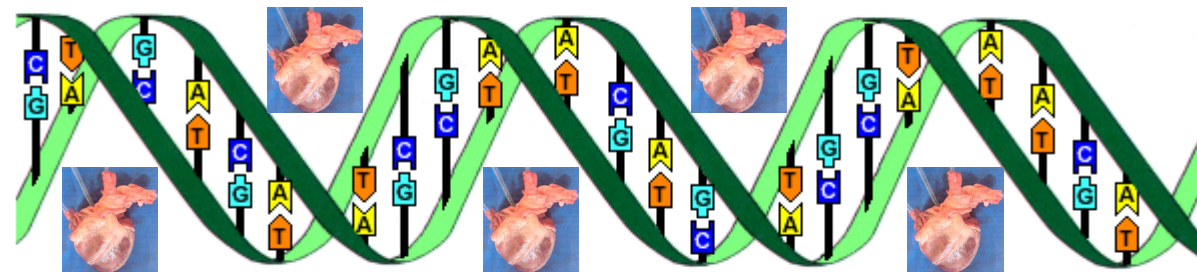


# MOCH MEM REA

## Comment intégrer les résultats de la biologie moléculaire dans le traitement des endocardites infectieuses



Isabelle Podglajen, MCU-PH, Bactériologie

Hôpital Européen Georges Pompidou

Mai 2007

# Diagnostic biologique conventionnel d'une EI

## - Éléments de diagnostic non spécifique

- numération globulaire, VS, CRP
- hypergammaglobulinémie polyclonale
- facteur rhumatoïde, complexes immuns circulants, cryoglobulinémie
- hématurie microscopique, protéinurie

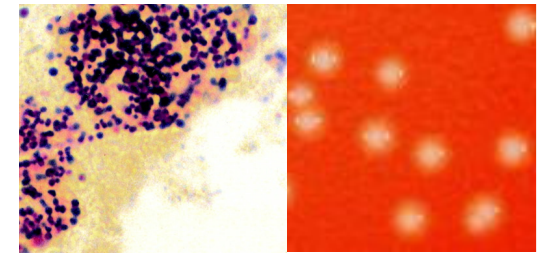
## - Éléments de diagnostic spécifique

### - *Avant chirurgie*

- microbiologique : hémocultures (3 paires avant antibiothérapie)  
sérologies (*Coxiella*, *Bartonella*, ...)

### - *Après chirurgie* (valves; tissus cardiaques ou péri-prothétiques; végétations)

- microbiologique : examen microscopique  
cultures
- anatomopathologique



# Diagnostic moléculaire d'une EI (PCR « maison »)

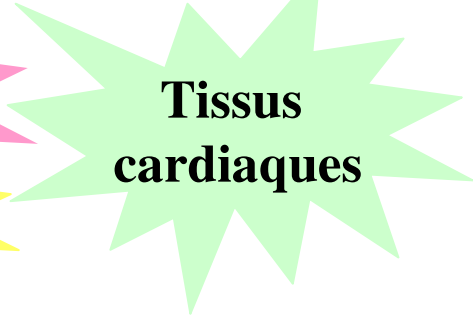
Échantillons cliniques (stérilité maximale)  
Lyse des cellules eucaryote et procaryote  
Extraction de l'ADN (eucaryote, procaryote)



Sang



Sérum



Tissus  
cardiaques

## *PCR spécifiques*

- **amplification d'un fragment d'ADN spécifique d'espèce**
- **PCR en temps réel**

*Tropheryma whipplei*

*Brucella* spp.

*Leptospira* spp.

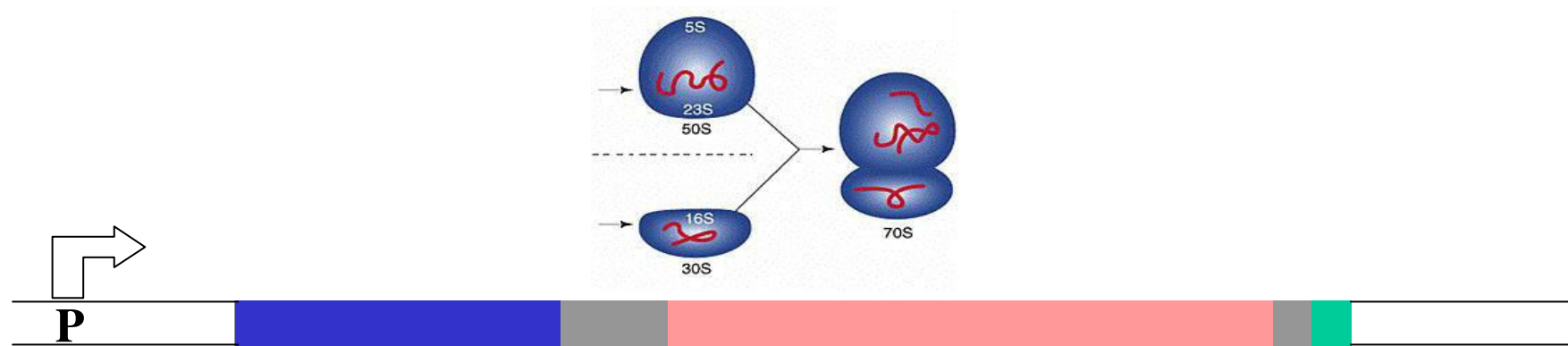
*Legionella* spp.

*Bartonella* spp.

*Coxiella burnetti*

## *PCR universelle ADNr 16S*

# Organisation de l'opéron codant pour les ARN ribosomiaux chez *Escherichia coli*



*rrsH*

*rrlH*

*rrfH*

ADNr 16S

ADNr 23S

ADNr 5S

~ 1500pb

(500)

~ 3000pb

(180)

~ 120pb

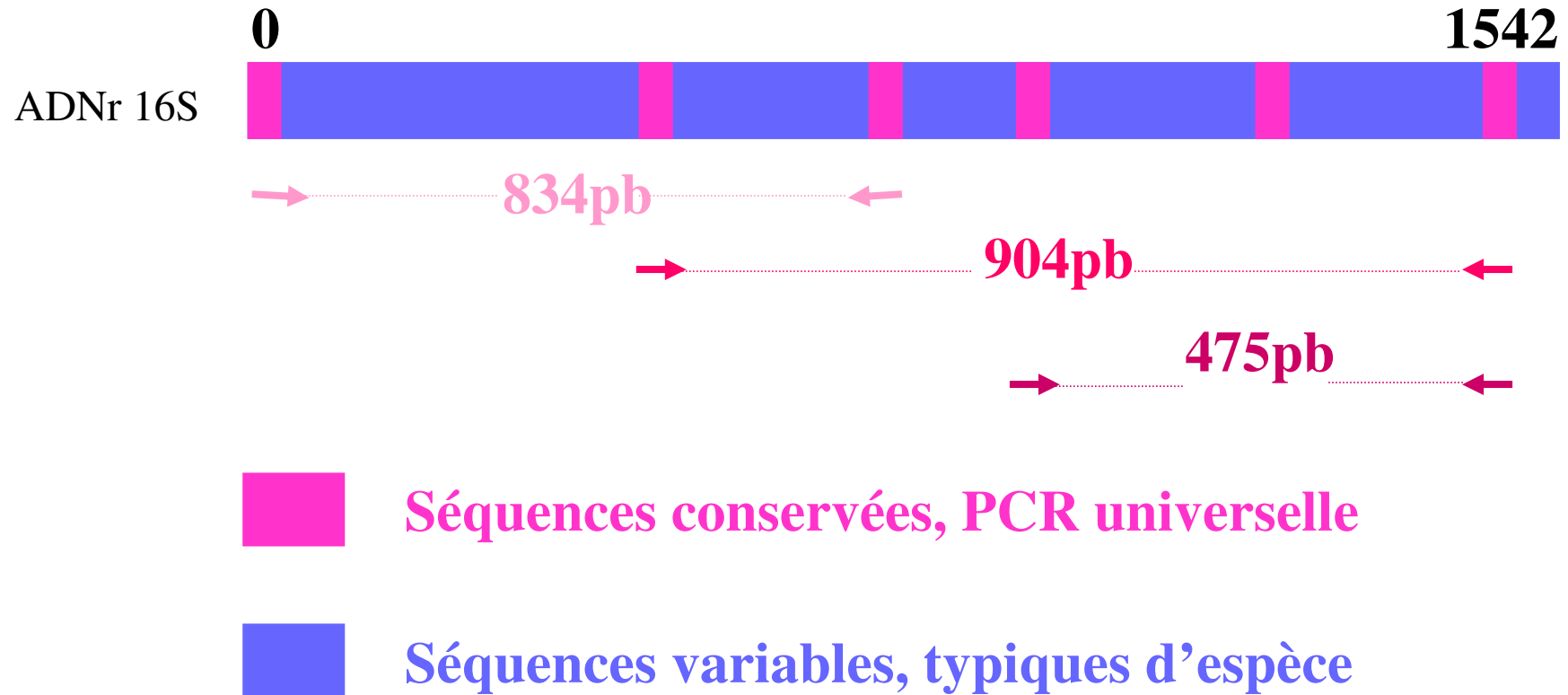
Régions intergéniques

Une ou plusieurs copies d'opéron dans le chromosome;  
le nombre dépend de l'espèce bactérienne

# Nombre de copie d'opéron codant pour les ARNr

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

# ADNr 16S, *rrs*



**Comparaisons des séquences** avec les données des banques de séquences (NCBI, BiBi, RIDOM, ...)

**Définition moléculaire de l'espèce bactérienne :**

**Homologie de séquence des ADNr 16S > 97 %**

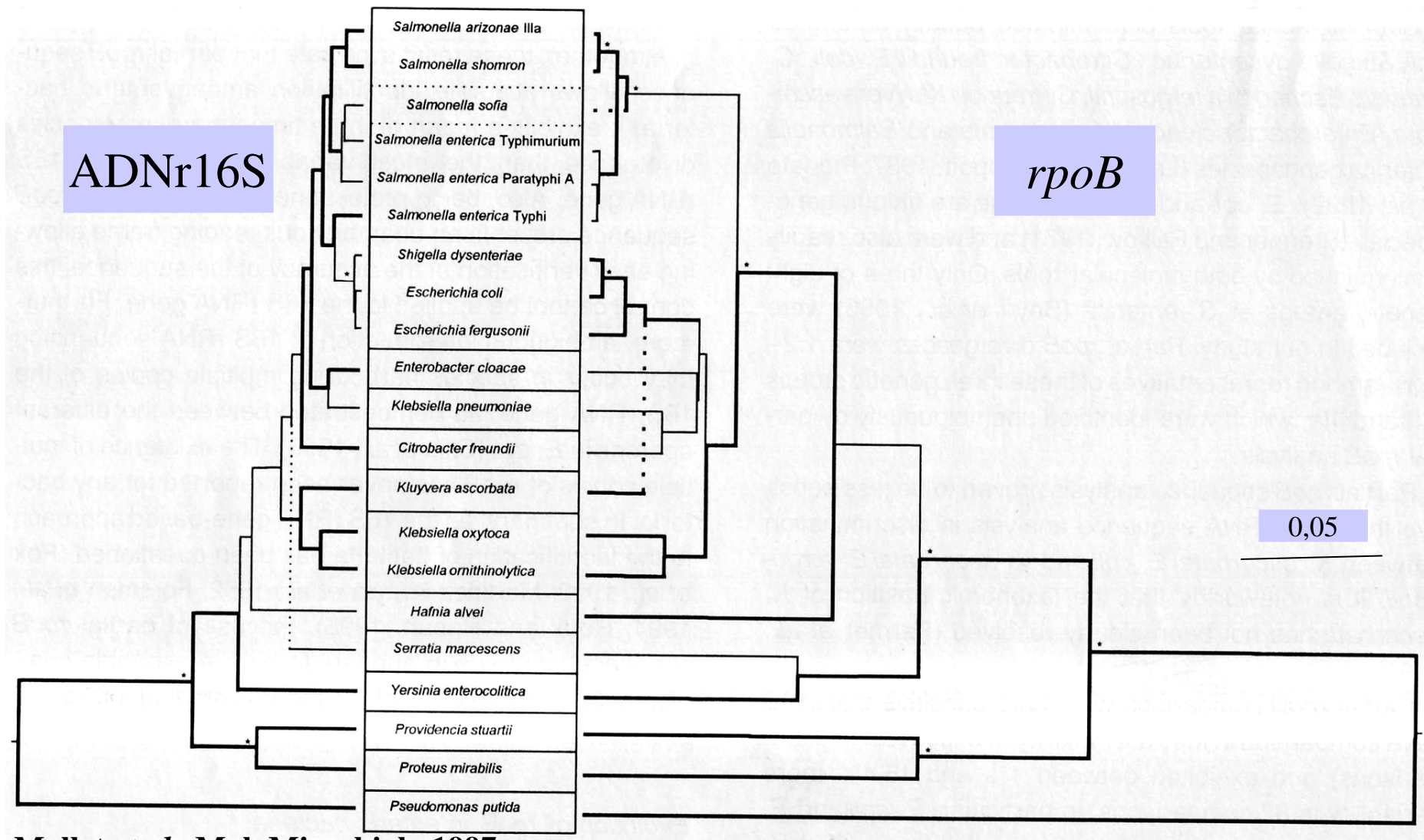
# Gènes alternatifs utilisés pour l'identification

---

Gène	Espèce
<i>rpoB</i>	Entérobactéries, <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Leptospira</i> spp., <i>Rickettsia</i> spp.
<i>sodA</i>	<i>Streptococcus</i> spp., Staphylocoques à coagulase négative, <i>Enterococcus</i> spp.
<i>rib</i>	<i>Bartonella</i> spp.
<i>rompA</i>	<i>Rickettsia</i> spp. (gpe boutonneux)
<i>omp2</i>	<i>Chlamydia</i> spp.
<i>hsp</i>	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Mycobacterium</i> spp.
<i>fisY</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
IS111	<i>Coxiella burnetii</i>

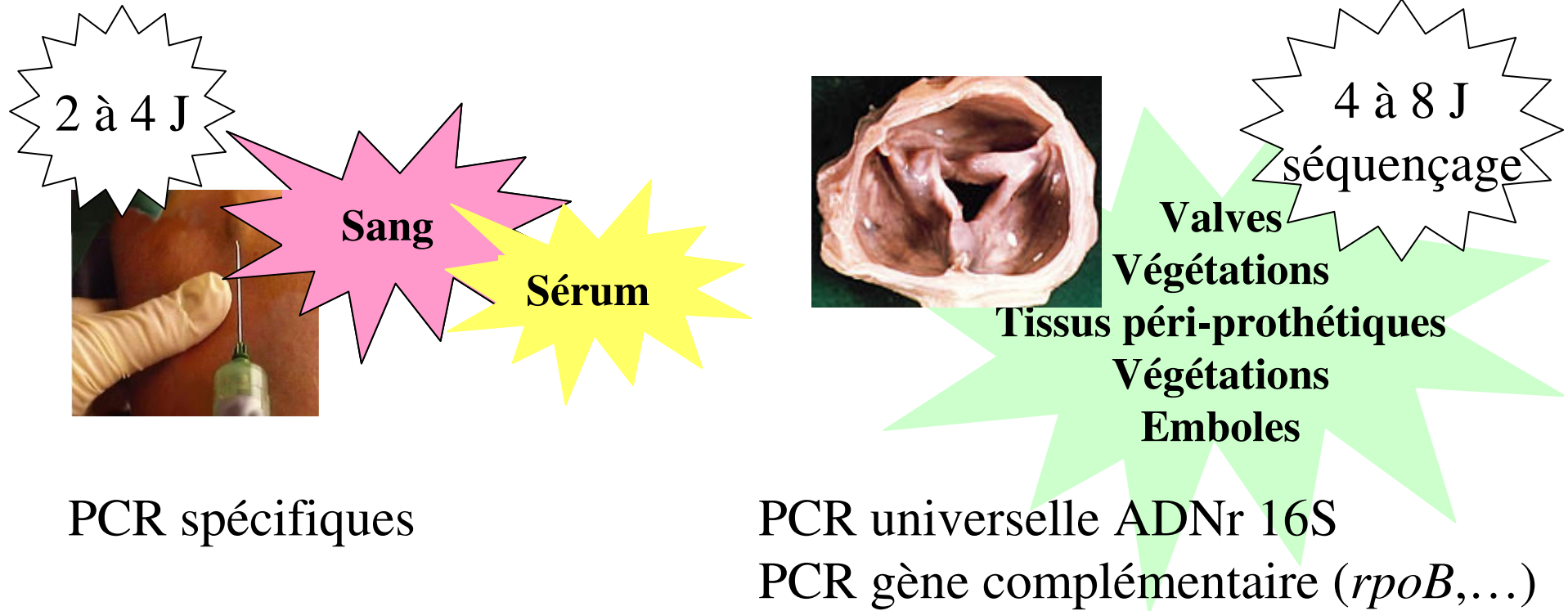
---

# Comparaison des arbres de phylogénie ADNr 16S *versus* *rpoB* chez les entérobactéries



Mollet *et al.*, Mol. Microbiol., 1997

# Diagnostic moléculaire et prélèvements cliniques



PCR spécifiques

PCR universelle ADNr 16S

PCR gène complémentaire (*rpoB*,...)

*Bartonella* spp. : Sp = 100% ; Se/cult ou PCR sur valves ou sérologie = 58%  
Zeaiter et al. sérums récents où conservés à -80°C  
+ jusque dans le mois suivant le diagnostic

*Coxiella burnetti* : Sp = 100% ; Se/sérologie = 64%  
Fenollar et al. sérums récents où conservés à -80°C ;  
IgG phase I < 1/25600 ;  
+ dans la phase évolutive

# PCR universelle ADNr 16S

Diagnosis of infectious endocarditis in patients undergoing valve surgery.

Greub G. et al., Am. J. Med., 2005 127 patients

Blood culture-negative endocarditis in a reference center. Etiologic diagnosis of 348 cases.

Houpikian P. et al., Medicine, 2005 348 patients

Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnosis of infective heart valve endocarditis.

Breitkopf C. et al., Circulation, 2004 51 patients

Comparative molecular and microbiologic diagnosis of bacterial endocarditis.

Podglajen et al., Emerg. Infect. Dis., 2003 46 patients

Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue.

Gauduchon V. et al., J. clin. Microbiol., 2003 29 patients

Etiologic diagnosis of infective endocarditis by broad-range polymerase chain reaction: a 3-year experience

Bosshard P.P. et al., Clin. Infect. Dis., 2003 49 patients

# Principaux résultats (1)

## *Les apports*

### **Endocardites certaines à hémocultures négatives**

Bénéfice jusqu'à 70% dans la prise en charge globale du patient

- Adaptation de l'antibiothérapie
- Explorations complémentaires

### **Endocardites possibles**

PCR ADNr 16S négatif et absence de signe anatomopathologique en faveur d'une endocardite : arrêt de l'ATB

## **Espèces bactériennes identifiées par des techniques moléculaires**

<i>Coxiella burnetii</i>	HACEK	<i>Corynebacterium striatum</i>
<i>Bartonella</i> spp.	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Tropheryma whippiei</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Actinomyces</i> spp.
<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Gemella morbillorum</i>
<i>Granulicatella adiacens</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	Entérobactéries
<i>Treponema denticola</i>		

# Principaux résultats (2)

## *Les points négatifs*

### **Faux négatifs**

- \* Choix du fragment de biopsie à traiter (répartition hétérogène des bactéries dans le prélèvement)
- \* Présence d'inhibiteurs de la Taq dans certains tissus ( $\beta$ -globine)
- \* Sensibilité/seuil théorique de détection (1 copie d'ADN)  
(extraction, lyse bactérienne, ...) → nb copies ADNr 16S
- \* Persistance de l'ADN

### **Faux positifs et problèmes d'interprétation :**

- \* Contaminations (environnements, réactifs, ...)
- \* Non adapté pour les endocardites pluri-microbiennes (rares)
- \* Discrimination insuffisante

### **Coûts**

# Dans quel cas une analyse par des techniques de BM est-elle justifiée ?

## *Endocardites à hémocultures négatives*

Infection décapitée par traitement ATB préalable

Germe de culture difficile ou impossible

Nouveaux pathogènes émergents

## *Endocardites possibles selon la classification de Duke anatomopathologie*

## *En cas de doute sur l'agent causal isolé dans les hémocultures*

# Quand prendre en compte des résultats de BM ?



Contamination



Prélèvement suffisant et  
représentatif

*Confrontation avec les résultats d'anatomopathologie et de sérologie,  
l'histoire clinique*

En période aiguë de l'endocardite :

- faux négatifs par manque de sensibilité

A distance des épisodes aigus (traitement ATB efficace) :

- Faux négatifs par manque de persistance de l'ADN  
(*Staphylococcus*)

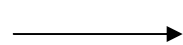
# Persistance de l'ADN bactérien

valves de patients ayant achevés leur traitement ATB et n'ayant pas de signes cliniques ou anatomopathologiques d'EI

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

Roverly C et al., J. clin. Microbiol., 2005

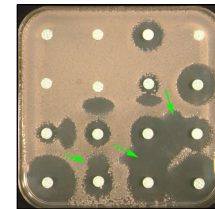
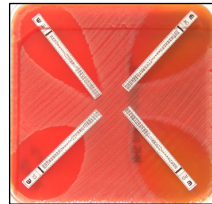
***En aucun cas la présence d'un ADN bactérien dans une valve n'est le témoin d'une endocardite active (pas le témoin de cellules viables)***



**Identification de l'agent causal**

# Conclusions

- **Diagnostic moléculaire : aide supplémentaire pour le diagnostic d'une EI**



- **Confronter les résultats à ceux de l'anatomopathologie et de la sérologie**
- **Validation finale par le clinicien en fonction de l'histoire clinique**
- **Délai de réponse**



**A venir :**

- **Amélioration des techniques moléculaires sur sérum ou sang**
- **Puces protéiques**