

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

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



2) Electro-spray-ionisation MS

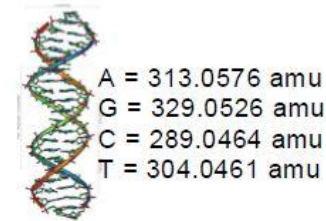


(temps de vol > ratio m/z)

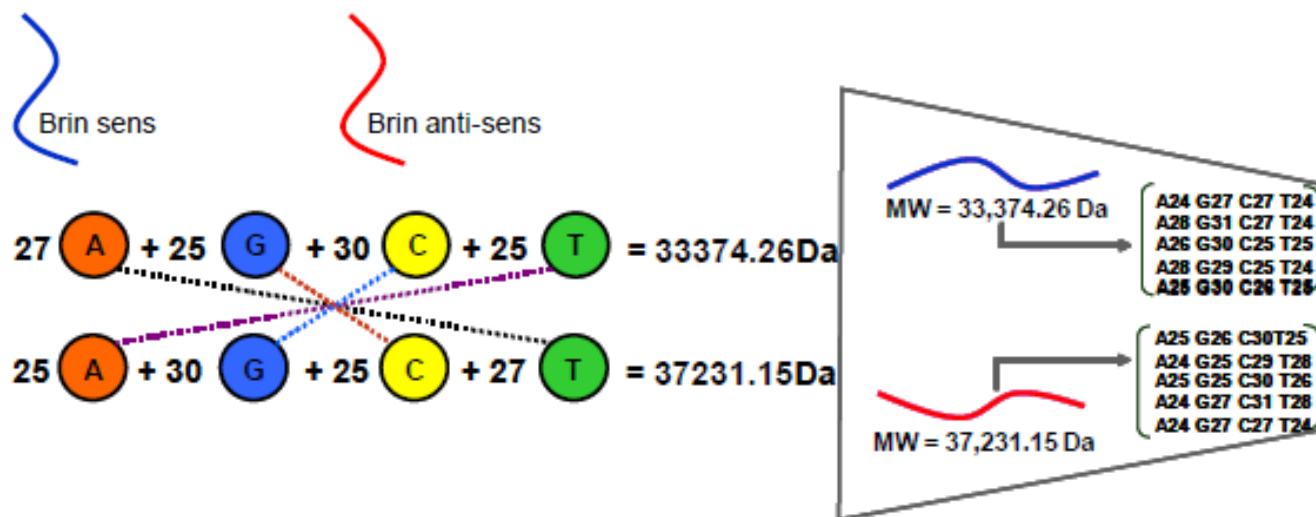
D'après Emonet et al. CMI 2010

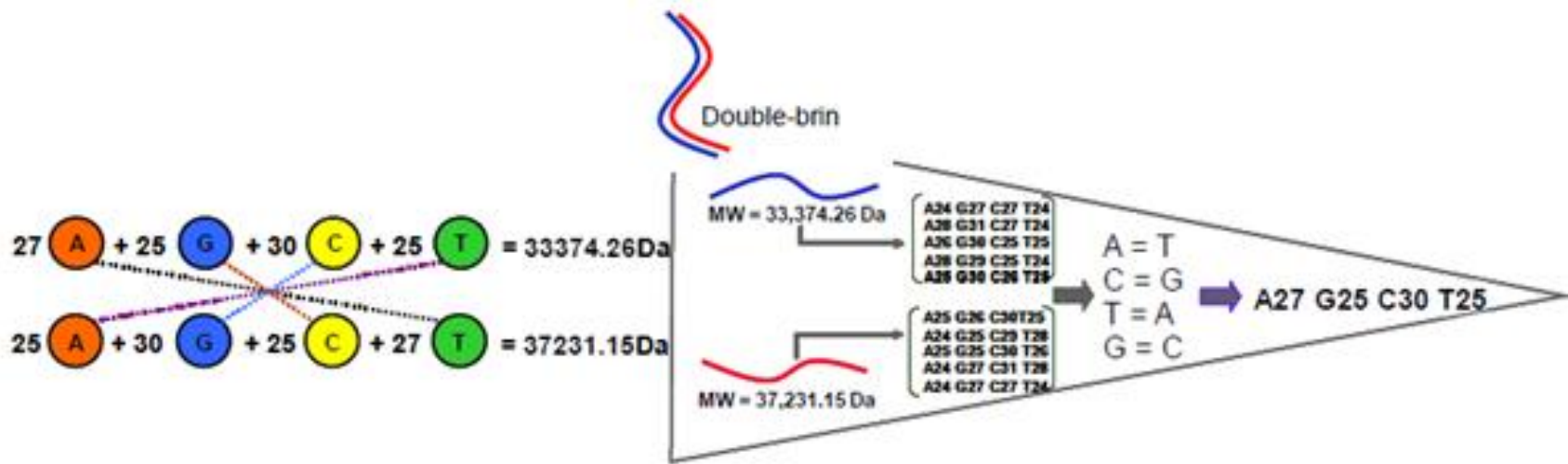
3) Conversion de la masse en composition en acides nucléiques

Spectro : Masse globale pour chaque brin
 Chaque AN= une masse connue



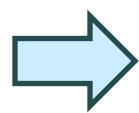
Masse globale d'un amplicon → composition en AN





Plusieurs combinaisons possibles pour chaque brin

Une seule solution pour avoir les deux brins complémentaires



Aw Gx Cy Tz « signature moléculaire »

Comparée à la base de donnée pour chaque amorce

	Organisme	Masse	Base Composition
PCR/Target Region 1	Bacillus anthracis	35278.823	A26 C34 C27 T27
	Escherichia coli	35641.855	A22 G39 C29T25
	Staph aureus	35240.807	A24 G35 C30 T25
PCR/Target Region 2	Bacillus anthracis	35174.799	A25 C32 C30 T27
	Escherichia coli	35870.920	A27 G33 C27 T29
	Staph aureus	35744.918	A29 G29 C30 T28

Accès aux données spectrales et aux compositions moléculaires pour chaque amorce

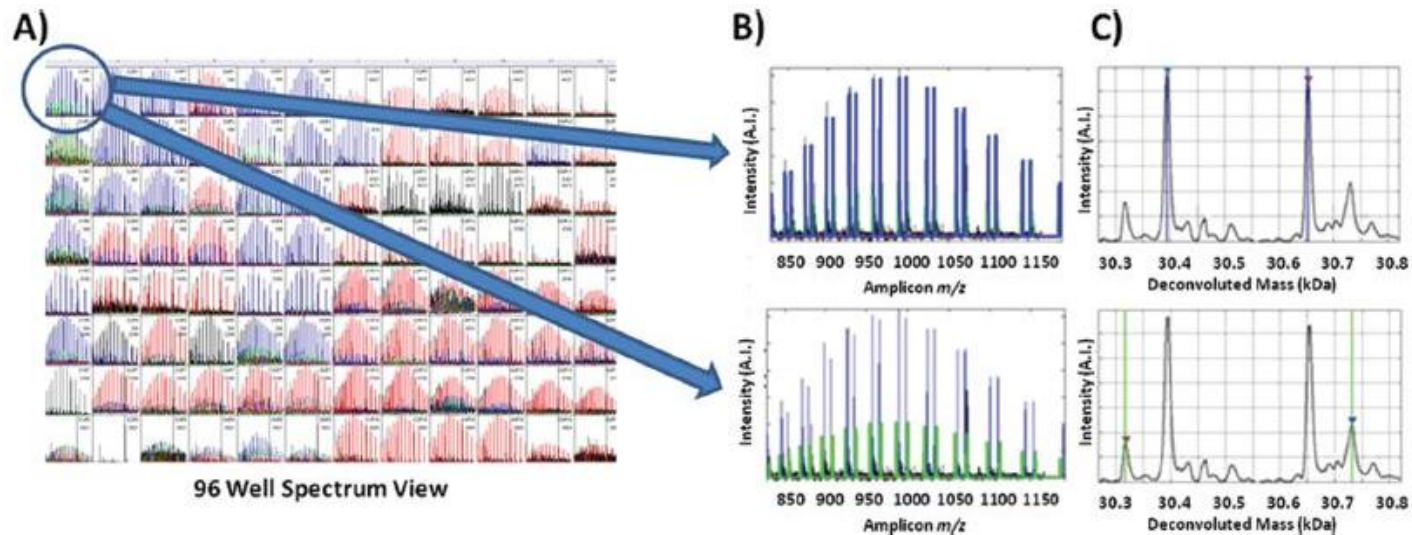


FIG. 1. Determining the base composition from mass spectral data: example using BCB115. (A) The spectra are collected and displayed as a 96-well plate format. Mass spectra can be viewed independently for each of the 96 wells. (B) Electro-spray-generated mass spectra. This sample contains the PCR amplicons from two different organisms: *Bacteroides thetaiotaomicron* (top) and *Staphylococcus aureus* (bottom). (C) Deconvoluted mass spectra showing molecular masses of the forward and reverse strands of each PCR amplicon. An algorithm is used to calculate the base composition from the molecular mass and was calculated to be 30A-27G-23C-19T (top) and 27A-30G-21C-21T (bottom).

Sample No.	Organism ID	Base Composition							
		16S (346)	16S (348)	16S (361)	23S (349)	rplB (3350)	tufB (367)	valS (358)	rpoB(3346)
BCB115	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	A30 G27 C23 T19	-	A30 G31 C23 T26	A30 G29 C23 T19	-	-	-	A24 G29 C27 T32
	<i>Staphylococcus aureus</i>	A27 G30 C21 T21	A30 G29 C29 T30	A29 G30 C25 T24	-	A16 G23 C21 T19	A43 G28 C19 T35	-	-
						Candida			
	Primers	rpoB(3921)	mecA	bla _{IPC}	vanA / vanB	25S (3030)	25S (3031)	25S (3766)	mito. rDNA (3865)
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	A22 G11 C21 T21	-	-	-	-	-	-

FIG. 3. Base composition data obtained from sample BCB115, which contained a mixture of the Gram-negative anaerobe *Bacteroides thetaiotaomicron* and the Gram-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The composition of the PCR amplicon produced by each primer is shown.

Détection des infections mixtes

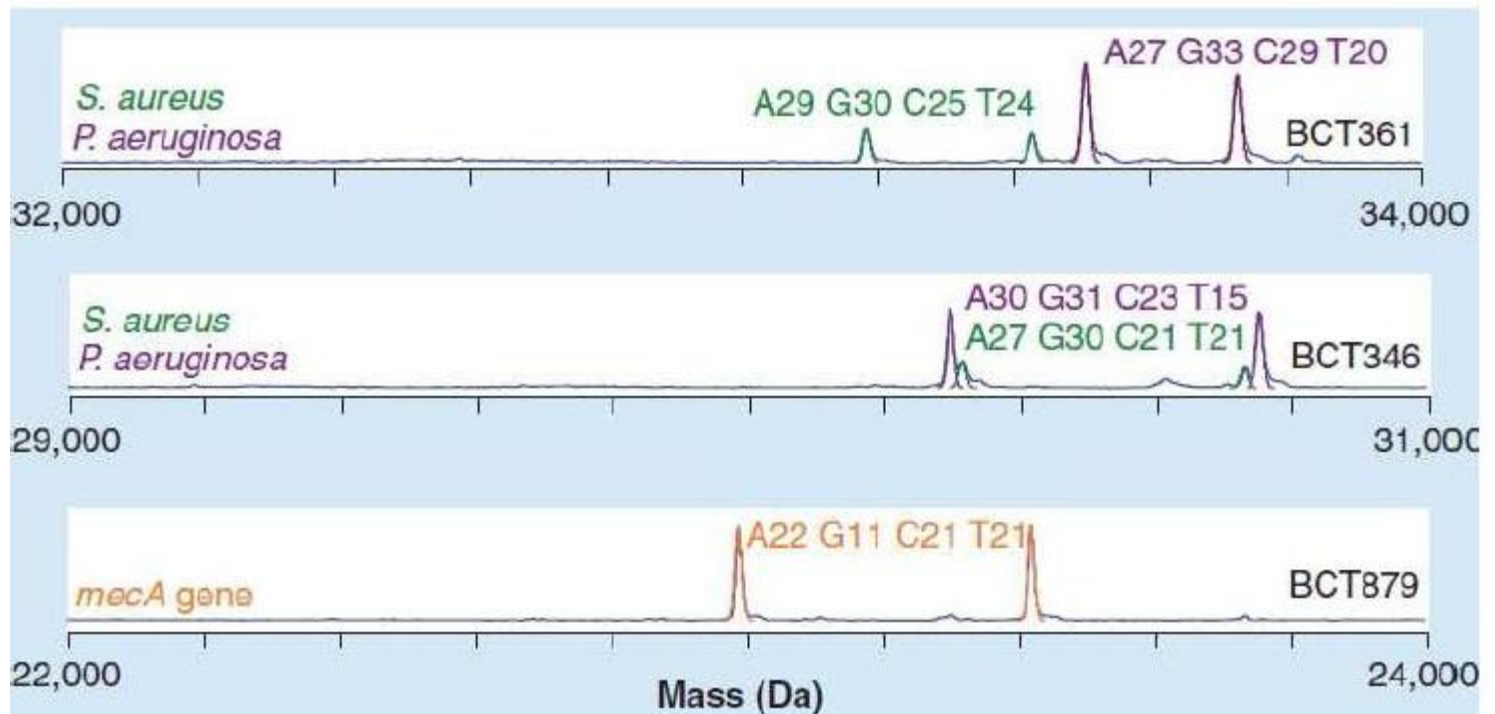


Figure 5. Spectra of a sample from a patient with a mixed infection. A blood specimen from a patient co-infected with *Staphylococcus aureus* containing a *mecA* gene and *Pseudomonas aeruginosa* as analyzed by PCR/electrospray ionization/mass spectrometry. Individual spectra from six of the nine bacteria-targeted amplifications are shown. M/Z was converted to the M domain and the scales were selected to visualize all detected peaks.

Ecker et al. Expert Rev. Mol. Diagn. 2010

Détection de mélange jusqu'à 3 ou 4



PCR ESI -TOF....

Temps d'analyse : 6h

Machine : 500 000 €
maintenance 46 000 € /An

Kits : 100 € par échantillons



PCR-ESI-TOF et IOA ?

444/
COPYRIGHT © 2012 BY THE JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY, INCORPORATED

Successful Identification of Pathogens by Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Electron Spray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (ESI-TOF-MS) in Culture-Negative Periprosthetic Joint Infection

Christina L. Jacovides, BS, Rachael Kreft, BS, RN, Bahar Adeli, BA, Bryan Hozack, BA,
Garth D. Ehrlich, PhD, and Javad Parvizi, MD, FRCS

*Investigation performed at the Rothman Institute of Orthopedics at Thomas Jefferson University Hospital,
Philadelphia, and the Allegheny Singer Research Institute, Pittsburgh, Pennsylvania*

87 reprises chez 80 patients

65 genoux

15 hanches

7 poses prothèse de première intention

- 23 cas classés IOA
- 57 cas non infectieux

Ponctions articulaires

Culture vs PCR-ESI (ancienne génération)

Bonne sensibilité

Spécificité désastreuse : 88% de positifs dans le groupe des patients classés descellement aseptique

Diagnosis of Prosthetic Joint Infection by Use of PCR-Electrospray Ionization Mass Spectrometry

Karryl E. Greenwood-Quaintance,^a James R. Uhl,^a Arlen D. Hansson,^b Rangarajan Sampath,^a Jayawant N. Mandrekar,^d Robin Patel^{a,c}

Division of Clinical Microbiology, Department of Laboratory Medicine and Pathology,^a Department of Orthopedic Surgery,^b Division of Infectious Diseases, Department of Medicine,^c and Division of Biomedical Statistics and Informatics, Department of Health Science Research,^d Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA; Ibis Biosciences Inc, Carlsbad, California, USA^e

We compared PCR-electrospray ionization mass spectrometry (PCR-ESI/MS) to culture using sonicate fluid from 431 subjects with explanted knee ($n = 270$) or hip ($n = 161$) prostheses. Of these, 152 and 279 subjects had prosthetic joint infection (PJI) and aseptic failure, respectively. The sensitivities for detecting PJI were 77.6% for PCR-ESI/MS and 69.7% for culture ($P = 0.0105$). The specificities were 93.5 and 99.3%, respectively ($P = 0.0002$).

- PCR ESI vs Culture sur les liquides de sonication
- 431 prothèses (270 G et 161 PH)
 - 152 IOAP infection de l'articulation prothétique (IPA)
 - 279 Descellement aseptiques

PCR-ESI / Culture

Sensibilité	77,6% / 69,7% (0,0105).
Spécificité	93,5 / 99,3%, (0,0002).

Detection of Prosthetic Joint Infection by Use of PCR-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Applied to Synovial Fluid

Dante P. Melendez,^a James R. Uhl,^b Kerryl E. Greenwood-Quaintance,^b Arlen D. Hanssen,^c Rangarajan Sampath,^d Robin Patel^{a,b,c}

Division of Infectious Diseases, Department of Medicine,^a Division of Clinical Microbiology, Department of Laboratory Medicine and Pathology,^b and Department of Orthopedic Surgery,^c Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA; Ibis Biosciences, Abbott Company, Carlsbad, California, USA^d

PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry applied to synovial fluid specimens had an 81% sensitivity and a 95% specificity for the diagnosis of prosthetic joint infection.

- Rétrospective
- PCR ESI-TOF sur ponctions articulaires pre-op
- 21 infections/ 82 descellements aseptiques (MSIS)

- Nouvelles procédures pour collecter les échantillons (Stérilisation RX ^{137}C des tubes)
- Utilisation de seuil de positivité pour la PCR ESI-TOF : calibrant interne (25 équivalents-génome/puit)

12 à 16 h pour résultats

PCR ESI-TOF

Culture

- Sensibilité 81% 86% (p= 0,56),
- Spécificités 95% 100% (p= 0,045).

○ Discussion

- Très bonne concordance pour la détection par PCR-ESI de la résistance (mecA et vanA ou B)
- Faux positif de PCR-ESI / MS
 - aucun prélèvement opératoire pos
 - suivi à long terme : pas d'infection

Certains patients antécédents d'infection

*Ex : Staphylococcus aureus IPA 3 ans avant
PCR-ESI / MS détecté S. aureus (seuil)*

What role do periodontal pathogens play in osteoarthritis and periprosthetic joint infections of the knee?

Garth D. Ehrlich¹⁻³, Fen Z. Hu¹⁻³, Nicholas Sotereanos⁴, Jeffrey Sewicke⁴, Javad Parvizi⁵, Peter L. Nara⁶, Carla Renata Arciola^{7,8}

- Retrospective : poses de prothèse ou reprises
- Séquençages 16s et technique hybridation in situ FISH/
confirmation en PCR ESI-TOF
- Présence dans des prélèvement per opératoire de genou de
bactéries des gingivites ou parodontites
(*Treponema denticola*, *Brevundimonas diminuta* et *Enterococcus faecalis*)
- Autres bactéries orales, des espèces de streptocoques

- Germes uniquement dans les Genou (12/25 : 48%)
pas Hanches 0/13

Y compris:

- arthroplasties primaires et descellement méca
- cultures négatives
- .
- Quel rôle de ces bactéries dans les atteintes articulaires?
 - Cavité buccale
 - Biofilm: bactéries à croissance lente
 - Mais bactéries sont associés à des atteintes maxillaires et les pertes osseuses mandibulaires.
 - Hypothèse
 - Effet direct d'un biofilm bactérien sur le tissu hôte
 - Réponse immune de l'hôte contre ce biofilm responsable de lésions



Conclusions

Technique très sensible

Rapide

Donnant accès à des données de résistance

Intérêt de pouvoir mettre en évidence des infections multiples

MAIS

Trop sensible: interprétation??

Bactéries retrouvées chez des patients

« non septiques »