

MICROBIOS

Évaluation de l'apport des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic des infections sur prothèses ostéo-articulaires

*PHRC interrégional 2011, Ref : PROG/11/44
CRIOGO : Centre de Référence des
Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest*

MicrobiOs 1

Évaluation de l'apport des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic des infections sur prothèses ostéo-articulaires

Type d'étude : **Etude multicentrique observationnelle** (interrégionale):

- ❑ Inclusion consécutive des patients repris pour suspicion d'infection (critères diagnostiques présumés d'infection, SPILF 2009)
- ❑ Patients opérés pour pose de prothèse de 1ère intention inclus comme témoins de contrôle négatif

Investigateurs

- ❑ Investigateur coordonnateur : P. Bémer (Nantes)
- ❑ Co-investigateurs :
 - Angers : J. Cottin, C. Lemarié, M. Kempf
 - Brest : D. Tande, G. Héry-Arnaud
 - Nantes : S. Corvec, S. Gibaud
 - 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, C. Coffre
- ❑ Attachées de recherche clinique : K. Fèvre, L. Happi

Collaborateurs associés

- ❑ Angers : C. Quinqueneau, P. Bizot, MC. Rousselet
- ❑ Brest : S. Rozec, R. Gérard, I. Quentin-Roué
- ❑ Nantes : R. Boisson, A. Guilloux, S. Touchais, A. Moreau
- ❑ Orléans : J. Guignard, F. Razanabola, P. Michenet
- ❑ Poitiers : AS. Cognée, LO. Gayet, S. Milin
- ❑ Rennes : P. Gautier, JL. Polard
- ❑ Tours : R. Quentin, P. Rosset

Objectifs

Evaluer l'apport :

- du broyage mécanique des prélèvements
- de l'inoculation des prélèvements sur flacon d'hémoculture
- des techniques de la PCR 16S
 - des IPOA chroniques
 - à bactéries à croissance lente ou difficile,
 - en cas de culture négative
- de l'anatomopathologie, dans le diagnostic d'IPOA

Documenter :

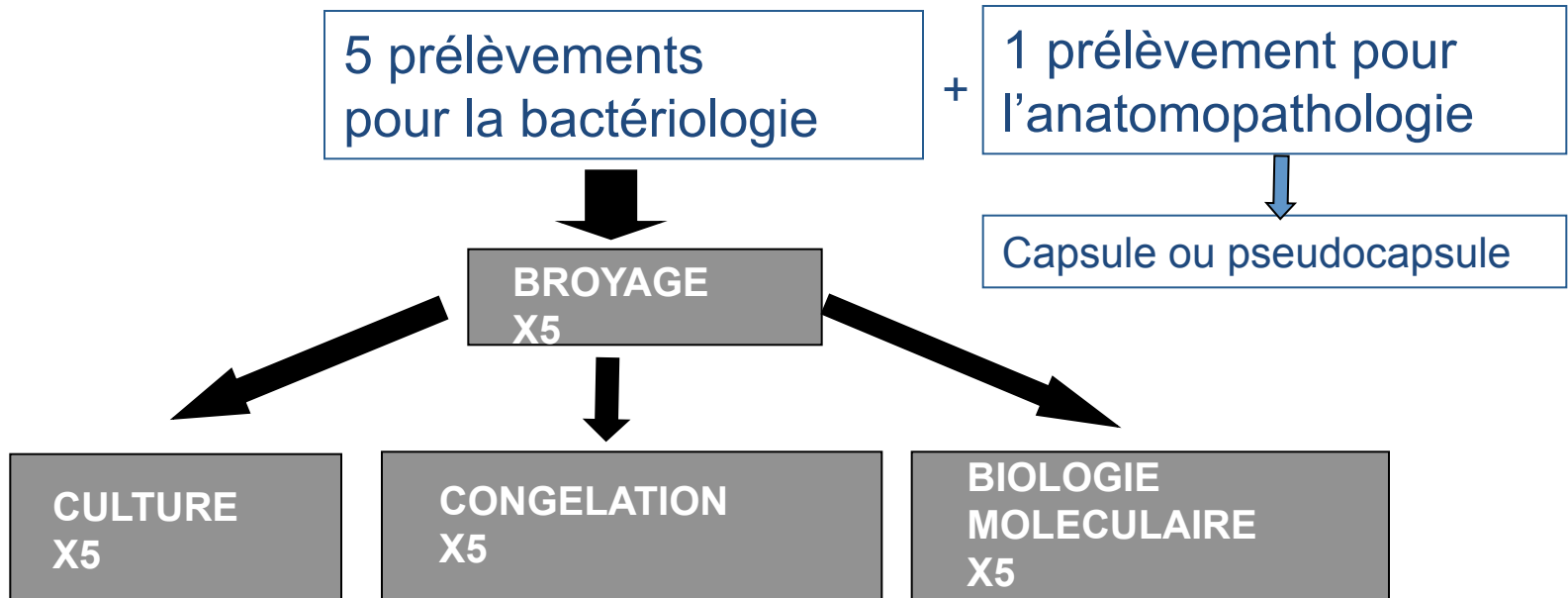
- l'épidémiologie des espèces bactériennes rencontrées dans les IPOA de l'Ouest de la France
- leur sensibilité aux antibiotiques

Cadre de l'étude

- 7 centres
- 12 à 15 mois
- 30 patients + 10 témoins (> 18 ans) / Centre
- Infection sur prothèse (Hanche, Genou, Epaule, Coude)
- 5 prélèvements bactériologiques étagés
2 osseux profonds, 1 au contact du matériel, 1 synovial, 1 liq. articulaire
- 1 prélèvement pour l'histologie

MICROBIOS

Reprise chirurgicale sur prothèse : 6 prélèvements



299 patients, 264 sepsis, 35 témoins, 1494 prélèvements

Critères de jugement

- ❑ **Critère clinique péri-opératoire (SPILF 2009)**
 - ☞ Fistule communiquant avec la prothèse et/ou présence de pus
- ❑ **Critère bactériologique (SPILF 2009 et IDSA 2012)**
 - ☞ Infection monomicrobienne
 - ≥ 3 prélèvements positifs (*P. acnes*, STCN, corynébactéries)
 - ≥ 1 prélèvement positif si bactérie pathogène stricte ou rare
 - ☞ Infection polymicrobienne
 - ≥ 3 prélèvements + (flore cutanée) ou ≥ 1 prélèvements(s) + à pathogène strict/rare
 - ou
 - ≥ 2 prélèvements + à 2 pathogènes stricts/rares (ex : *E coli* + *S aureus*)
- ❑ **Critère histologique** : classification de type II ou III
- ❑ **Critère moléculaire** : identique au critère bactériologique
 - ☞ Absent dans les infections polymicrobiennes
 - Toutes les bactéries ne sont identifiées par la PCR 16S sans clonage

Analyse statistique

- ❑ Description des patients à l'inclusion
- ❑ Analyse principale descriptive
 - ☞ Infection certaine
 - Présence des critères clinique et bactériologique
 - ☞ Infection probable
 - Présence du critère clinique ou bactériologique
 - ☞ Infection exclue
 - Absence du critère clinique et bactériologique
- ❑ Pour le critère moléculaire
 - ☞ Analyse de tous les sepsis, à l'exception des sepsis polymicrobiens

Flow-chart

^A 6 patients excluded for the following reasons:

- inclusion criteria not met (n=4)
- microbiological protocol not respected (n=1)
- patient included twice (n=1).

^b The 35 patients were negative in culture.

^c PJI : prosthetic-joint infection.

^d The 47 not confirmed PJI had no clinical, bacteriological, or histological criteria.

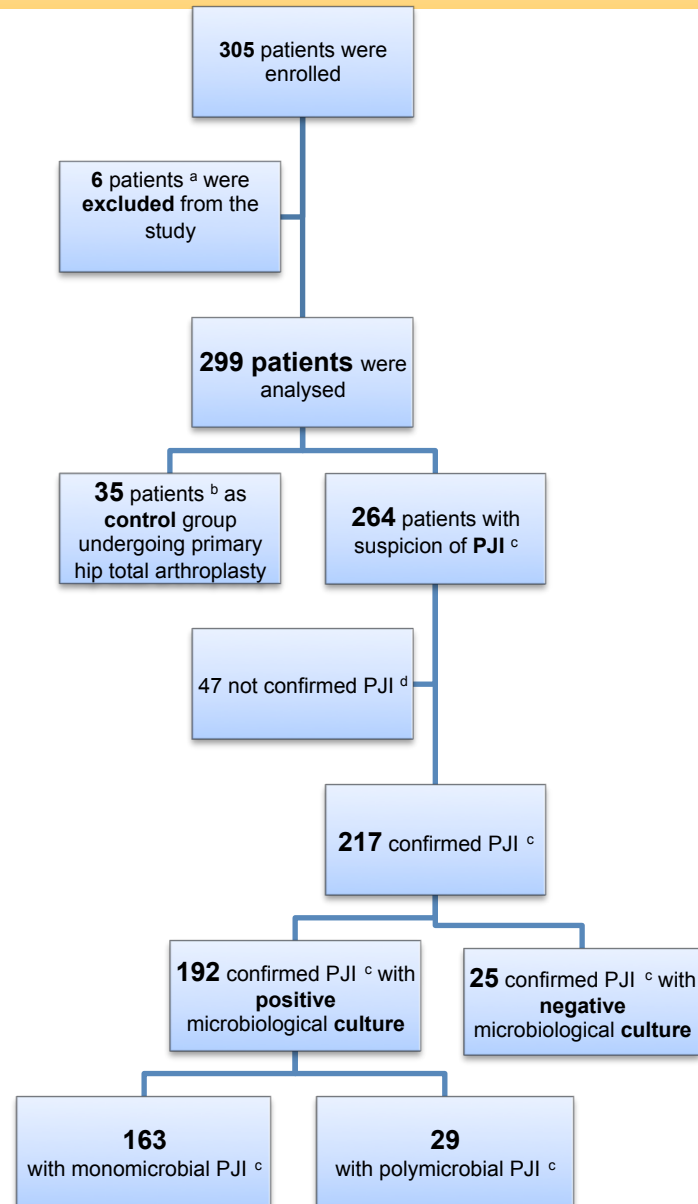


Table 1. Characteristics of the 299 patients

Variable	Controls n=35	Suspicion of PJI n=264
Age, median years [interquartile range]	70 [63-77]	73 [63-79]
Male sex	23 (66)	127 (48)
Arthroplasty localization		
Hip	23 (66)	165 (63)
Knee	12 (34)	88 (33)
Shoulder	0	10 (4)
Elbow	0	1 (<1)
Presentation of infection		
Acute	0	50 (19)
Chronic	0	214 (81)
Antibiotherapy over the 15 days before surgery	0	76 (29)
Betalactams	0	44 (58)
Fluroquinolones	0	15 (20)
Other antibiotics	0	17 (22)

Critères cliniques et bactériologiques

→ Infection évidente ou probable : 208/264 (80%)

Critères clinique et bactériologique : 121

Critère bactériologique seul : 68

Critère clinique seul : 19

→ Infection bactériologiquement documentée 189/208 (91%)

Monomicrobienne : 84% (159/189)

Polymicrobienne : 16% (30/189)

Critères histologiques

ORIGINAL ARTICLE

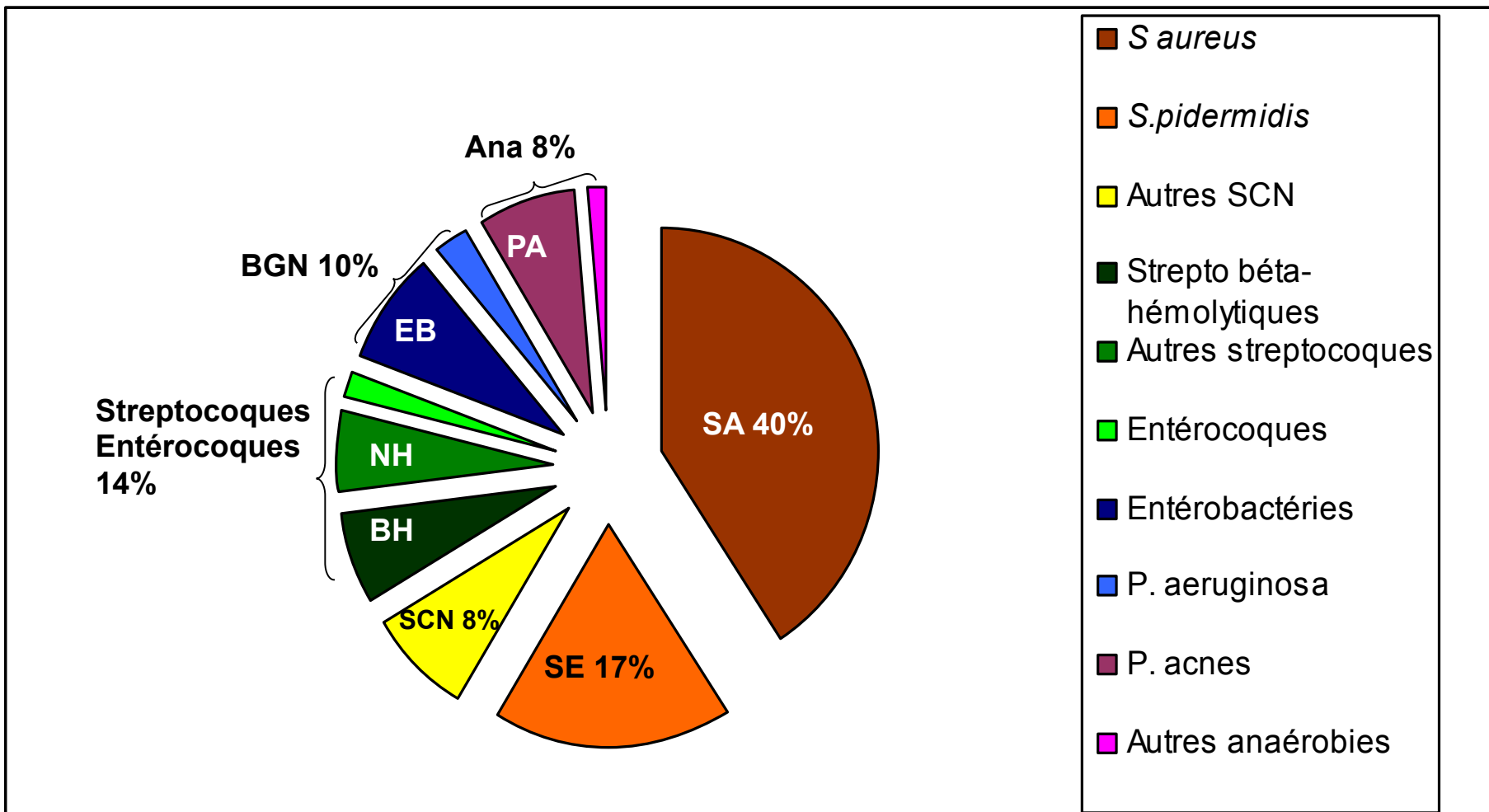
Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane

L Morawietz, R-A Classen, J H Schröder, C Dynybil, C Perka, A Skwara, J Neidel, T Gehrke, L Frommelt, T Hansen, M Otto, B Barden, T Aigner, P Stiehl, T Schubert, C Meyer-Scholten, A König, P Ströbel, C P Rader, S Kirschner, F Lintner, W Rütther, I Bos, C Hendrich, J Kriegsmann, V Krenn

.....
J Clin Pathol 2006;**59**:591–597. doi: 10.1136/jcp.2005.027458

- Type I : détection de particules de corps étrangers; macrophages et des cellules géantes multinucléées occupant au moins 20% de la superficie
- Type II : le type infectieux (tissu de granulation avec granulocytes neutrophiles, les cellules plasmatiques et des particules d'usure
- Type III : type combiné (aspects de type I et de type II se produisent simultanément)
- Type IV : type indéterminé (ni les critères de type I ni de type II ne sont remplis).

Répartition des bactéries dans les IP monomicrobiennes



Conclusions

- Le broyage permet d'améliorer le diagnostic bactériologique.
- L'incubation des cultures en milieu liquide dans des automates d'hémoculture permet de prolonger la durée d'incubation des prélèvements et d'éviter les repiquages terminaux.
- L'histologie peut être utile au diagnostic
- Les tests moléculaires peuvent être utilisés en seconde intention si les cultures restent stériles
(Sensitivity 67.6% [60.1-74.5], specificity 93.6% [82.5-98.7])

MicrobiOs 1

*Premier contrôle qualité externe
multicentrique*

*évaluant la technique de la PCR 16S
dans le diagnostic des infections ostéo-
articulaires.*

PCR « universelle » : ADNr16s



- Résultats disparates dans la littérature :

Sensibilité 50 à 92%, spécificité 65 à 94%

- ❑ Variabilité des traitements pré-analytique
- ❑ Variabilité des amorces choisies
- ❑ Pas d'homogénéité dans les techniques de cultures prises comme comparateur

- Evaluation difficile

- ❑ Etudes souvent monocentriques avec de petits effectifs
- ❑ Grande difficulté de standardisation de la technique

Dans 7 laboratoires harmonisation :

- ❑ Du pré-traitement des prélèvements (broyeur automatique)
- ❑ Des méthodes de culture
- ❑ Du prétraitement (lyse/PK 3H) avant l'extraction pour la PCR
- ❑ Des amorces utilisées (=690 pb fin du gène 16S rDNA)

Mais 7 laboratoires et presque autant de réactifs d'extraction et de PCR de thermocycleurs différents :

Laboratory	Extraction	Premix	Thermocyclers
1	Manual , Qiagen®	Sybr ExTaq, Takara®	MX 3000, Stratagene ®
2	Manual , Qiagen®	qPCR MM, Promega®	LightCycler 2.0, Roche®
3	Automated, Invitrogen®	Sybr ExTaq, Takara®	MX 3000p, Agilent technology®
4	Automated, Biomérieux®	Sybr Green MM, Applied®	ABI 7900, Applied®
5	Automated, Roche®	Sybr ExTaq, Takara®	Smart Cyler, Cepheid®
6	Manual , Qiagen®	Sybr Green MM, Applied®	StepOne plus, Applied®
7	Manual , Qiagen®	iQ sybr Green supermix, Biorad®	Chromo4, Biorad®

PHRC MICROBIOS : le Contrôle Qualité

3 séries de contrôles qualité (avant/ au milieu/ fin des inclusions)
envoyées à chacun des 7 laboratoires

Chaque série = 8 CQ

- 4 extraits d'ADN de souche bactérienne

- 4 prélèvements broyés à traité comme pour les échantillons cliniques

168 CQ envoyés

160 réponses analysées

Conclusions

- Les 7 centres ont validés leur participation au PHRC
- Les réunions après chaque série de CQ nous ont permis de bien définir les règles d'interprétation
- La PCR 16S est réalisable sur des prélèvements ostéo-articulaire
- **Résultats homogènes** dans des laboratoires utilisant des matériels différents

MicrobiOs 2

*Intérêt des PCR spécifiques
dans les IOAP : cohorte MICROBIOS 1*

MICROBIOS 2 : Intérêt des PCR spécifiques dans les IOAP : cohorte MICROBIOS



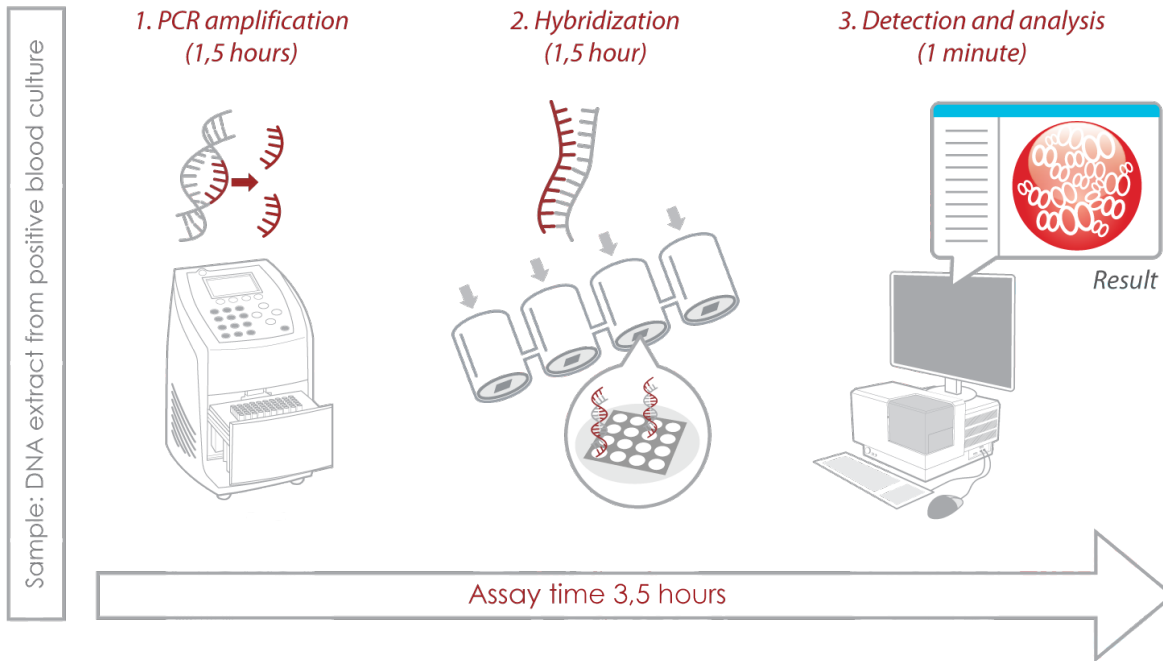
- ❑ **Contexte : PCR spécifiques ciblant les pathogènes principaux**
 - ☞ PCR 16S : technique délicate et coûteuse (MICROBIOS 1)
 - ☞ PCR ciblant les pathogènes principaux : alternative moins coûteuse et plus rapide

- ❑ **Buts de l'étude**
 - ☞ Intérêt diagnostique des PCR spécifiques dans les IOAP (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *mecA* et *P. acnes*) ou système MOBIDIAG **Prove-it™ Bone&Joint** assay)
 - ☞ Aide à la thérapeutique des IOAP grâce à la détection rapide au rang d'espèces

MICROBIOS 2 : Intérêt des PCR spécifiques dans les IOAP : cohorte MICROBIOS

Système MOBIDIAG Prove-it™ Bone&Joint assay)

- Principe : amplification de l'ADN (extrait de biopsies osseuses, tissus, ou fluide synovial) suivie d'une identification sur une puce à ADN avec des sondes uniques de capture d'ADN.
 Détection de **60 bactéries** + gènes *mecA*, *vanA* et *vanB*
- Test évalué dans un essai clinique multicentrique de plus de 200 patients (sensibilité 91%; une spécificité 90% par rapport à la culture de routine et les méthodes de PCR ADNr 16S).
 Temps de dosage: 3,5 heures à partir d'ADN extrait.
- Interprétation des résultats: détection automatique et analyse informatique



MICROBIOS 2 : Intérêt des PCR spécifiques dans les IOAP : cohorte MICROBIOS



- ❑ **Matériels et méthodes issus de MICROBIOS 1**
 - ☞ 1494 prélèvements documentés sur le plan clinique et microbiologique
 - ☞ 299 patients suspects d'IOAP et 35 témoins

- ❑ **Résultats attendus**
 - ☞ Proposer un arbre décisionnel en hiérarchisant la réalisation des différentes PCR spécifiques et de la PCR 16S rDNA dans les IOAP