



JNI 15^{es} Journées
Nationales
d'Infectiologie

Bordeaux
et l'interrégion Aquitaine § Limousin



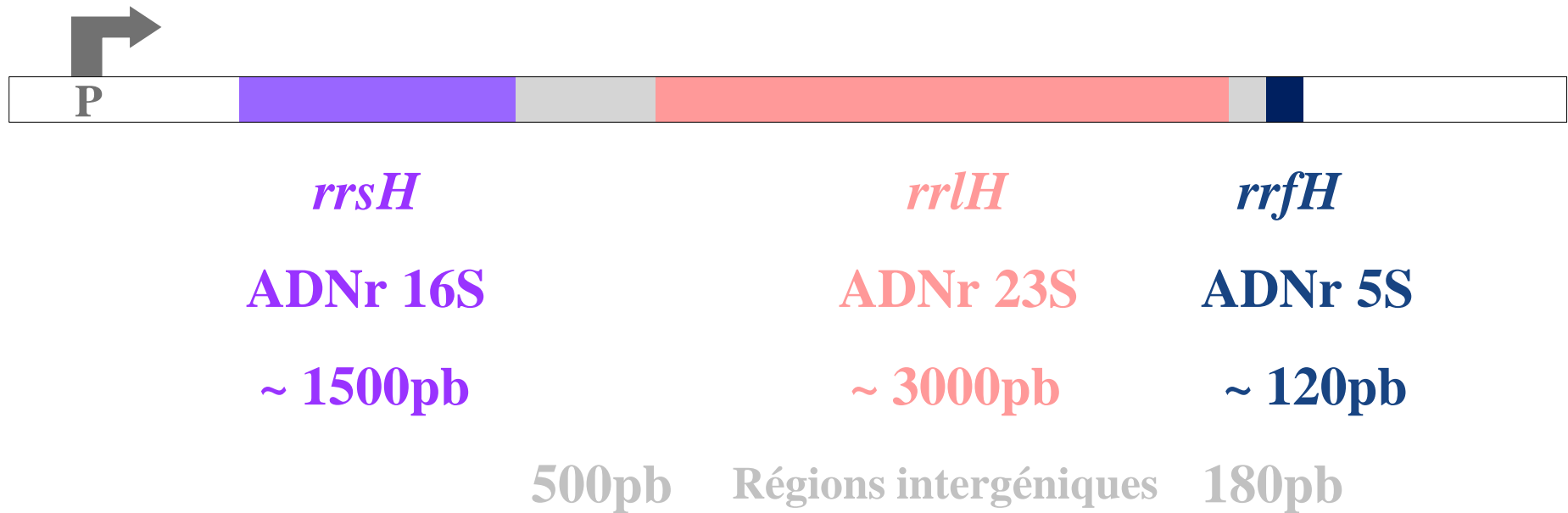
du mercredi 11 au vendredi 13 juin 2014
Palais des Congrès de Bordeaux

PCR universelle ADNr16S : limites et indications

Isabelle Podglajen
Hôpital Européen Georges Pompidou



Organisation de l'opéron codant pour les ARN ribosomiaux

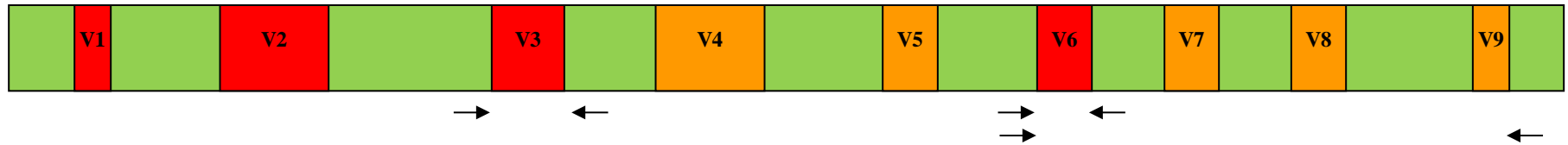


Nombre de copies d'opéron codant pour les ARN ribosomiques

Espèce	nb	Espèce	nb
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	1	<i>Legionella pneumophila</i>	3
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		<i>Propionibacterium acnes</i>	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>			
<i>Tropheryma whipplei</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	4
<i>Rickettsia conorii</i>		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Coxiella burnetii</i>		<i>Streptococcus sanguinis</i>	
<i>Bartonella henselae</i>	2	<i>Staphylococcus aureus</i>	5
<i>Bartonella quintana</i>			
<i>Chlamydia trachomatis</i>		<i>Haemophilus influenzae</i>	6
<i>Helicobacter pylori</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Ureaplasma urealyticum</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>	
<i>Treponema pallidum</i>			
<i>Brucella melitensis</i> (chr 1)	2	<i>Escherichia coli</i>	7
<i>Brucella melitensis</i> (chr 2)	1	<i>Salmonella Typhimurium</i>	
		<i>Streptococcus agalactiae</i>	

Alternances des séquences conservées et variables des gènes ADNr 16S

rrs



: régions conservées parmi les procaryotes



: régions variables ou hypervariables (V1 à V9)



: régions les plus discriminantes pour l'identification d'espèce



: amorces universelles

Analyse des séquences nucléotidiques des fragments d'ADNr 16S amplifiés

- Analyse critique des séquences
- Comparaisons des séquences avec les données des banques de séquences :
 - BiBi Database
 - Ribosomal Database Project (release 11)
 - SepsiTest Blast (Molzym)

Homologie de séquence ADNr 16S > 98 %

- Gènes complémentaires : *sodA*, *rpoB*, *gyrB*, *hsp65*, ADNr23S, ...

Les limites (1)

- **Manque de standardisation ; technologies locales**
- **Absence de données sur la résistance acquise**
- **Délai de rendu > 2 jours (/ PCR spécifique)**
- **Sensibilité variable (/ PCR spécifique voir culture)**
 - ⇨ Espèce bactérienne présente dans l'échantillon (nombre de copies d'opéron ADN_r)
 - ⇨ Répartition des bactéries dans l'échantillon (tissus) ; Quantité/Volume de l'échantillon ; Conservation et Transport
 - ⇨ Technique : extraction, taille des fragments d'ADN_r 16S amplifiés, ...

Seuil détection ; diagnostic des méningites bactériennes

Schuurman, 2004 ³⁹	0-88 y	<p>Internal amplification control for inhibition</p> <p>Extraction: bead beating, silica guanidinium thiocyanate</p> <p>Universal 16S primers 27F,1492R</p> <p>Amplified segment: 1,500 bp</p> <p>Agarose gel electrophoresis</p> <p>Uracil-N-glycosylase system to prevent amplicon contamination</p>	Yes; sequencing (Applied Biosystems, BLAST, RDP-II) ^{†(†§ **)}	<p><i>E coli</i>: 1×10²</p> <p><i>S aureus</i>: 2×10²</p>
Poppert, 2005 ³⁷	N/A*	<p>Internal amplification control for inhibition</p> <p>Extraction: QIAamp mini kit (QIAGEN)</p> <p>Universal 16S primers RW01, DG74</p> <p>Amplified segment: 360-380 bp</p> <p>Real-time PCR (Light Cycler; SYBR green)</p>	Yes; specific hybridization probe Light Cycler assays; sequencing (Applied Biosystems, BLAST) ^{†(††††55)}	<p><i>N meningitidis</i>: <2.5×10¹</p> <p><i>S epidermidis</i>: <2.5×10¹</p>
Xu, 2005 ⁴¹	N/A*	<p>Extraction: boiling; alkali lysis; High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche); QIAamp blood kit (QIAGEN); OmniPrep kit (G Biosciences)</p> <p>Universal 16S primers P11P, P13P</p> <p>Amplified segment: 216 bp</p> <p>Agarose gel electrophoresis</p>	Yes; sequencing (Applied Biosystems, BLAST) ^{†(†§ **††††††††)}	<p>Boiling:</p> <p><i>S aureus</i>: 1.5×10⁴</p> <p><i>E coli</i>: 2.8×10³</p> <p><i>C jejuni</i>: 3.4×10²</p> <p>QIAamp kit:</p> <p><i>S aureus</i>: 7.6×10²</p> <p><i>E coli</i>: 1.1×10³</p> <p><i>C jejuni</i>: 1.4×10²</p>
Chakrabarti, 2009 ²³	0-14 y	<p>Extraction: boiling</p> <p>Seminested PCR</p> <p>Universal 16S primers u3, ru8</p> <p>Amplified segment: 1,000 bp</p> <p>Three species-specific primers</p> <p>Agarose gel electrophoresis</p>	Yes; 3 species of bacteria identified by species-specific primers ^{†()}	<p><i>E coli</i>: 1×10³</p> <p><i>S pneumoniae</i>: 4×10³</p>
Rothman, 2010 ⁴³	N/A*	<p>Extraction: lysis and ultrafiltration</p> <p>Universal 16S primers p891F, p1033R</p> <p>Amplified segment: 161 bp</p> <p>Real-time PCR (TaqMan universal fluorescent probe)</p> <p>Turnaround time: 3 h</p>	Yes; 7 species of bacteria identified by species-specific probes and Gram-typing probes ^{†(†§ ***)}	<p><i>S pneumoniae</i>: 70</p> <p><i>S aureus</i>: 50</p> <p><i>L monocytogenes</i>: 110</p> <p><i>N meningitidis</i>: 20</p> <p><i>H influenzae</i>: 10</p> <p><i>E coli</i>: 30</p> <p><i>S epidermidis</i>: 10</p>

Les limites (2)

➤ Faux positifs

- ⇐ Contamination (peau ; environnement ; réactifs)
 - ➔ Difficulté d'interprétation de la présence d'un ADN correspondant à un germe commensal ou environnemental
 - ➔ x nombre d'échantillons techniqués
- ⇐ Persistance de l'ADN

**ADN ≠ Témoin infection active (aigüe/chronique)
(pas le témoin de cellules viables)**

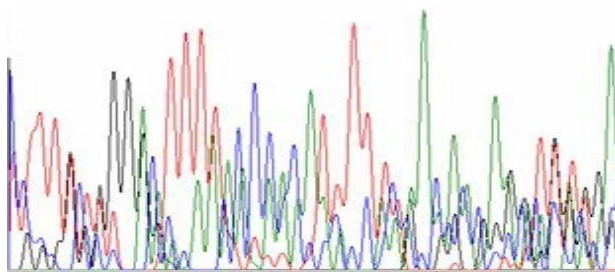
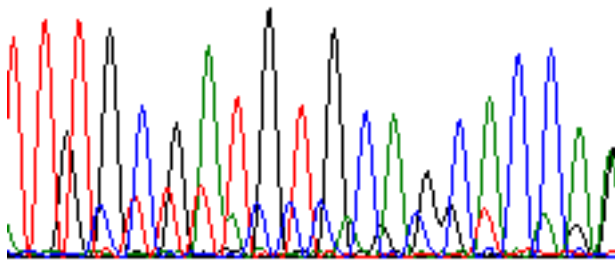
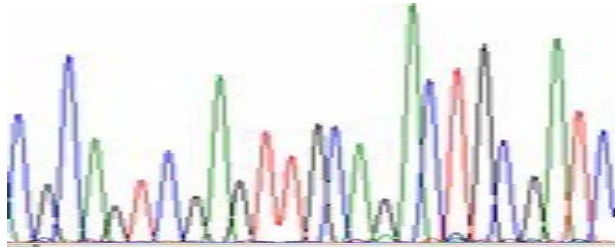
**Confronter avec les résultats anatomopathologiques,
cytologiques,
Biologie, Clinique**

Persistance de l'ADN bactérien

Cas/âge/sexe	Bactérie	Valve impliquée	Délai entre le diagnostic et la chirurgie
1/55/M	<i>S. pneumoniae</i>	aortique, bioprothèse	7 ans
2/69/F	<i>S. bovis</i>	aortique, native	167 jours
3/80/M	<i>S. bovis</i>	mitrale, native	730 jours
4/39/M	<i>E. faecium</i>	aortique, bioprothèse	850 jours
5/36/M	<i>S. gordonii</i>	aortique, native	45 jours
6/33/M	<i>B. quintana</i>	aortique, homogreffe	224 jours
7/70/F	<i>S. sanguinis</i>	mitrale, bioprothèse	545 jours

Les limites (3)

➤ Prélèvements plurimicrobiens



- Interpréter en fonction de la nature de l'échantillon
- Amorces de séquençage pour les bactéries à Gram + et Gram –
- Clonage
- NGS

Culture conventionnelle vs PCR ADNr 16S

Culture conventionnelle

P. intermedia, *B. fragilis*,
B. thetaiotaomicron

S. aureus, *A. odontolyticus*

E. faecium

S. epidermidis

VGS, *G. morbillorum*, *P. denticola*

F. magna

E. coli

Lactobacillus spp., VGS

S. aureus, *E. faecium* (n = 3)

PCR ADNr 16S

Mixed sequence

P. oralis

F. necrophorum

P. endodontalis

Mixed sequence

Lactobacillus spp.

S. aureus (n = 3)

NGS sur ADNr 16S dans les abcès cérébraux

Loc/size (mm) ^c	Risk factor ^d	Ion Torrent identification ^e	Sanger sequencing ^h	Culture ^h
F/21	Dental	<i>Actinomyces meyeri</i>	+	+
		<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	+	+
		<i>Campylobacter gracilis</i>	+	
		<i>Campylobacter rectus</i>		
		<i>Eikenella corrodens</i>	+	
		<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+	+
		<i>Parvimonas</i> sp. HOT-110	+	
F/46	Dental Sinusitis	<i>Actinomyces georgiae</i>		
		<i>A. meyeri</i>	+	
		<i>A. aphrophilus</i>	+	
		<i>C. gracilis</i>		
		<i>Eubacterium brachy</i>	+	
		<i>Fusobacterium</i> sp. HOT-203 ^f		
		<i>Parvimonas micra</i>		
		<i>Parvimonas</i> sp. HOT-D94	+	
F/58	Endocarditis Tonsillectomy 5 wk before	<i>Streptococcus intermedius</i>		+
		<i>C. rectus</i>	+	
		<i>Fusobacterium</i> sp. HOT-203	+	
		<i>P. micra</i>		
		<i>Prevotella nigrescens</i>		
T/26	Mastoiditis	<i>S. intermedius</i>	+	+
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	-

NGS sur ADNr 16S dans les LBA de patients hospitalisés en Réanimation

Culture

NGS

7	Respiratory tract flora (25,000)	<i>Prevotella</i> spp. (3.3) <i>Klebsiella</i> spp. (35.2) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (28.8)
8	<i>Enterobacter cloacae</i> (100,000) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (20,000)	<i>Methylobacterium</i> spp. (8.97) <i>Staphylococcus aureus</i> (7.6)
9	→ <i>Klebsiella pneumoniae</i> (100,000) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (100,000)	<i>Haemophilus influenzae</i> (42.2) <i>Haemophilus</i> spp. (32.7)
10	<i>Staphylococcus aureus</i> (7,000)	<i>Haemophilus influenzae</i> (17.9) <i>Haemophilus</i> spp. (14.5)
11	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (50,000) <i>Haemophilus influenzae</i> (100,000)	<i>Staphylococcus aureus</i> (13.5) <i>Ruminococcus</i> spp. (7.5)
13	<i>Enterobacter aerogenes</i> (100,000)	<i>Haemophilus influenzae</i> (39.2) <i>Haemophilus</i> spp. (26.9)
14	None	<i>Mycoplasma</i> spp. (69.0) <i>Klebsiella</i> spp. (9.5)
15	→ <i>Staphylococcus aureus</i> (50,000)	<i>Pseudomonas</i> spp. (91.6) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (6.4)

Indications générales de la PCR ADNr16S (1)

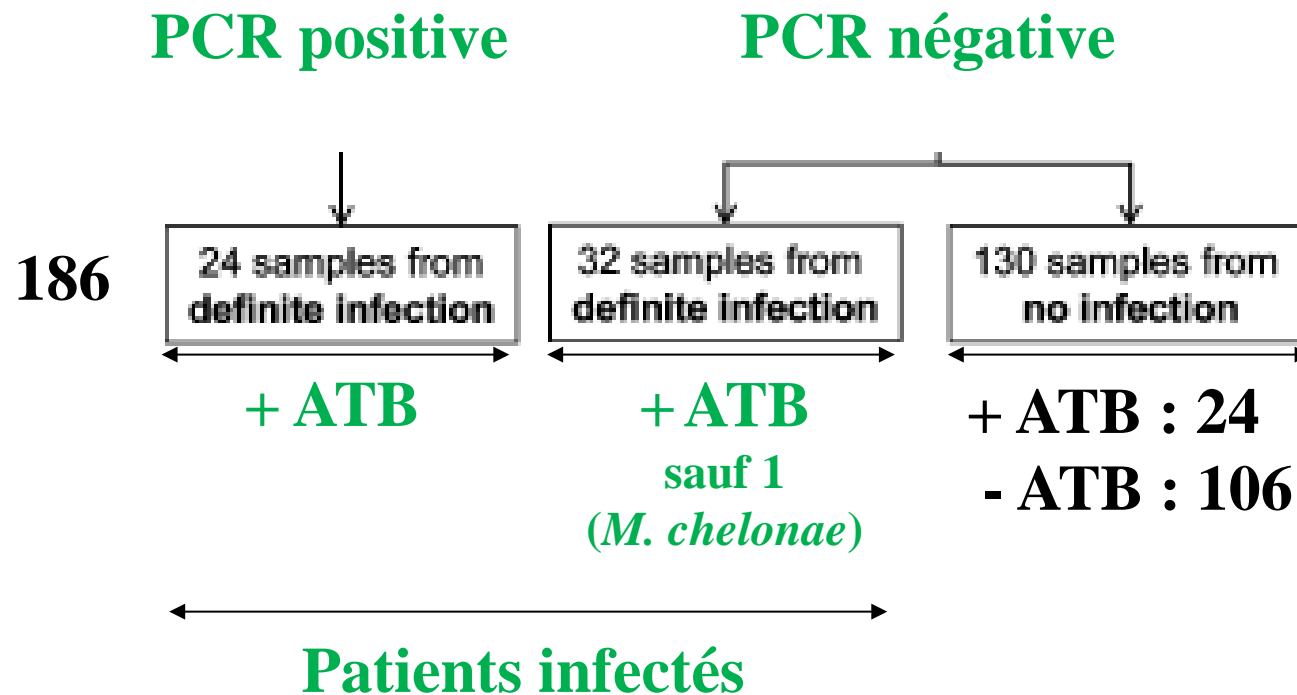
- **Forte suspicion clinique et biologique d'infection (+/- imagerie)**
 - Si patient sous ATBthérapie préalable au recueil de l'échantillon
 - Si patient sans ATBthérapie préalable et cultures négatives des échantillons recueillis
 - Germes de cultures difficiles ; voir PCR spécifiques
- ⇐ Biopsies, échantillons de tissus et liquides d'aspiration provenant de sites normalement stériles
- ⇐ Discussion microbiologiste/clinicien
- ⇐ 0,1% du total des échantillons et taux de positivité de 17% (Cherkaoui et Schrenzel, 2009)

Comparaison PCR ADNr16S et culture conventionnelle

		Culture	
		+	-
PCR	+	86 (21.8%)	18 (4.6%)
	-	19 (4.8%)	271 (68.8%)

- 90% de concordance sur 394 échantillons provenant de sites normalement stériles
- ~ 5% de discordance dans les 2 sens
 - ❖ 5/18 PCR non prises en compte

Analyse par PCR ADN_r16S de 186 échantillons culture négative en 72H



PCR ADNr16S (culture -), sensibilité, spécificité, VPP, VPN

➤ Patients culture - (n=186)

Sensibilité : 42.9 % VPP : 100 %

Spécificité : 100 % VPN : 80.2 %

➤ Patients sous antibiothérapie ; culture + (n=79)

Sensibilité : 43,6 % VPP : 100%

Spécificité : 100 % VPN : 43,6 %

Impact de la durée de l'antibiothérapie

Clinical specimen	Bacteria observed by microscopy (+, ++, +++ ^a)	Leukocytes observed by microscopy (+, ++, +++ ^b)	Bacterial species identified by 16S rRNA gene PCR	Days after end of antibiotic therapy/days undergoing antibiotic therapy ^c
1 Aortic valve	nd	+	<i>Streptococcus mutans</i>	0/32
2 Mitral valve	nd	++	<i>Enterococcus faecalis</i>	0/54
3 Deep wound (swab)	++ (Gram-positive cocci)	+++	<i>Parvimonas micra</i>	0/1
4 Cerebrospinal fluid	++ (Gram-positive cocci)	+++	<i>Staphylococcus aureus</i>	0/2
5 Sternal wound (swab)	nd	+++	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0/3
6 Cerebrospinal fluid	+++	nd	<i>S. epidermidis</i>	0/16
7 Mitral valve	nd	+	<i>S. aureus</i>	0/48
8 Abscess (brain) ^d	nd	nd	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Porphyromonas endodontalis</i>	0/7
9 Abscess (brain) ^d	nd	nd	<i>P. endodontalis</i>	0/7
10 Aspirate (shoulder)	nd	+++	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	20/39
11 Abscess (brain)	+(Gram-positive cocci)	+++	<i>Streptococcus intermedius</i>	0/12
12 Aortic valve	+++ (Gram-positive cocci)	+	<i>Streptococcus</i> sp (<i>Streptococcus mitis</i> group)	0/2
13 Pleural effusion	nd	+++	<i>P. endodontalis</i>	0/28
14 Sternal wound (swab)	nd	+	<i>S. epidermidis</i>	0/49
15 Aspirate (knee)	nd	+++	Enterobacteriaceae	0/5
16 Tissue	nd	+++	<i>S. aureus</i>	0/3
17 Tissue	nd	+++	<i>S. aureus</i>	0/3
18 Abscess (psoas muscle)	nd	++	<i>Coxiella burnetii</i>	0/1
19 Tissue (aneurysma)	nd	+	<i>C. burnetii</i>	0/7
20 Aortic valve	nd	+++	<i>Streptococcus</i> sp. (<i>S. mitis</i> group)	21/42
21 Mitral valve	nd	+	<i>S. mitis</i>	0/25
22 Sternal wound (swab)	nd	+	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	0/4
23 Sternal wound (swab)	nd	+	<i>U. urealyticum</i>	0/4
24 Sternal wound (swab)	nd	++	<i>U. urealyticum</i>	0/4

Les indications de la PCR ADNr16S (2)

- **Endocardites à hémocultures négatives (+ 70%)**
 - ❖ PCR *Coxiella* ; PCR *Bartonella* ; (PCR *T. whipplei*)
- **Péricardites**
 - ❖ Contexte d'un bilan complet (viral, ..., PCR spécifiques)
- **Empyèmes pleuraux**
 - PCR *S. pneumoniae* ; PCR *S. aureus* ; (PCR *Streptococcus*, PCR *H. influenzae*)
- **Infections ostéoarticulaires (+ 20%)**
 - ❖ PCR *Kingella* (enfants) ; *S. aureus* ; (PCR *Listeria* si prothèse et ID)
- **Spondylodiscites**
 - ❖ PCR *Brucella* ; (PCR Mycobactéries ?)
- **Endophtalmies (+ 20% Id germe sur liq vitrée ; + 72% si ATB)**
 - ❖ PCR universelle fongique

Endocardites sur valves natives à hémocultures négatives (33)

Type d'EI (critères de Duke)	Diagnostic moléculaire +	Signes histologiques typiques ou compatibles
Certaine, 11	11	11
	<i>S. epidermidis, C. jeikeium, S. suis, S. mitis, S. gallolyticus, S. pneumoniae, B. quintana (2), T. denticola, C. burnetii, T. whipplei</i>	
Probable, 17	5	5 (1 PCR -)
	<i>H. parainfluenzae, B. quintana (2), C. burnetii, M. morgani (Histo -)</i>	
Rejetées, 5	1	0
	<i>S. mitis</i>	

Services de Chirurgie Cardiaque (Pr Gandjbakhch) : Dr Jault ;
 de Réanimation Médicale (Pr Gibert) : Pr Chastre ;
 de Microbiologie (Pr Jarlier) : Dr Aubry et Dr Veziris ;
 d'Anatomo-Pathologie (Pr Capron) : Dr Delcourt

78 empyèmes pleuraux (enfants)

Espèce	Culture +	Culture – et PCR ADNr 16S +
<i>S. pneumoniae</i>	23 (1/+Hin, 1/+Pae, 1/+Sau)	17 (Confirmé par PCR spécifique)
<i>S. pyogenes</i>	4	3
<i>S. aureus</i>	5	1
<i>H. influenzae</i>	1	1
<i>E. coli</i>	1	0
<i>A. baumannii</i>	1	0
Polymicrobien	3	0
	38	22

Emphyèmes pleuraux (25 enfants)

Comparaison PCR spécifiques, PCR ADNr 16S et culture

Bacteria	Species-specific PCR	16S rRNA PCR	Pleural fluid culture	Blood culture
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	14	3	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ^a	3	0	1	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	0	0	0
<i>Streptococcus species</i> ^b	5	0	2 ^c	0
<i>Haemophilus influenzae</i> ^d	1	0	0	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Not Done	0	1	0
Polymicrobial ^e	2	0	0	0
Any Pathogen	22 (88%)	3 (12%)	5 (20%)	1 (4%)

^a 2 MSSA/1 MRSA by species-specific PCR, 1 MRSA by culture of pleural fluid

^b Streptococcal species included for primer design of the "Streptococcus species" assay were: *S. pneumoniae*, *S. parasanguinis*, *S. anginosus*, *S. salivarius*, *S. pyogenes*, *S. uberis*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. equinus*, *S. gordonii*, *S. gallolyticus*

^c both *S. intermedius* (*S. milleri* group)

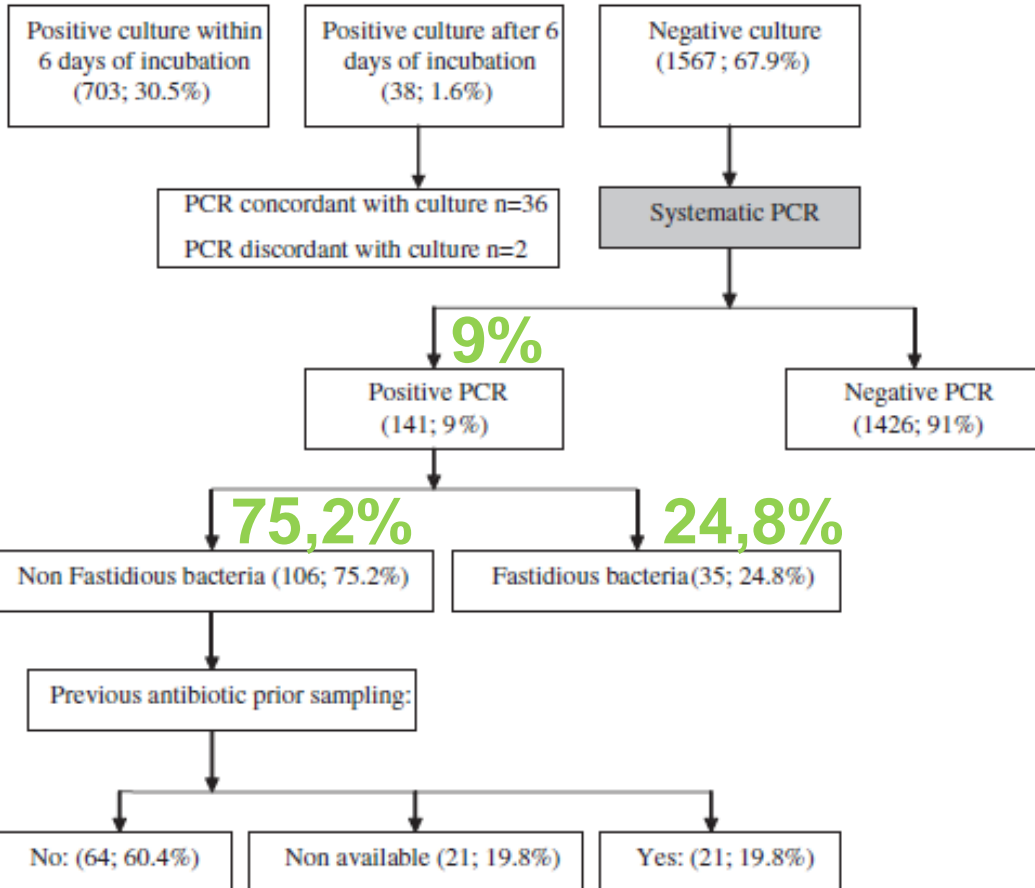
^d non-typeable

^e *S. pneumoniae* and *S. aureus* (n=1); *S. pneumoniae* and Streptococcus species (n=1)

ADNr 16S et infections ostéoarticulaires

Patients with suspected osteoarticular infection; n=2308

30,5% 1,6% 67,9%



Fastidious bacteria :

- 14 anaerobes (8 *F. magna*, 1 *P. micra*, 1 *P. acnes*, 2 *B. fragilis*, 1 *F. nucleatum*, 1 *Prevotella* sp.)
- 11 *K. kingae* (confirmed by species-specific PCR)
- 2 *G. adjacens*, 1 *A. defectiva*
- 1 *Gemella* sp.
- 1 *B. melitensis*,
- 1 *Arthrobacter* sp.
- 1 *Paracoccus yeei*
- 1 *U. urealyticum*,
- 1 *N. gonorrhoeae*
- 1 *Lactobacillus iners*

Non Fastidious bacteria :

- 35 *S. aureus* (2/3 **que par PCR spécifique**)
- 30 SCN (26 *epidermidis*, 1 *capitis*, 1 *lugdunensis*, 1 *cohnii*, 1 *haemolyticus*)
- 19 *Streptococcus* sp. (6 *agalactiae*, 2 *pyogenes*, 10 *oralis/mitis*, 1 *pneumoniae*)
- 9 *P. aeruginosa*
- 7 *Enterobacteriaceae* (4 *E. coli*, 1 *E. cloacae*, 1 *E. aerogenes*, 1 *M. organii*)
- 4 *E. faecalis*
- 1 *Corynebacterium striatum*
- 1 *A. baumannii*.

*Levy et al.,
Pediatr. The Am. J. Med. 2013*

PCR ADNr 16S sur :

- LCR
- Prélèvements pulmonaires

- Bile
- Ascite
- Urines

- Sang

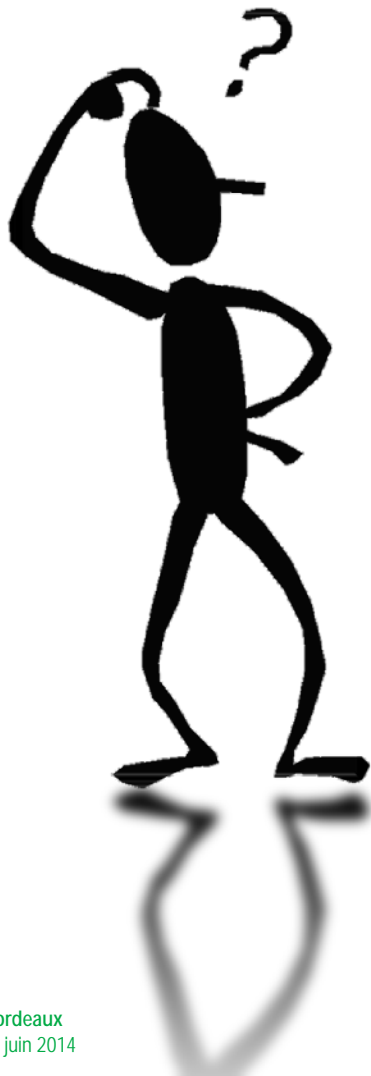
Bof Bof Bof

Messages à emporter

- **NON à : « Je veux éliminer une cause infectieuse »**
- **Justification de la demande / Culture ; PCR spécifiques**
- **Fait partie d'une stratégie globale de diagnostic en particulier en l'absence de données de bactériologie conventionnelle**
- **Echantillons : quantité, non contaminé, représentativité, contenant, conservation**
- **Comparer avec résultats d'anapath, sérologie, ...**
- **Résultats à confronter avec le clinicien**
- **Secteur spécialisé / coût / Résistance naturelle**



Une question ?



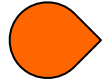


Déclaration de liens d'intérêt avec les industries de santé en rapport avec le thème de la présentation (loi du 04/03/2002) :

Intervenant : Podglajen/Isabelle

Titre : PCR universelle ADNr16S : limites et indications

L'orateur ne souhaite pas répondre

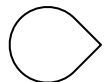


Consultant ou membre d'un conseil scientifique

OUI



NON

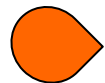


Conférencier ou auteur/rédacteur rémunéré d'articles ou documents

OUI



NON



Prise en charge de frais de voyage, d'hébergement ou d'inscription à des congrès ou autres manifestations



OUI

NON



Investigateur principal d'une recherche ou d'une étude clinique

OUI



NON

