

De rol van 16S rRNA gen PCR in de diagnose van gewrichtsprothese-infecties

Dorien Van den Bossche
ASO Klinische Biologie
05 mei 2015



De rol van 16S rRNA gen PCR in de diagnose van gewrichtsprothese-infecties

- Prosthetic Joint Infection (PJI)
Een overzicht van epidemiologie tot diagnostiek
- Question
“Wat is de waarde van 16S rRNA gen PCR en sequentie-analyse in de diagnose van gewrichtsprothese-infecties”
- Besluit

PJI- Epidemiologie

- Jaarlijkse stijging van het # gewrichtsprotheses
- Incidentie PJI:
 - PJI in 0,8-1,9% knieprotheses
 - PJI in 0,3-1,7% heupprotheses
- Risico op infectie = hoogst 1^{ste} twee jaar MAAR blijft bestaan gedurende hele levensduur prothese

PJI- Risicofactoren

- Bacteriële infecties
- Complicaties postoperatieve wondheling
- Maligniteiten
- Voorafgaande implantatie-infecties

PJI- Klinische presentatie

- ~ Virulentie causatieve verwekker
- ~ Besmettingsroute
- ~ Immunrespons gastheer
- ~ Betrokken gewricht

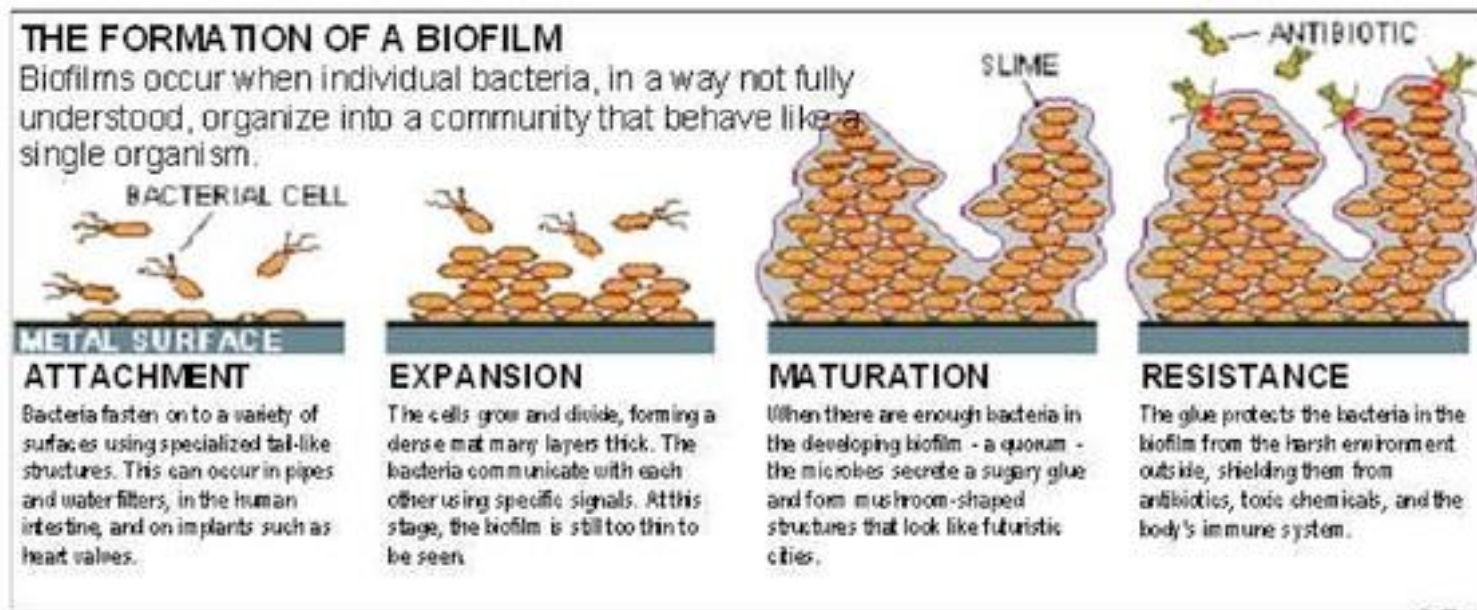
Mogelijke symptomen PJI:

Pijn, roodheid, zwelling, erythema, functieverlies,
en koorts

PJI- Classificatie

Type of PJI	Early	Delayed	Late
Tijdstip na implantatie	< 3 maanden	3 -12 maanden	>12-24 maanden
Besmetting	Tijdstip implantatie	Tijdstip implantatie	Hematogeen
Etiologische micro-organismen	Hoog virulente micro-organismen: <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus spp.</i> Gramnegatieve bacillen	Minder virulente micro-organismen: coagulase-negatieve stafylokokken, <i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>S. epidermidis</i> Gramnegatieve bacillen

PJI- Pathogenese



PJI-Definitie PJI

TABLE 3 Proposed definitions for prosthetic joint infection^a

Criterion	Definition of prosthetic joint infection					
	Musculoskeletal Infection Society		International consensus		Infectious Diseases Society of America	
	Definitive evidence	Supportive evidence	Definitive evidence	Supportive evidence	Definitive evidence	Supportive evidence
Sinus tract communicating with the prosthesis	x		x		x	
Identical microorganisms isolated from 2 or more cultures	x		x		x	
Purulence surrounding the prosthesis		x			x	
Acute inflammation upon histological examination of periprosthetic tissue		x		x		x
Single culture with any microorganism		x		x		
Single culture with a virulent microorganism						x
Elevated synovial fluid leukocyte count ^b		x		x		
Elevated synovial fluid neutrophil percentage		x		x		
Elevated serum ESR and CRP values		x		x		

^a The MSIS definition requires 4 supportive criteria; the International Consensus Meeting definition requires 3 supportive criteria. Data are from references 60, 61, and 251. ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein.

^b The International Consensus Meeting definition also includes a "++" result on the leukocyte esterase strip.

PJI-Diagnostiek

- Differentieel diagnose tussen PJI en aseptisch falen
→ ≠ behandelingsstrategieën
- Geen enkele test 100% accuraat voor diagnose PJI
- Diagnose op basis van:
 - Klinische gegevens
 - Biochemische laboratoriumdiagnostiek (ESR, CRP)
 - Histopathologie
 - Beeldvorming
 - Microbiologisch onderzoek

PJI - Microbiologische Diagnose

- Gramkleuring
 - Nuttige informatie
 - Sensitiviteit = LAAG (0-27%)
- Cultuur = hoeksteen in microbiologisch onderzoek
 - Identificatie etiologisch micro-organisme
 - Antibioqram
 - Adequate behandelingsstrategie

PJI - Microbiologische Diagnose

- Pre-operatieve evaluatie: arthrocentesis
- Intra-operatieve evaluatie: representatieve weefselstalen

Sensitiviteit cultuur weefselstalen = **VARIABEL** (65-94%)

- Concentratie bacteriën op oppervlak prothesemateriaal
- Bacteriën in de biofilm = vertraagde groeisnelheid
- Voorafgaande AB-therapie
- Niet-homogene verspreiding bacteriën in omliggende weefsels

PJI - Microbiologische Diagnose

Verhogen sensitiviteit cultuur d.m.v.:

- Afname 3-6 weefselstalen (IDSA-guidelines)
- Verlengde incubatieduur
- Nieuwe benaderingen:
 - Sonicatie prothesemateriaal
 - Bead mill
 - Opkomst moleculaire methoden

De rol van 16S rRNA gen PCR in de diagnose van gewrichtsprothese-infecties

- Prosthetic Joint Infection (PJI)
Een overzicht van epidemiologie tot diagnostiek
- Question
“Wat is de waarde van 16S rRNA gen PCR en sequentie-analyse in de diagnose van gewrichtsprothese-infecties”
- Besluit

Questions

“Wat is de waarde van 16S rRNA gen PCR en sequentie-analyse in de diagnose van gewrichtsprothese-infecties”

1. Is er een plaats voor **16S rRNA gen PCR** in de directe detectie van bacteriële pathogenen in klinische stalen?
2. Welke **pre-analytische factoren** moeten in acht worden genomen bij het uitvoeren van 16S rRNA gen PCR en sequentie-analyse?
3. Wat is de **diagnostische performantie** van 16S rRNA gen PCR en sequentie-analyse?
4. Heeft 16S rRNA gen PCR en sequentie-analyse een snellere **antwoordtijd** t.o.v. conventionele cultuur?
5. Wat is de **financiële impact** bij gebruik 16S rRNA gen PCR in de diagnose van PJI?

1. **16S rRNA gen PCR**

Moleculaire Diagnostiek

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Microarray

Single
target PCR

Multiplex
PCR

Broad-
range PCR

1. 16S rRNA gen PCR

- Eubacterieel 16S rRNA gen
= variabele + sterk geconserveerde fragmenten
- Frequent target in moleculaire diagnostiek

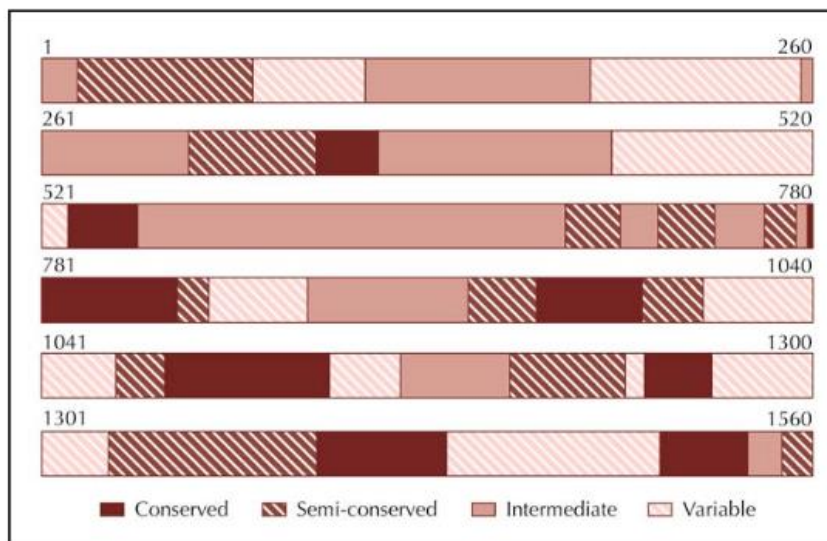
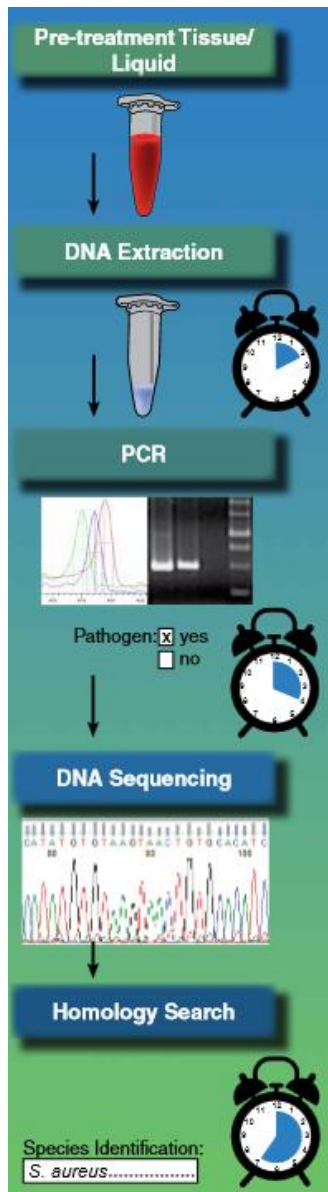


Figure 1. Schematic representation of conserved and variable regions in bacterial 16S ribosomal DNA (1560 bp) based on the alignment of DNA sequences from *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Abiotrophia*, *Listeria*, *Coxiella*, *Legionella*, *Bartonella*, *Brucella*, and *Francisella* spp. Level of homology: Conserved, ≥ 95% conserved; semi-conserved, 80%–94% conserved; intermediate, 20%–79% conserved; and variable, < 20% conserved. Nucleotide numbers are indicated at the horizontal bars at the ends of each stretch of sequence.

1. 16S rRNA gen PCR



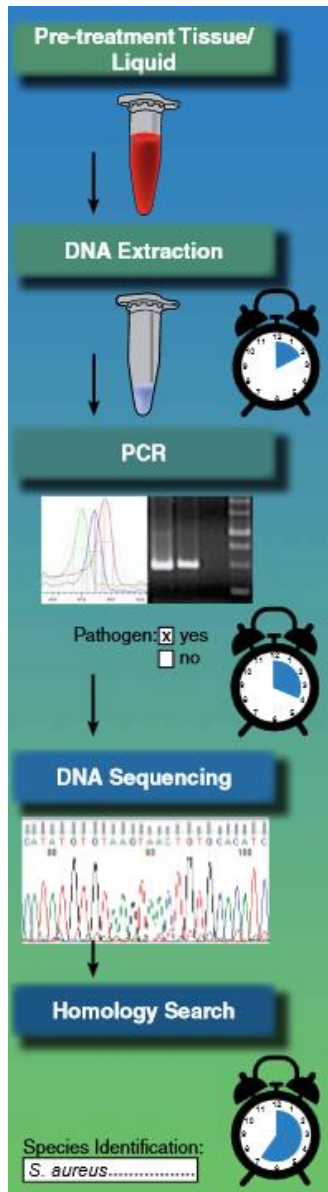
Voorbehandelingsstap met lysisbuffer/proteïnase

Extractie en purificatie bacterieel DNA uit klinisch staal

16S rRNA gen PCR

Sequentie-analyse
(Genbank + BLAST-algoritme)

1. 16S rRNA gen PCR



Aantal bronnen van onzekerheid

Aanwezigheid van Polymicrobiële infecties/ Persisterend Bacterieel DNA

Extractiemethode:
In house versus Commercieel

Keuze primersets

Publieke versus commerciële genbank

C
O
N
T
A
M
I
N
A
T
I
E
R
I
S
I
C
O

2. Pre-analytische factoren

- Aantal stalen?
 - Cultuur: 3 – 6 weefselbiopten (IDSA-guidelines)
 - PCR: ???
 - Marin et al. (2011):

TABLE 5 Probability of PJI considering results of culture or 16SPCR for 1 to 7 samples analyzed

Sensitivity								Specificity								LR							
Test and no. of positive samples	Probability for the following no. of samples analyzed:							Test and no. of positive samples	Probability for the following no. of samples analyzed:							Test and no. of samples	Probability for the following no. of samples analyzed:						
	1	2	3	4	5	6	7		1	2	3	4	5	6	7		1	2	3	4	5	6	7
Culture								Culture								Culture							
≥1	0.67	0.89	0.96	0.99	1	1	1	≥1	0.84	0.7056	0.5927	0.4979	0.4182	0.3513	0.2951	All negative	0.39	0.15	0.06	0.02	0.01	0	0
≥2		0.45	0.75	0.89	0.96	0.98	0.99	≥2		0.97	0.93	0.88	0.82	0.75	0.69	1 positive	4.19	1.65	0.65	0.25	0.1	0.04	0.02
≥3			0.3	0.6	0.8	0.9	0.96	≥3				0.986	0.968	0.944	0.913	2 positive		17.54	6.89	2.71	1.06	0.42	0.16
																≥3 positive			73.43	41.51	25.03	16.12	11.04
16S PCR								16S PCR								16S PCR							
≥1	0.64	0.87	0.95	0.98	0.99	1	1	≥1	0.98	0.97	0.95	0.93	0.92	0.9	0.89	All negative	0.37	0.13	0.05	0.02	0.01	0	0
≥2		0.41	0.7	0.86	0.94	0.97	0.99	≥2		1	1	1	1	1	0.99	1 positive	37.65	13.79	5.05	1.85	0.68	0.25	0.09
≥3			0.26	0.55	0.75	0.87	0.94	≥3			1	1	1	0.9999	0.9998	2 positive		1417.3	519.05	190.09	69.62	25.5	9.34
																≥3 positive			53,357.2	28,104.1	15,643.6	9,216.14	5,738.49

2. Pre-analytische factoren

- Type stalen?

- Ryu S. et al. (2014):

- Sensitiviteit PCR weefselstalen = 16%

- ↔ sensitiviteit cultuur weefselstalen = 69%

- Opmerkingen bij deze studie:

- Geen 16S rRNA gen PCR-analyse

- Afzonderlijke weefselstalen voor cultuur en PCR

- Analyse van kleine volumes met PCR

- Stalen enkel afkomstig van knieprotheses

- Qu X. et al (2013): weefselstalen → verbeterde sensitiviteit

2. Pre-analytische factoren

• Contaminatierisico?

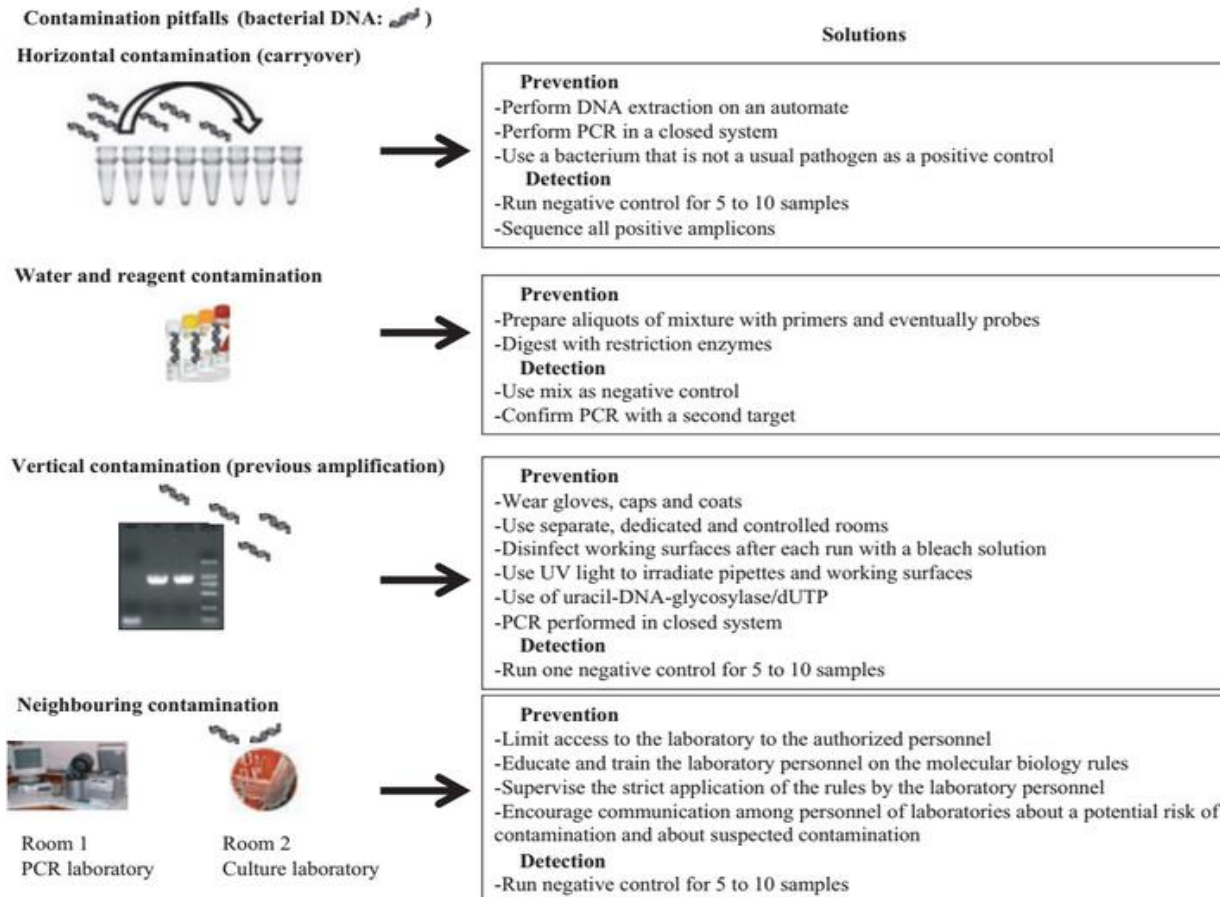


FIG. 1. The most frequent contamination pitfalls and the solutions for their prevention and detection.

3. Diagnostische performantie

- Geen enkele test 100% accuraat voor PJI-diagnose
 - Toegepaste definitie PJI
 - Type stalen
 - Studiedesign
 - Studiepopulatie
 - ≠ cutoff-waarden
 - Data analytische sensitiviteit 16S rRNA PCR in PJI-setting = BEPERKT
- Invloed op testkarakteristieken

3. Diagnostische performantie

- **Theorie**

16S rRNA PCR hogere klinische sensitiviteit + specificiteit

- **Praktijk**

PCR Hogere sensitiviteit, Lagere specificiteit t.ov. cultuur	PCR Lagere sensitiviteit t.o.v. cultuur
Panousis et al (2005)	Fihman et al (2005)
Vandercam et al (2008)	Fenollar et al (2006)
	De Man et al (2009)
	Marin et al (2011)
	Bjerkkan et al (2012)
	Rak et al (2013)

3. Diagnostische performantie

- PCR op gesoniceerde vloeistof prothesemateriaal
 - Gomez et al. (2012)
 - 16S rRNA gen PCR op sonicatievloeistof
 - N= 135 PJI en N= 231 aseptisch falen
 - Sensitiviteit PCR = 70,4%
 - Sensitiviteit cultuur = 72,6%
- Geen meerwaarde van PCR op sonicatievloeistof ten opzichte van cultuur

3. Diagnostische performantie

- Recente prospectieve multicenter studie (Bémer et al 2014)
 - Vooraf EKE in $\neq$ centra: reproduceerbare resultaten tss $\neq$ centra
 - 264 Patiënten met vermoeden PJI + 35 controle-patiënten
 - 5 weefselstalen/ patiënt: cultuur + 16S rRNA gen PCR-analyse
 - Bead Mill-procedure: homogeniseren weefselstalen
 - Resultaten:
 - PJI: geconfirmeerd 215 /264 vermoedelijke PJI-casussen,
 - 192 casussen bacteriologisch gedocumenteerd
 - 16S rRNA gen PCR-analyse: positief in 151/215 geconfirmeerde PJI-casussen + in 2/49 casussen waar PJI niet kon worden bevestigd
 - Sensitiviteit PCR = 73,3%; Specificiteit = 95,5%
 - **Conclusie:** Geen systematisch gebruik 16S rRNA gen PCR in diagnose bot- en gewrichtsinfecties

3. Diagnostische performantie

Algemene conclusie:

- Conclusies trekken over performantiekarakteristieken
= **Moeilijk**
 - Gebrek aan teststandaardisatie 16S rRNA gen PCR
 - ≠ Uitvoering van conventionele cultuur
 - ≠ Definitie PJI
 - ≠ #bestudeerde subjecten + ≠ staaltypes

3. Diagnostische performantie

- Systematisch gebruik 16S rRNA gen PCR w afgeraden:
 - Hoge kostprijs
 - $\neq$ studies tonen geen meerwaarde van PCR t.o.v. cultuur
- Restrictief gebruik in cultuur negatieve casussen bij vermoeden PJI (voorafgaandelijke AB-therapie)
 - Pre-analytiek + analytiek cultuur optimaal w uitgevoerd
 - Steeds uitvoeren complementair aan conventionele cultuur
 - Uitvoering AST met moleculaire diagnostiek niet mogelijk

4. **Antwoordtijd**

Finaal microbiologisch rapport cultuur 7-14 dagen

Moleculaire methoden resultaat max. 2 dagen

- PCR kortere antwoordtijd t.o.v. cultuur
- In praktijk: PCR enkel indien cultuur = negatief
- Resultaat PCR later beschikbaar t.o.v. cultuur

5. Financiële impact

- Kostenraming voor cultuur en PCR:
“detectie” + “identificatie” van micro-organismen
- Enkel kosten verbonden aan reagentia + personeel
- Aerobe cultuur diepe stalen = €9,74
- Aerobe cultuur wissers/ wondvochten = € 9,53
- 16S rRNA gen PCR-analyse:
 - UMDTM-kit (Molzym): €63/reactie (Staal + **Controles**)
 - PCR-product opzuiveren: € 2,64/test
 - Sequentie-analyse: €1,3/test
 - Personeelskost € 175/ingezette run
 - GEEN RIZIV-nomenclatuur

De rol van 16S rRNA gen PCR in de diagnose van gewrichtsprothese-infecties

- Prosthetic Joint Infection (PJI)
Een overzicht van epidemiologie tot diagnostiek
- Question
“Wat is de waarde van 16S rRNA gen PCR en sequentie-analyse in de diagnose van gewrichtsprothese-infecties”
- Besluit

Besluit

- Uiteenlopende waarden omtrent klinische sensitiviteit en specificiteit
- Ontbreken van teststandaardisatie
- Potentieel nut van PCR in diagnose PJI, maar restrictief gebruik wordt aangeraden
- Mogelijks indicatie bij patiënten met vermoeden PJI, intra-operatieve culturen = negatief, en onder (recente) AB-therapie

TO DO/ Actions

1. Opvolging van het gebruik van de Universal Microbe Detection™-kit bij vermoeden van infectie in cultuur negatieve patiënten.
2. Opvolging van het gebruik van de Universal Microbe Detection™-kit bij de diagnose van PJI in cultuur negatieve patiënten.
3. Opvolging van de literatuur omtrent het gebruik van breedspectrum PCR in de diagnose van PJI.