



9^{ème} journée CRIOA Lyon
Mardi 27 juin 2023



Le diagnostic microbiologique des IOA : quelles nouveautés ?

Frédéric LAURENT

Institut des Agents Infectieux, CNR des staphylocoques, Hôpital de la Croix Rousse, Hospices Civils de Lyon
Centre Internationale de Recherche en Infectiologie – INSERM U1111, Equipe "Pathogénèse des infections à staphylocoques"

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lyon, Département de Microbiologie-Mycologie



Prise en charge des infections ostéo-articulaires

Radiologue

Imager, visualiser



Chirurgien vasculaire

Evacuer, nettoyer, reconstruire



Microbiologiste

Détecter, identifier, tester la sensibilité



Infectiologue

Interpréter, choisir et optimiser l'antibiothérapie



Prise en charge des infections ostéo-articulaires

Radiologue

Imager, visualiser



Chirurgien vasculaire

Evacuer, nettoyer, reconstruire



Microbiologiste

Détecter, identifier, tester la sensibilité

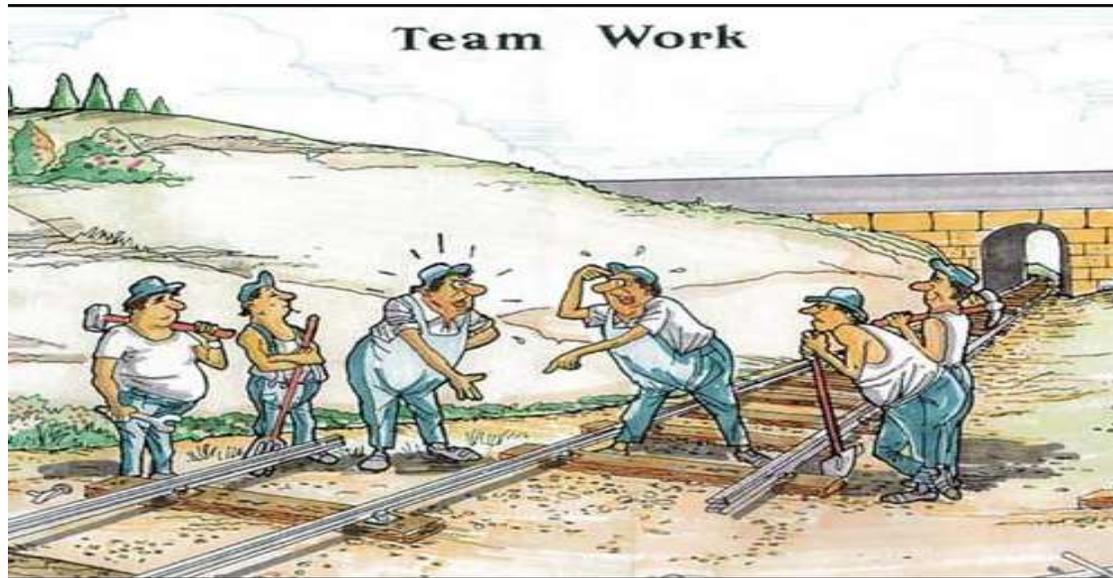


Infectiologue

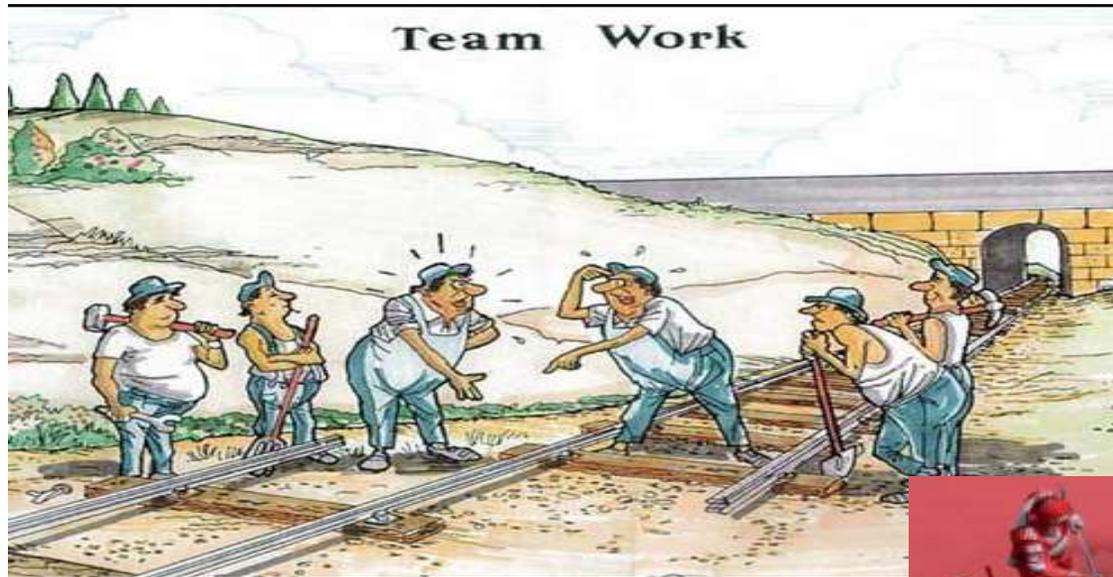
Interpréter, choisir et optimiser l'antibiothérapie



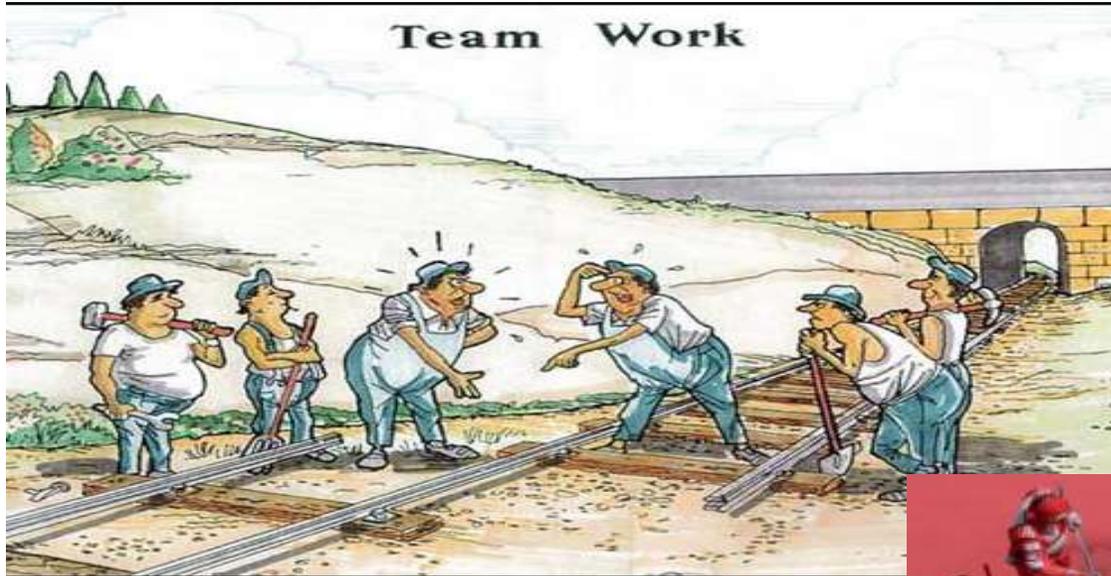
Prise en charge des infections ostéo-articulaires



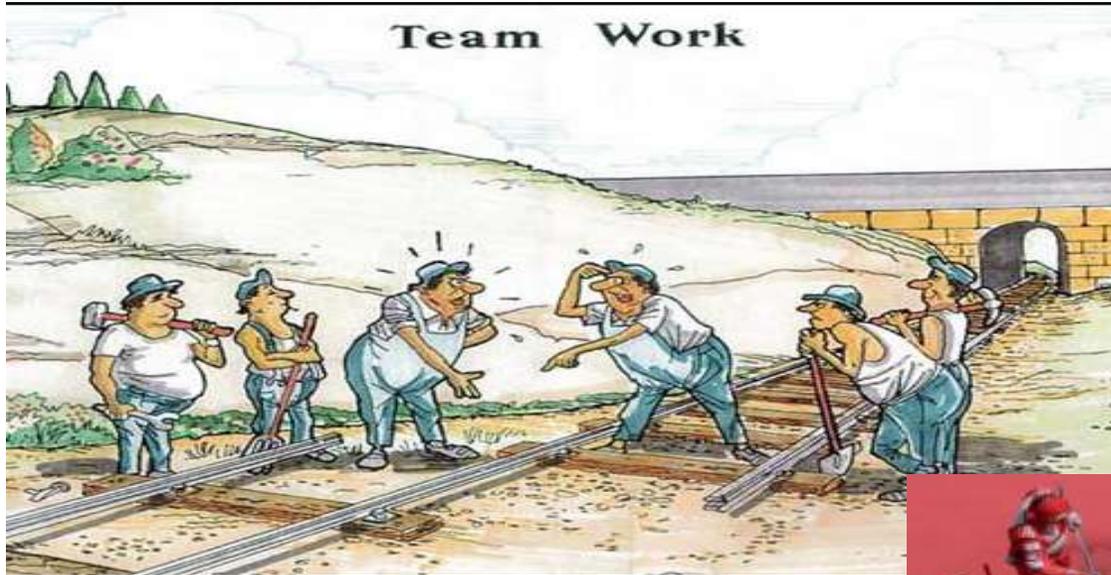
Prise en charge des infections ostéo-articulaires



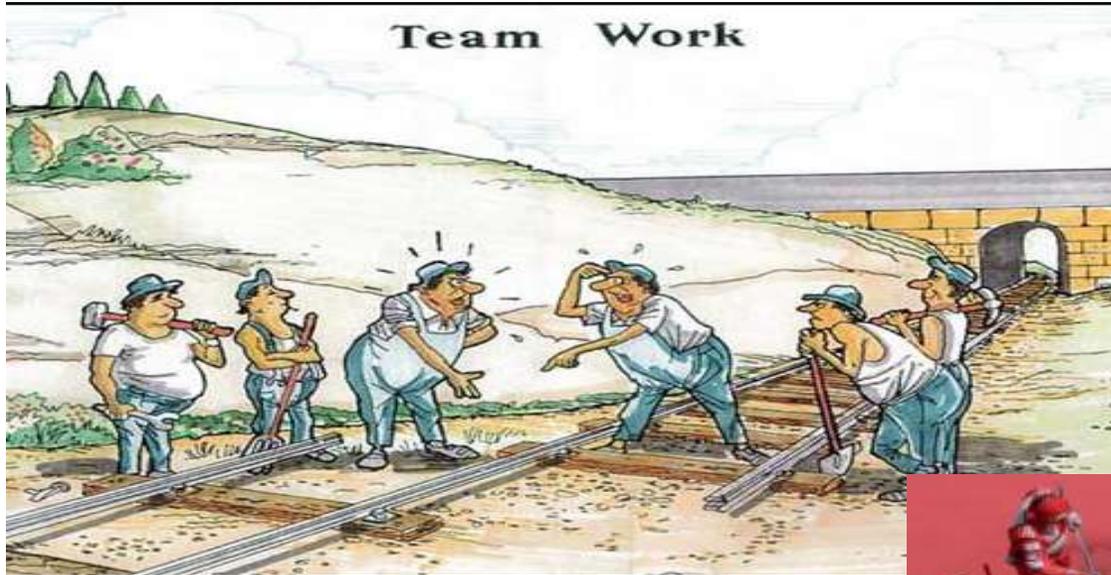
Prise en charge des infections ostéo-articulaires



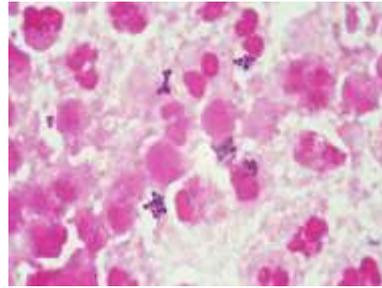
Prise en charge des infections ostéo-articulaires



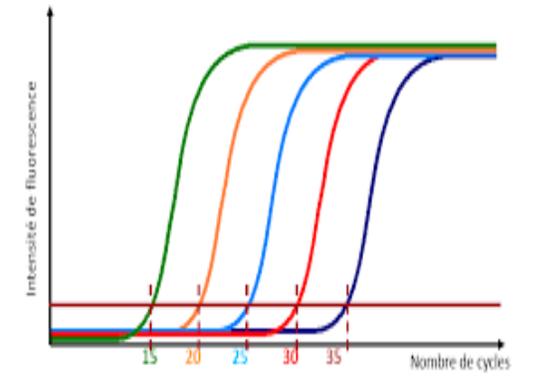
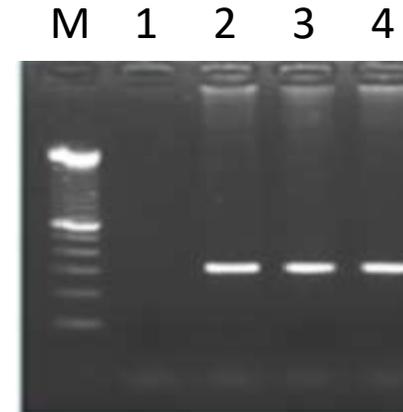
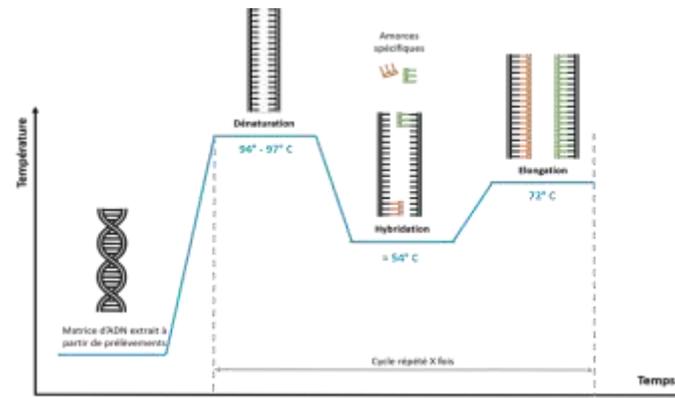
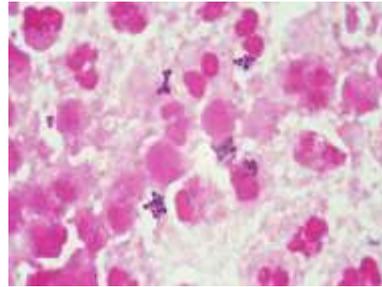
Prise en charge des infections ostéo-articulaires



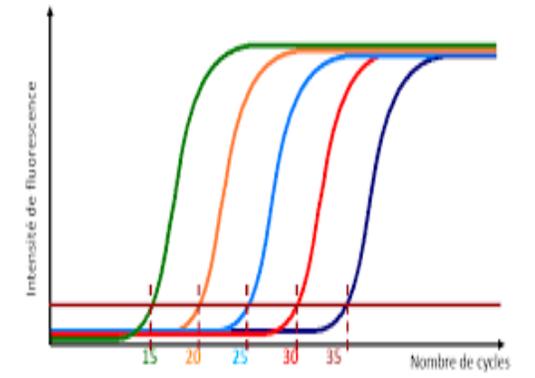
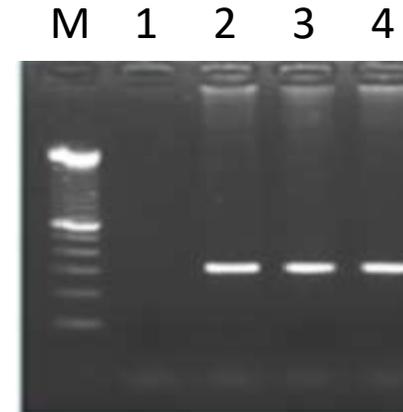
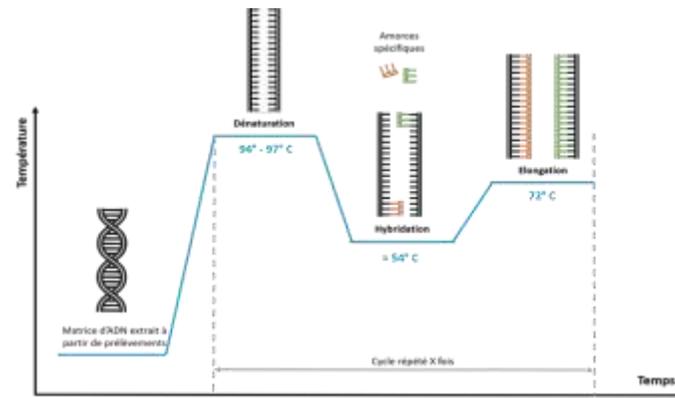
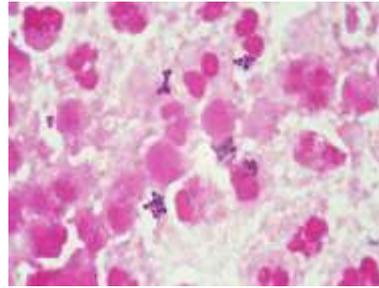
Diagnostic des infections ostéo-articulaires



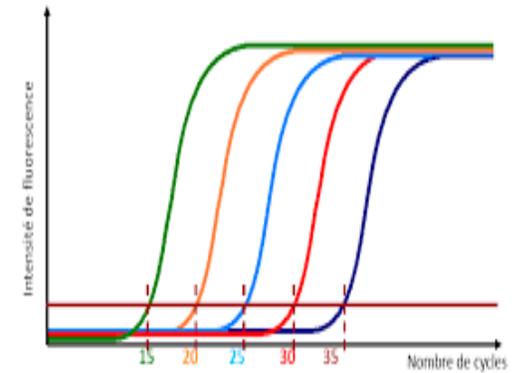
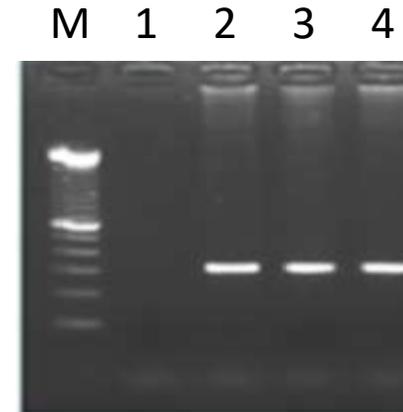
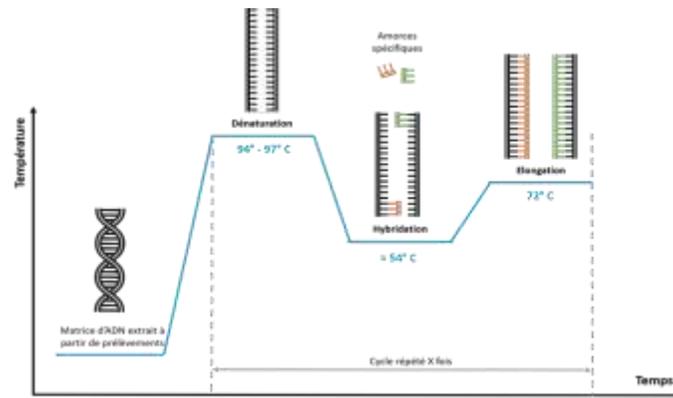
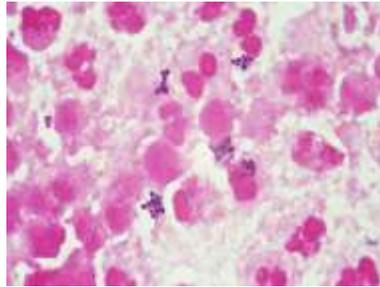
Diagnostic des infections ostéo-articulaires



Diagnostic des infections ostéo-articulaires



Diagnostic des infections ostéo-articulaires



Qu'est ce que votre bactériologiste (préféré) a   vous offrir ?



Approche syndromique : Panel Joint Infection BioFire®



Néanmoins **ATTENTION** aux contaminations
nécessité d'un environnement sécurisé - Personnels habilités

Approche syndromique : Panel Joint Infection BioFire®



BIOFIRE® JOINT INFECTION (JI) PANEL

1 Test. 39 Targets. ~1 Hour.

Validation uniquement pour le **liquide synovial**

GRAM-POSITIVE BACTERIA 8 + 7

Anaerococcus prevotii/vaginalis

Clostridium perfringens

Cutibacterium avidum/granulosum

Enterococcus faecalis

Enterococcus faecium

Finegoldia magna

Parvimonas micra

Peptoniphilus

Peptostreptococcus anaerobius

Staphylococcus aureus

Staphylococcus lugdunensis

Streptococcus spp.

Streptococcus agalactiae

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pyogenes



GRAM-NEGATIVE BACTERIA 13 + 1

Bacteroides fragilis

Citrobacter

Enterobacter cloacae complex

Escherichia coli

Haemophilus influenzae

Kingella kingae

Klebsiella aerogenes

Klebsiella pneumoniae group

Morganella morganii

Neisseria gonorrhoeae

Proteus spp.

Pseudomonas aeruginosa

Salmonella spp.

Serratia marcescens



YEAST

Candida spp.

Candida albicans



ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES 8

Carbapenemases

IMP

KPC

NDM

OXA-48-like

VIM

ESBL

CTX-M

Methicillin Resistance

mecA/C and MREJ (MRSA)

Vancomycin Resistance

vanA/B



Approche syndromique : Panel Joint Infection BioFire®

...*"qu'on aurait bien voulue avoir"* ... *et qui étaient prévues au départ*

Staphylococcus epidermidis

Cutibacterium acnes

Staphylococcus capitis

Staphylococcus warneri

Corynebacterium spp



Panel Joint Infection BioFire® - Cibles absentes

... "qu'on aurait bien voulu avoir" ... et qui étaient prévues au départ

Staphylococcus epidermidis
Cutibacterium acnes
Staphylococcus capitis
Staphylococcus warneri
Corynebacterium spp



Pourquoi ?

- Présents au départ du développement
- Bonne détection des patients infectés par ces pathogènes
mais - **cut-offs** sur le signal non suffisamment discriminants VP/FP
- **règles de la FDA** très rigide qui aurait mis en jeu l'acceptation globale du test

Panel Joint Infection BioFire®

... "qu'on aurait bien voulu avoir" ... et qui étaient prévues au départ

Staphylococcus epidermidis
Cutibacterium acnes
Staphylococcus capitis
Staphylococcus warneri
Corynebacterium spp



Pourquoi ?

- Présents au départ du développement
- Bonne détection des patients infectés par ces pathogènes
mais - **cut-offs** sur le signal non suffisamment discriminants VP/FP
- **règles de la FDA** très rigide qui aurait mis en jeu l'acceptation globale du test

⇒ Nécessité d'être très explicite sur

- ce qui **est** dans le panel
- ce qui **n'est** pas dans le panel

En dehors des cibles indiquées ci-dessus les autres pathogènes ne sont pas détectables notamment les Staphylocoques blancs, *Cutibacterium acnes* et les Corynébactéries.

Panel Joint Infection BioFire[®] - Etude clinique en "vraie vie"

- Juillet 2021-Mai 2022 (agrément FDA), en collaboration avec bioMérieux
- 6 sites en France (5 laboratoires CRIOAc et 1 laboratoire privé)
- Liquide articulaire résiduel (200 µl) de patients avec arthrite aiguë

- **Critères chez l'adulte**

⇒ Combinaison de critères de l'ICM Philly 2018 + EBJIS 2021

- ✓ **Arthrite aiguë sur articulation native ou prothétique**
- ✓ **Matériel : Cellularité synoviale > 1700 GB/mm³ avec ≥ 65 % PNN**
- ✓ **Ou présence d'une fistule depuis l'articulation ou visualisation de la prothèse**

- **Critères chez l'enfant**

⇒ Impotence fonctionnelle avec signes cliniques (douleur, épanchement) ou biologiques d'infection



Matériels et méthodes

- PEC des prélèvements de Liq Art selon le protocole habituel du laboratoire
 - Selon recommandations de la SFM
 - Milieux gélosés et liquides, incubation → 14 jours
- Réalisation d'un test Biofire JI (si volume suffisant)
- Comparaison des résultats des cultures conventionnelles versus Biofire JI
- **Si résultat discordant** (et si volume suffisant) :
 - Confrontation aux résultats des autres prélèvements pour un même patient (biopsies tissulaires)
 - Réalisation de PCR spécifiques ou 16s suivies d'un séquençage nanopore Minion



Résultats

313 ponctions articulaires incluables → 312 résultats interprétables

Vrai positif (VP)	Vrai négatif (VN)	Faux positif (FP)	Faux négatif (FN)
BF+ / Cult ou autre +	BF- / Culture -	BF+ / Cult ou autre -	BF- / Culture +
155	130	0	27

Très peu de résultats invalides !

Résultats

313 ponctions articulaires incluables → 312 résultats interprétables

Vrai positif (VP)	Vrai négatif (VN)	Faux positif (FP)	Faux négatif (FN)
BF+ / Cult ou autre +	BF- / Culture -	BF+ / Cult ou autre -	BF- / Culture +
155	130	0	27

Résultats strictement concordants ou confirmés après investigations

285/312 (91%)

Résultats

313 ponctions articulaires incluables → 312 résultats interprétables

Vrai positif (VP)	Vrai négatif (VN)	Faux positif (FP)	Faux négatif (FN)
BF+ / Cult ou autre +	BF- / Culture -	BF+ / Cult ou autre -	BF- / Culture +
130 + 25	130	0	27

Le Biofire JI a permis de **rattraper 25 diagnostics**

- 7 *S. aureus*, 1 *P. aeruginosa*, 2 *S. agalactiae*, 1 Streptococcus spp
- 5 *K. kingae*, 1 *S. pneumoniae*
- 2 gonocoques
- 6 polymicrobiens (sur les 12 compris dans l'étude)

Intérêt +++
Antibiothérapie préalable
Germes déficients

Résultats

313 ponctions articulaires incluables → 312 résultats interprétables

Vrai positif (VP)	Vrai négatif (VN)	Faux positif (FP)	Faux négatif (FN)
BF+ / Cult ou autre +	BF- / Culture -	BF+ / Cult ou autre -	BF- / Culture +
155	130	0	27

... Mais au détriment du panel

Résultats

313 ponctions articulaires incluables → 312 résultats interprétables

Vrai positif (VP)	Vrai négatif (VN)	Faux positif (FP)	Faux négatif (FN)
BF+ / Cult ou autre +	BF- / Culture -	BF+ / Cult ou autre -	BF- / Culture +
155	130	0	27

- **18 (6%)** : non détections liées aux **cibles absentes** du panel (dont 10 *S. epidermidis*, 2 *S. capitis*, 2 *C. acnes*)
- **9 (3%)** : résultats faussement négatifs sur des **cibles présentes** (5 *S. aureus*, 2 *P. aeruginosa*, 1 *N. gonorrhoeae*, 1 *P. micra*)

⇒ **Investigations complémentaires :**

- Confirmation des FN
- Pour 3 *S. aureus*, hypothèse d'inoculi très faibles (+ uniquement dans flacon HC et/ou Ct tardifs)
- Pas d'explication pour les autres...



Intérêt d'une centrifugation préalable au test ?

Panel JI BioFire[®] : quels impacts médico-économiques?

• Impacts médicaux

- ✓ **Délai** de réponse: 1H00 → Impact **important**
- ✓ **Performances** diagnostiques +++ → **si BF + sur arthrite aiguë**
- ✓ **25 diagnostics récupérés et 6/12 polymicrobiens détectés uniquement sur le test !**
- ✓ **Adaptation thérapeutique**
 - Evaluation à distance requise avec davantage de pathogènes résistants
 - Premiers résultats laissant présager **adaptation thérapeutique possible à J0 sur la base BF + notamment si BGN neg**
- ✓ Intégrer les **contraintes organisationnelles** d'un établissement
 - Screening aux urgences avant transfert dans ≠ services cliniques (rhumato / infectiologie)



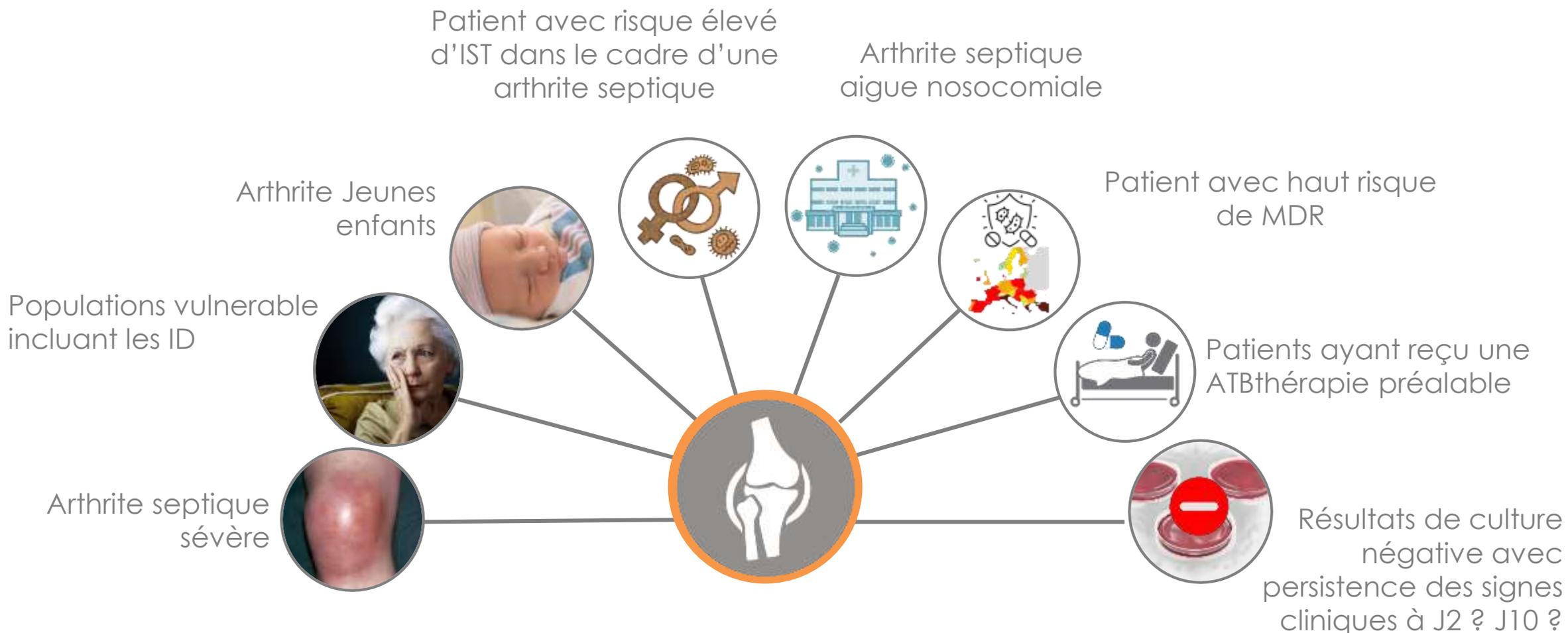
• Impacts économiques

- **Coût non négligeable** du test 160 euros
- A confronter
 - Au coût des examens complémentaires réalisés (PCR spécifiques)
 - Aux économies éventuellement réalisées si évolution des pratiques en cas de résultat + (pédiatrie)



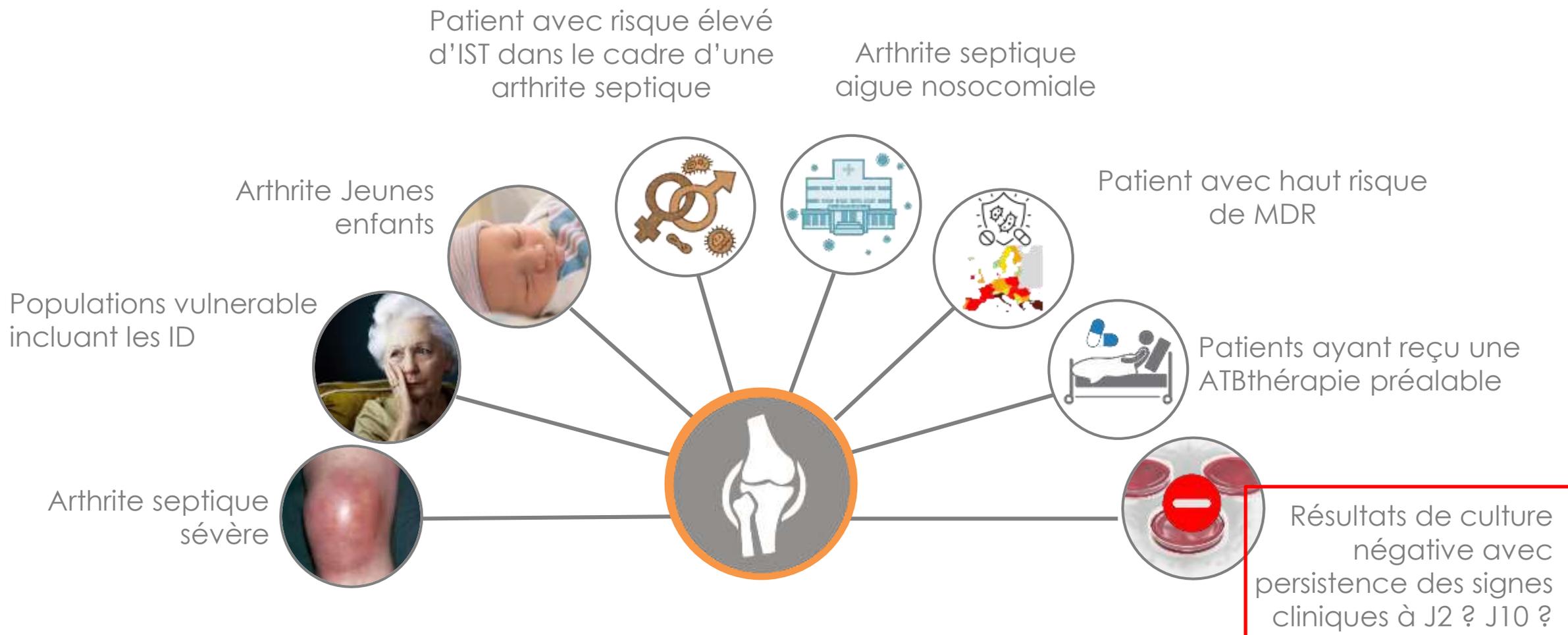
Panel JI BioFire[®] : quels impacts médico-économiques?

Populations générales Adultes et Enfants



Panel JI BioFire[®] : quels impacts médico-économiques?

Populations générales Adultes et Enfants



Panel JI BioFire[®] : quels impacts médico-économiques?

Populations spécifiques

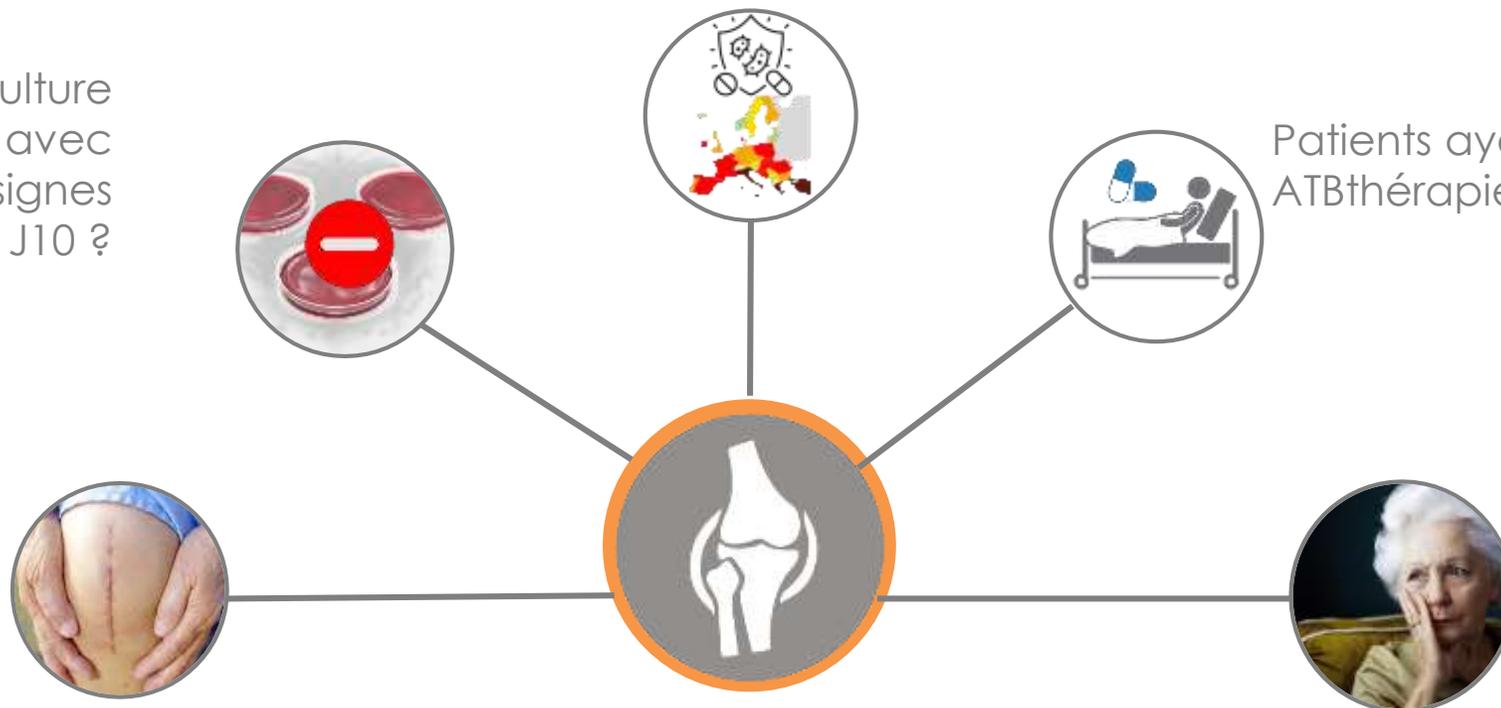
Patient hospitalisé ou rapatrié
d'une zone à haute
prevalence de BMR/BHRe

Résultats de culture
négative avec
persistance des signes
cliniques à J2 ? J10 ?

Patients ayant reçu une
ATBthérapie préalable

Patients avec
sepsis sur PJI

Populations vulnérable
incluant les ID



- Besoin d'études d'impact clinique
- Besoin d'études médico-économiques

Is there any questions ?

Remerciements :

CRIOAC AuRA Dr Tiphaine Roussel-Gaillard, Dr Céline Dupieux-Chabert

Tous les techniciens et biologistes de l'INSTITUT DES AGENTS INFECTIEUX - HCL

CRIOAc IDF - Hôpital Ambroise Paré : Dr Camille Courboules, Dr Anne-Laure Roux

CRIOAc Nord Ouest : Dr Caroline Loiez

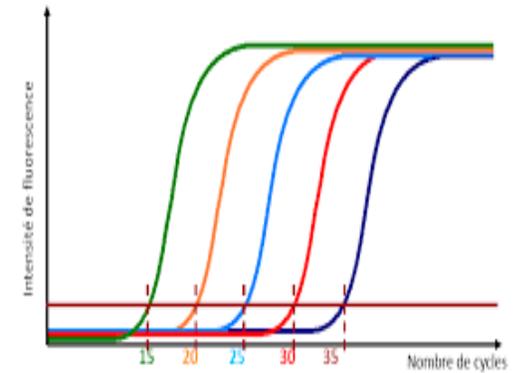
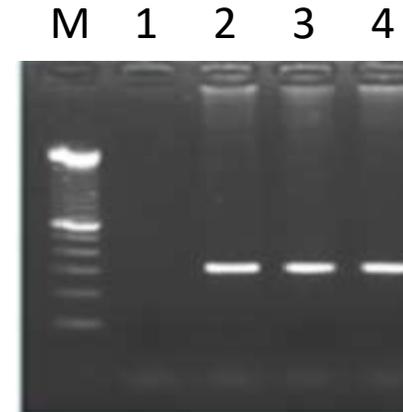
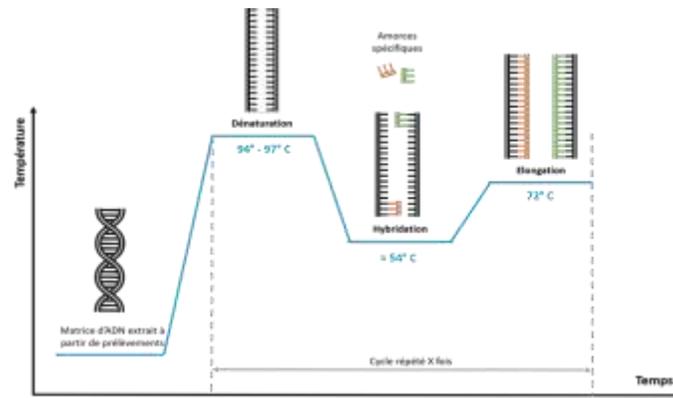
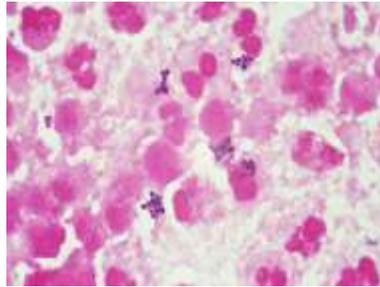
CRIOGO : Dr Eve Tessier, Dr Pascale Bémer, Pr Stéphane Corvec

CRIOAc Sud Meditarerranée : Dr Adeline Dubois, Pr Jean-Philippe Lavigne

Cerballiance Lyon : Dr Clément Munier, Dr Emmanuel Chanard, Dr Vincent Gazzano



Diagnostic des infections ostéo-articulaires



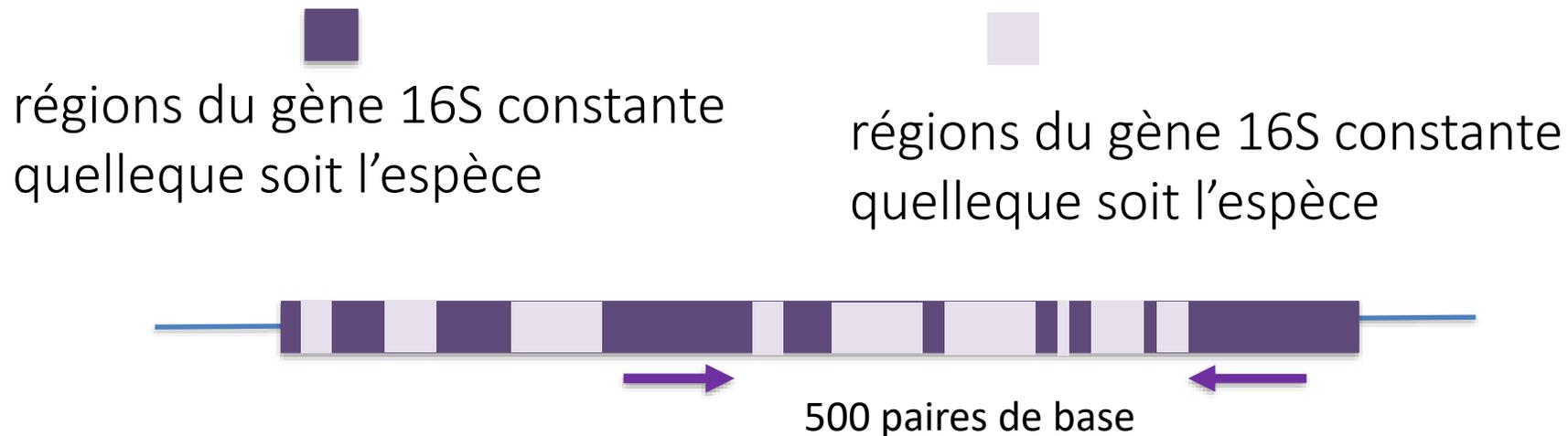
Qu'est ce que votre bactériologiste (préféré) a   vous offrir ?



Diagnostic des IOA : PCR 16S – Séquençage SANGER

PCR universelle ou PCR 16S ou "broad range" PCR = PCR sans « a priori »

- une seule paire d'amorces primers ciblant une région constante du gène 16 qui est **présent chez TOUTES les bactéries**



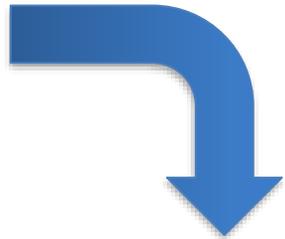
Une seule et même amorce quelle que soit la bactérie
PCR positive dès qu'il y a une bactérie présente
ET

la séquence du fragment amplifié est spécifique à chaque espèce
Il ne reste qu'à séquencer !

Diagnostic des IOA : PCR 16S – Séquençage SANGER

PCR universelle ou PCR 16S ou "broad range" PCR = PCR sans « a priori »

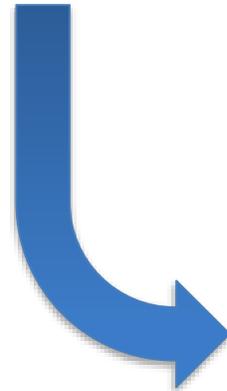
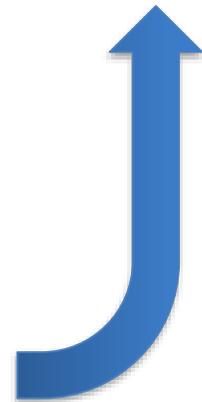
Prélèvement



Lyse/Extraction ADN

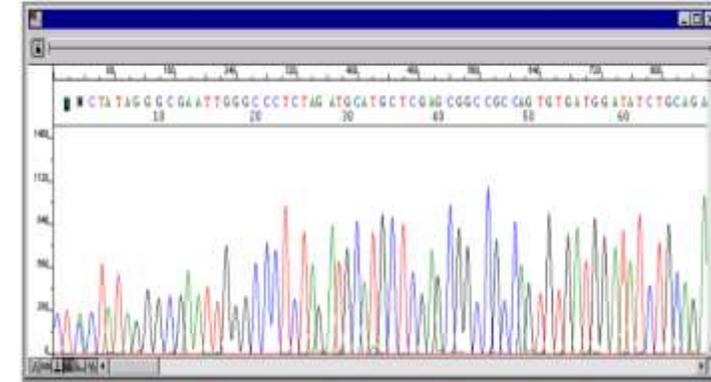
PCR

cible = gene 16S



Purification du produit PCR

Séquençage Sanger



Analyse de séquence



Identification

Diagnostic des IOA : PCR 16S – Séquençage SANGER

Après amplification du gène cible : "Réaction de séquence"

GAACGTGACGCTAATATTGTT
CT TGC ACTG

Diagnostic des IOA : PCR 16S – Séquençage SANGER

Après amplification du gène cible : "Réaction de séquence"

GAACGTGACGCTAATATTGTT
CT TGC**ACTGC**C

GAACGTGACGCTAATATTGTT
CT TGC**ACTGC**G

GAACGTGACGCTAATATTGTT
CT TGC**ACTGC**GA

GAACGTGACGCTAATATTGTT
CT TGC**ACTGC**GAT

Diagnostic des IOA : PCR 16S – Séquençage SANGER

Après amplification du gène cible : "Réaction de séquence"

GAACGTGACGCTAATATTGTT
CT TGC**ACTGC**C

GAACGTGACGCTAATATTGTT
CT TGC**ACTGC**G

GAACGTGACGCTAATATTGTT
CT TGC**ACTGCG**A

GAACGTGACGCTAATATTGTT
CT TGC**ACTGCGA**T

Mélange en fin de réaction

- CTTGC**ACTGC**C
- CTTGC**ACTGC**G
- CTTGC**ACTGCG**A
- CTTGC**ACTGCGA**T
- CTTGC**ACTGCGAT**T
- CTTGC**ACTGCGATT**A
- CTTGC**ACTGCGATTAC**

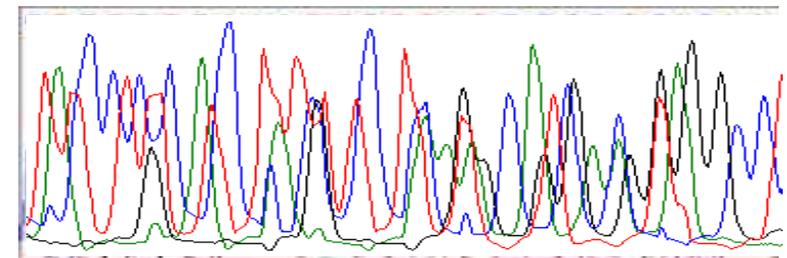
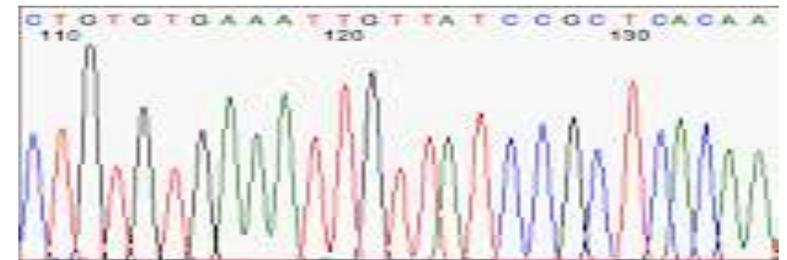
Diagnostic des IOA : PCR 16S – Séquençage SANGER

PCR universelle ou PCR 16S ou "broad range" PCR = PCR sans « a priori »

- Une seule paire d'amorces ciblant une région constante du gène 16 qui est **présent chez TOUTES les bactéries**
 - Moins sensible que la PCR spécifique
- ✓ Extraction/PCR /purification produits PCR/ Séquençage /analyse de séquence
- Technicien formé / Biologiste spécialiste analyse de séquence/
 - **48 à 72h de délai de réponse**

✓ Problème si

- contaminants
- infections polymicrobienne (15-20%)
 - dual sequences car basé sur ampli
 - interprétable



+ Méthode Sanger "non accréditable" car extérieur non LABM

Diagnostic des IOA : PCR 16S – Séquençage SANGER

Après amplification du gène cible : "Réaction de séquence"

GAACGTGACGCTAATATTGTT
CT TGC**ACTGC**C

GAACGTGACGCTAATATTGTT
CT TGC**ACTGC**G

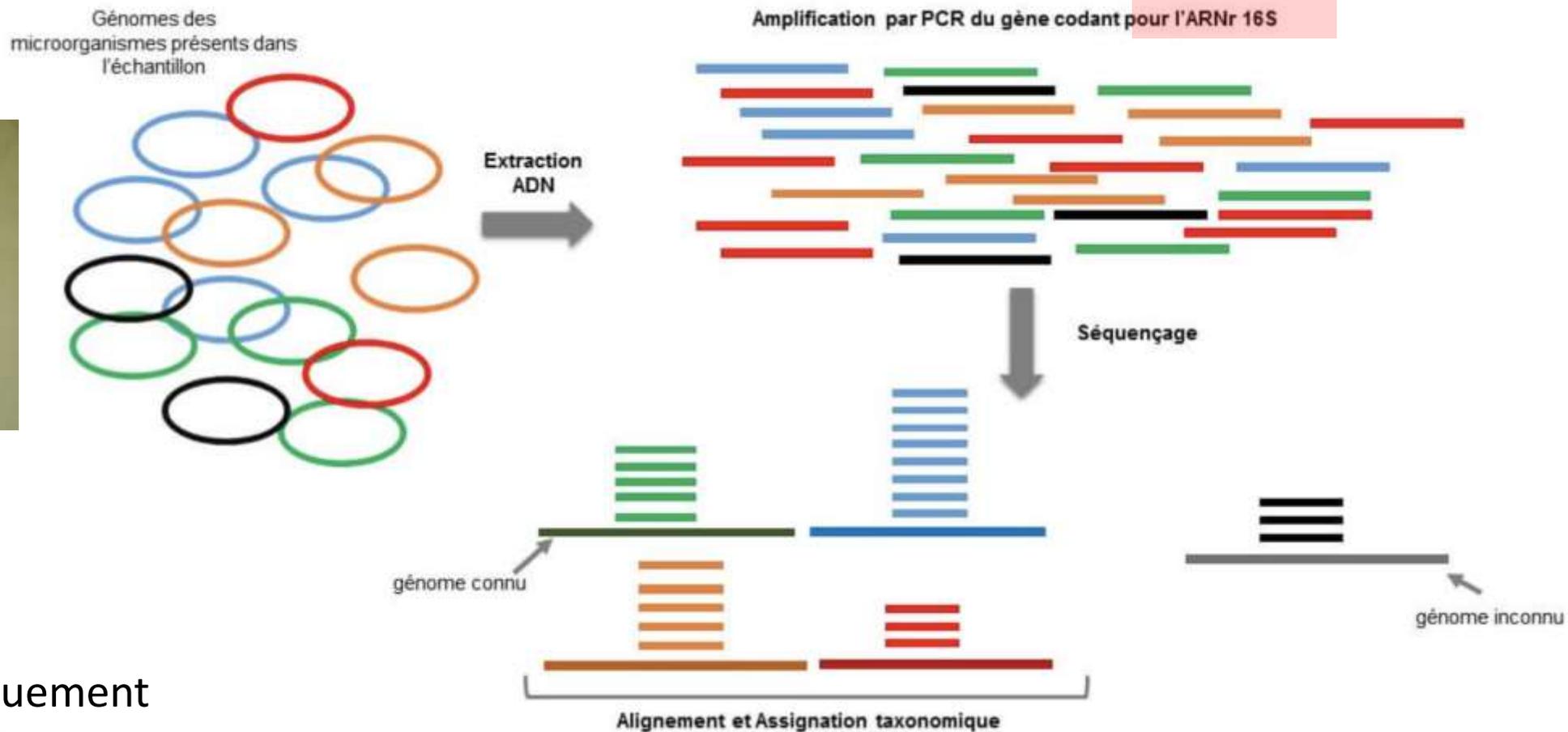
GAACGTGACGCTAATATTGTT
CT TGC**ACTGCG**A

GAACGTGACGCTAATATTGTT
CT TGC**ACTGCG**AT

Mélange en fin de réaction

- CTTG**CACTGC**C
- CTTG**CACTGC**G
- CTTG**CACTGC**A
- CTTG**CACTGCG**A
- CTTG**CACTGCG**AT
- CTTG**CACTGCG**ATT
- CTTG**CACTGCG**ATG
- CTTG**CACTGCG**ATTA
- CTTG**CACTGCG**ATTAC

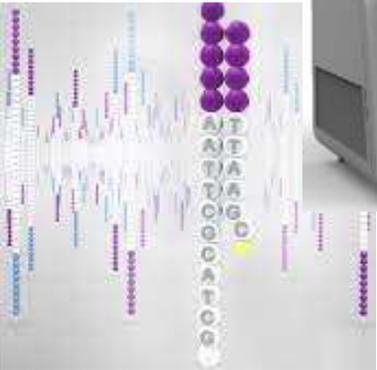
Diagnostic des IOA : Métagénomique 16S



- **Identification** uniquement
- Équipement spécifique
- Délai de quelques heures (MinION) à 2-3 jours ouvrés (Illumina)
- Coût +++

Diagnostic des IOA : Métagénomique 16S

illumina



PacBio



Technologie MinION



Diagnostic des IOA : Métagénomique 16S – MinION



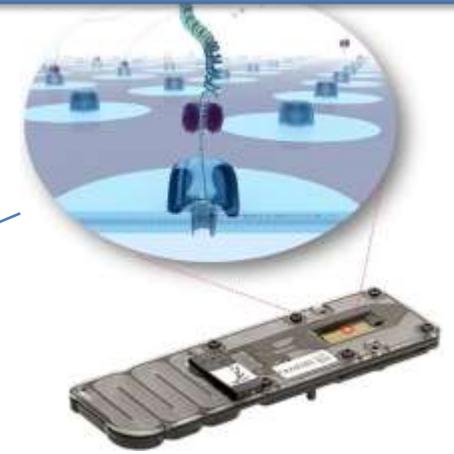
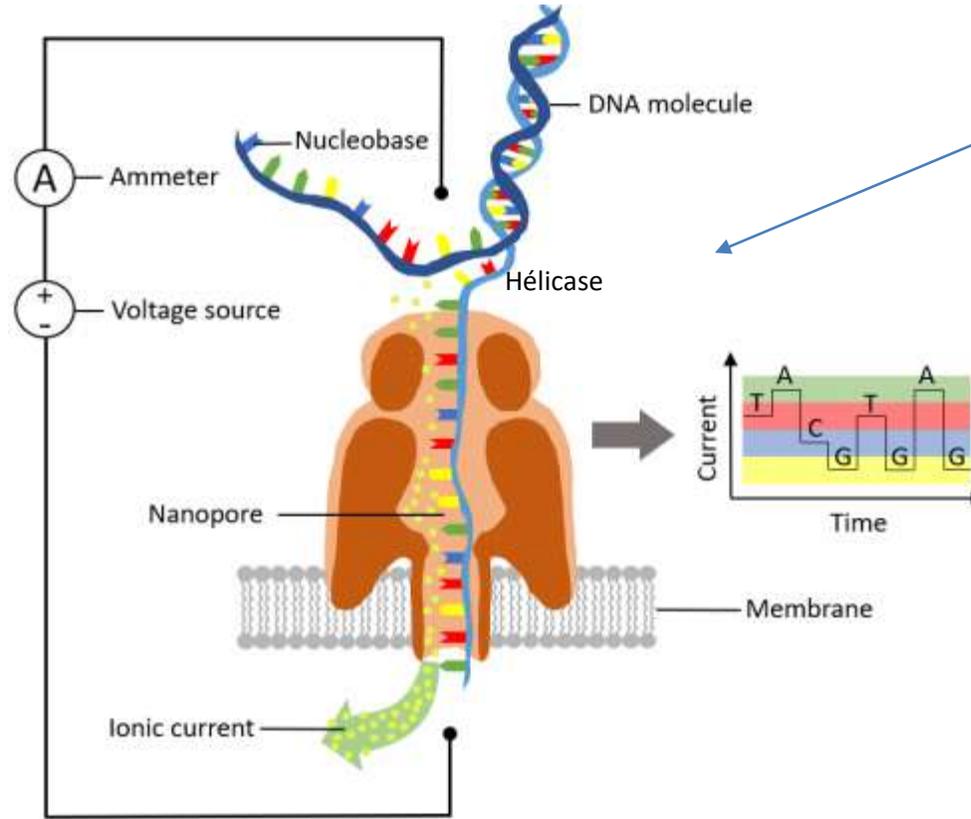
Diagnostic des IOA : Métagénomique 16S – MinION

Comment faire pour les infections polymicrobiennes ???

Mesure en continue du passage des base ATCG dans le pore



resistances électriques différentes pour chaque type de base



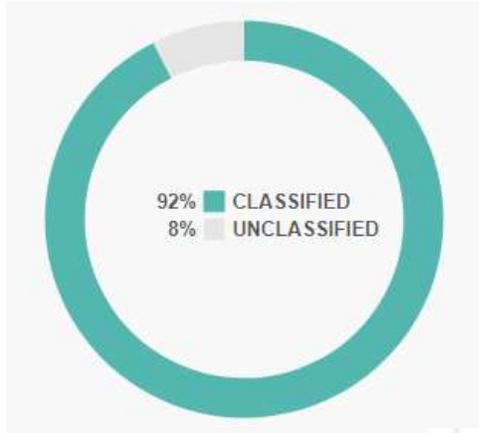
1 pore = 12 nm
2 000 pores/membrane



Basecalling : traduction signal électrique en A,T,G, C

Diagnostic des IOA : Métagénomique 16S – MinION

Quality Control:



READS CLASSIFIED
35,828

READS UNCLASSIFIED
2,920

READS ANALYSED
38,748

AVG QUALITY SCORE
9.71

Results :

Taxon ↕	Cumulative Reads ▼
Bacteroides fragilis	16,345
Parvimonas micra	7,052
Streptococcus porci	2,347
Peptoniphilus harei	2,039

> [Front Microbiol.](#) 2022 Jul 14;13:943441. doi: 10.3389/fmicb.2022.943441. eCollection 2022.

Improving the Diagnosis of Bacterial Infections: Evaluation of 16S rRNA Nanopore Metagenomics in Culture-Negative Samples

Coralie Bouchiat ^{1 2}, Christophe Ginevra ³, Yvonne Benito ¹, Tiphaine Gaillard ^{1 4},
Hélène Salord ¹, Olivier Dauwalder ¹, Frédéric Laurent ^{1 2}, François Vandenesch ^{1 2}

- Extraction ADN du prélèvement
- Amplification d'un fragment de 480 paires de base du gène 16S
 - Software Epi2Me → Data analysis and bioinformatics



Coralie
BOUCHIAT



Tiphaine
ROUSSEL-GAILLARD

Diagnostic bactériologique des infections ostéo-articulaires

IOA connues et patients suspects d'IOA

35 prélèvements

(tissu, biopsie, liquide articulaire)

Cultures **16 +**

(10 mono / 6 polymicrobiens)

Cultures **19 -**

PCR 16S rRNA

Sanger sequencing

Vs

Minlon metagenomics sequencing

Analyse:

Identification bactérienne

Analyse du délai de rendu

Diagnostic des IOA : Métagénomique 16S – MinION

Pour les 6 prélèvements polymicrobiens en culture

Culture result	PCR 16S + Seq Sanger	Metagenomique 16S MinION
<i>P. Mirabilis + E. coli + E. faecalis</i>	Uninterpretable	<i>P. mirabilis + E. coli + E. faecalis + Prevotella + Bacteroides</i>
<i>S. aureus + Anaerococcus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus + Anaerococcus</i>
<i>S. dysgalactiae/S. aureus/ anaerobic flora</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i>
<i>S. aureus + P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus + P. aeruginosa</i>
<i>S. aureus + C. striatum</i>	Uninterpretable	<i>S. aureus + C. striatum</i>
<i>S. aureus + S. mitis/oralis</i>	Uninterpretable	<i>Streptococcus spp + Veillonella + Peptoniphilus</i>

Performance +++ de la métagénomique 16S MinION

Capacité à identifier les pathogènes au cours des infections polymicrobiennes +++

Diagnostic des IOA : Métagénomique 16S – MinION

Pour des prélèvements ininterprétables en PCR 16S - Sanger

Sample type / Context	PCR 16S seq Sanger	Métagénomique 16S seq MinION
Bone tissue	Uninterpretable	<i>Peptoniphilus + S. agalactiae + Anaerococcus</i>
Bone biopsy (firearm injury)	Uninterpretable	<i>Serratia spp + Klebsiella spp + Corynebacterium spp</i>
Bone biopsy	Uninterpretable	<i>F. nucleatum + Tannerella + B. pyogenes</i>
Bone biopsy	Uninterpretable	<i>Porphyromonas + F. nucleatum + Tannerella + S. aureus/haemolyticus/simiae</i>
Bone biopsy (tibial)	Uninterpretable	<i>S. sanguinis/mitis/oralis + Lactococcus + H. parainfluenzae</i>

Diagnostic des IOA : Métagénomique "Shotgun"

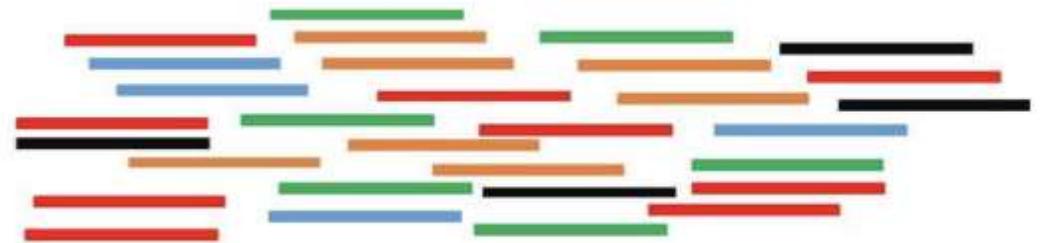
Génomes des microorganismes présents dans l'échantillon



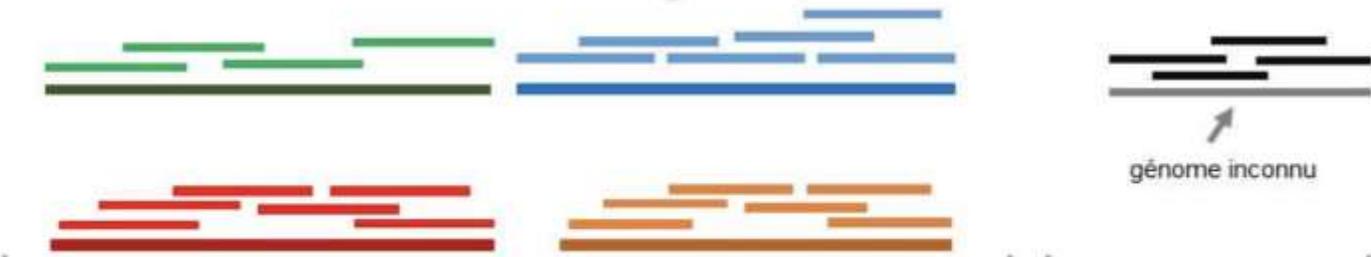
Extraction ADN



Fragmentation



Séquençage



Assemblage et alignement sur des génomes référencés dans les bases de données

Assemblage et nouvelle annotation

génomme inconnu

- Identification
 - + gènes de résistance + virulence + ...
- Analyse génétique complexe (Pipeline+++)
- Équipement spécifique
 - séquenceur ILLUMINA
- Délai **2-3 jours** ouvrés
- Coût +++
- Contamination et seuil de positivité

Diagnostic des IOA : Métagénomique "Shotgun"

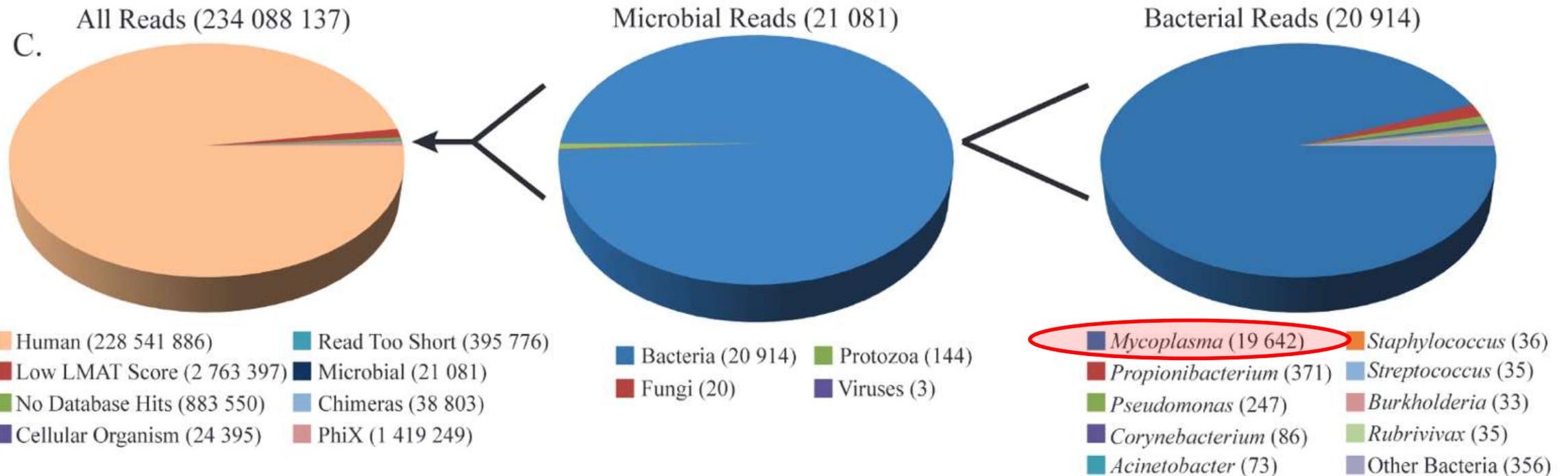
Métagénomique
SHUTGUN
directement sur prélèvement

Clinical Infectious Diseases

BRIEF REPORT

A Novel Prosthetic Joint Infection Pathogen, *Mycoplasma salivarium*, Identified by Metagenomic Shotgun Sequencing

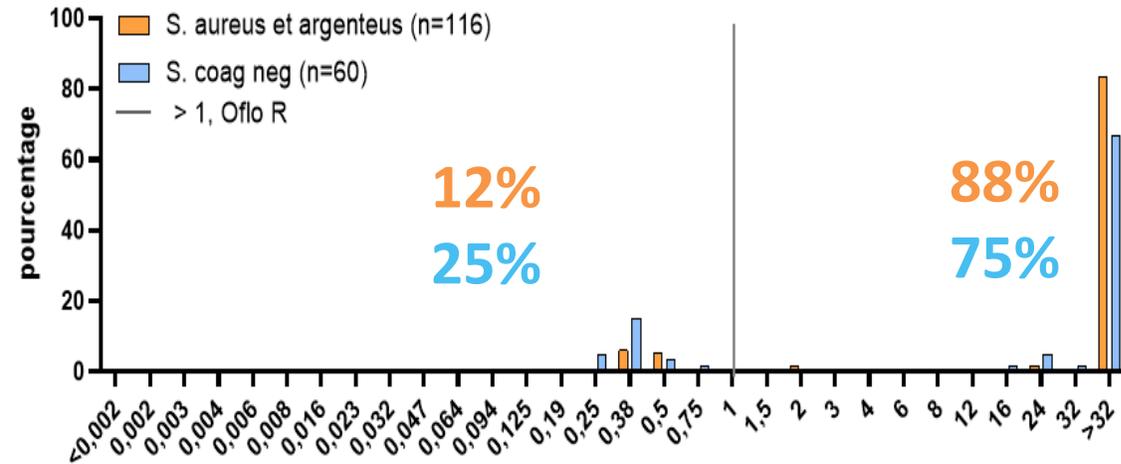
Matthew Thoendel,¹ Patricio Jeraldo,² Kerryl E. Greenwood-Quaintance,³ Nicholas Chia,² Matthew P. Abdel,⁴ James M. Steckelberg,¹ Douglas R. Osmon,¹ and Robin Patel^{1,3}



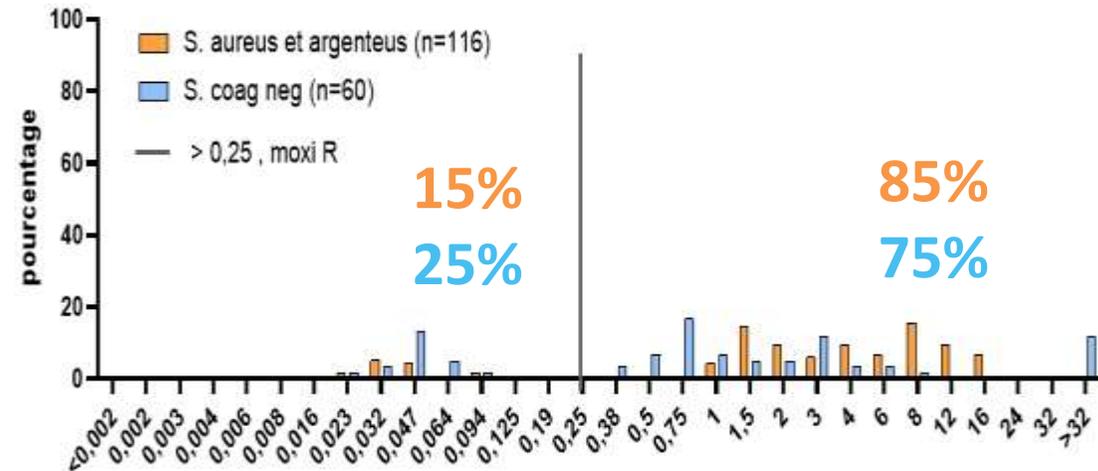
CMI délafloxacine et IOA à SA et SCN

176 souches IOA SA et SCN - CRIOAc

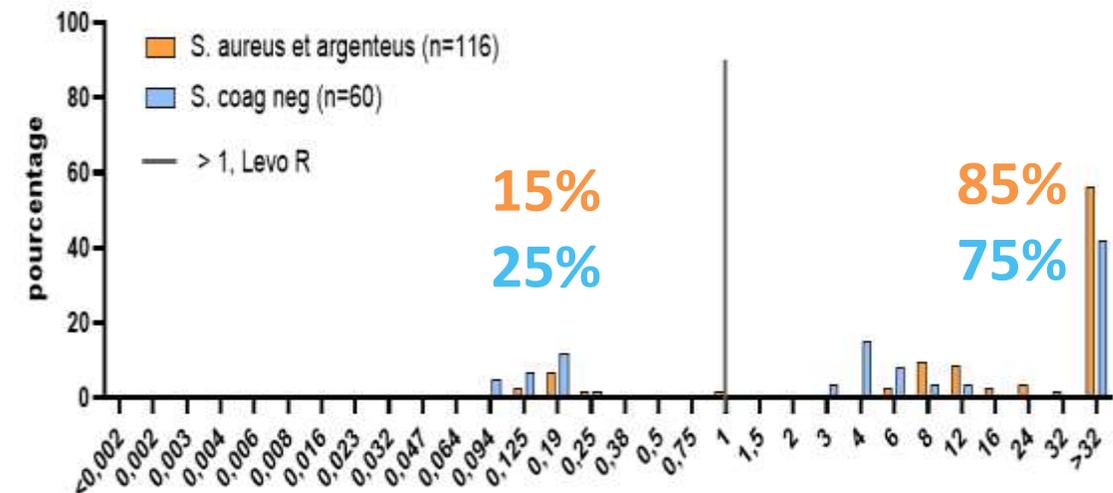
Distribution des CMI ofloxacine



Distribution des CMI moxifloxacine

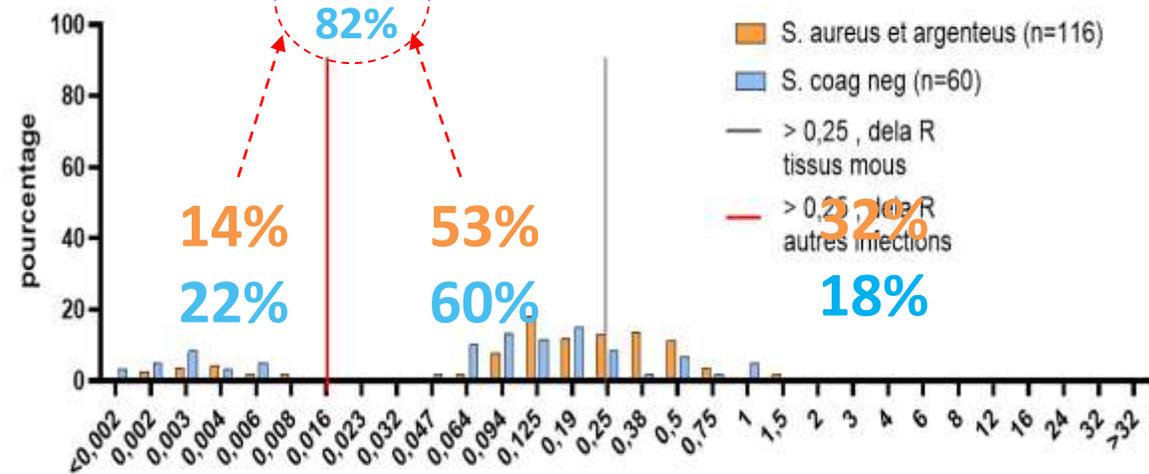


Distribution des CMI levofloxacine



CMI

Distribution des CMI delafloxacine



CMI



Céline Dupieux



Angélique Sion



Jerome Josse



Florent Valour

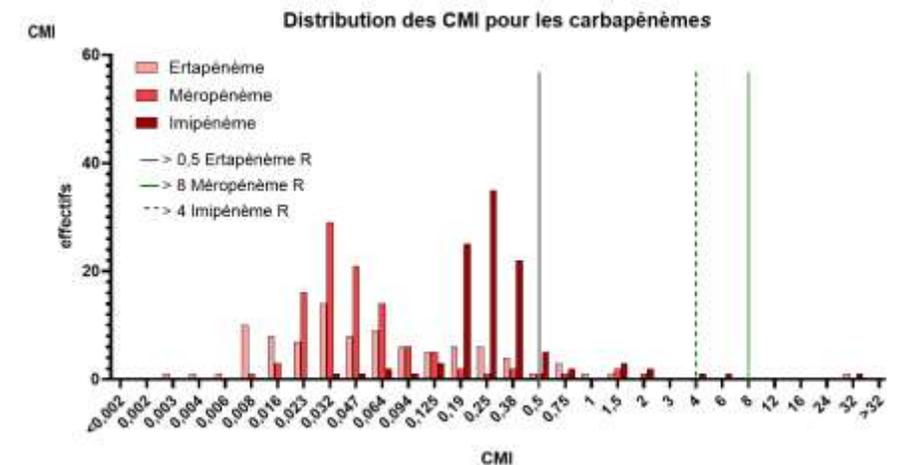
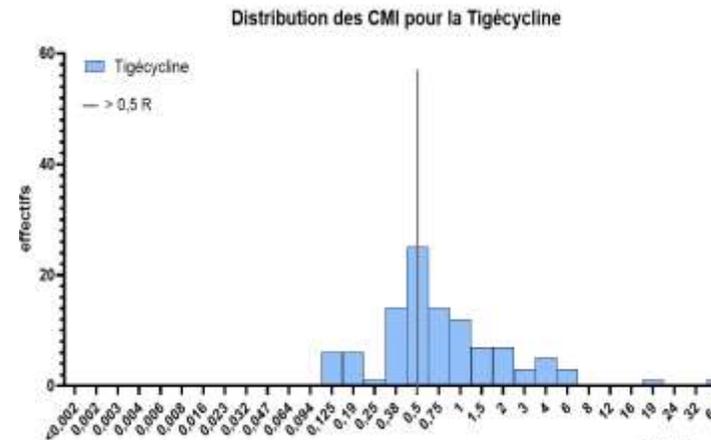
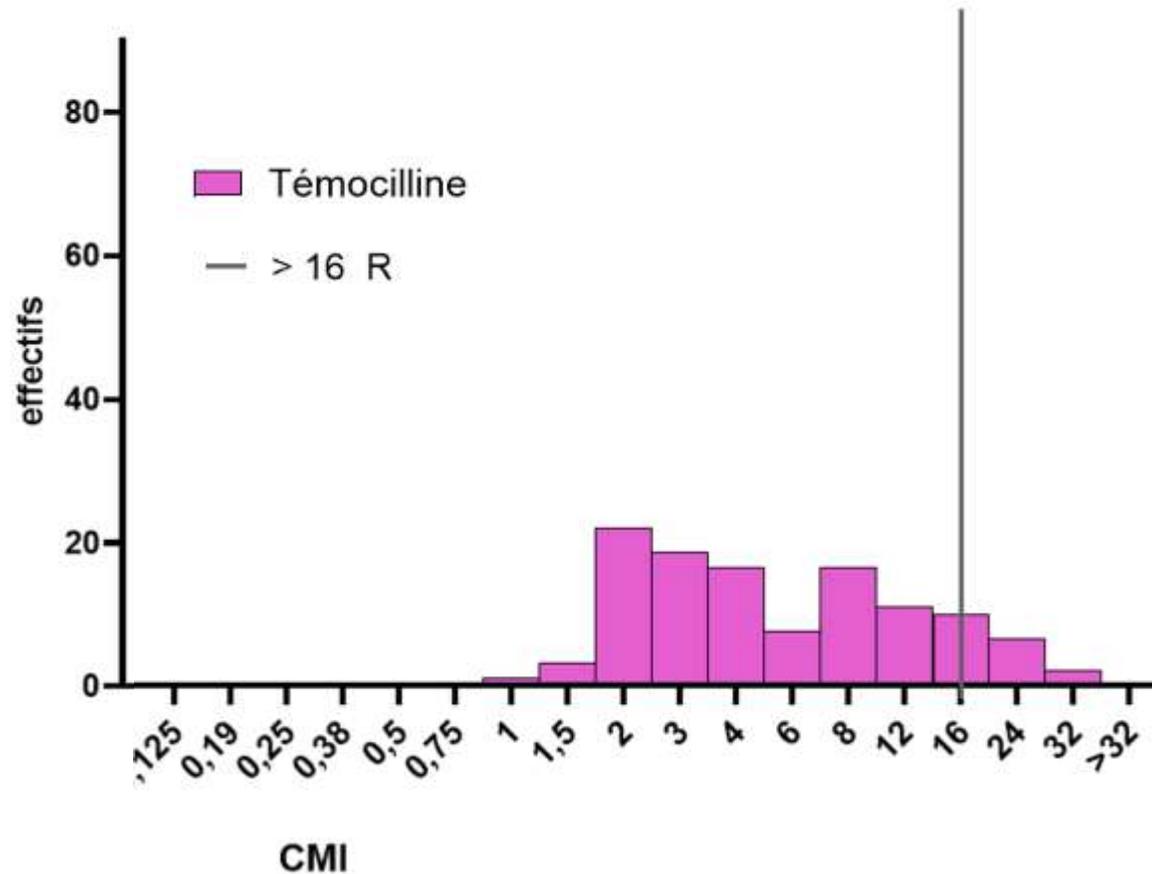
Souches d'IOA Résistantes à au moins une C3G BLSE-HRCASE hors EPC
 Activité Témocilline vs carbanénèmes délafloxacine levofloxacine, etc ...



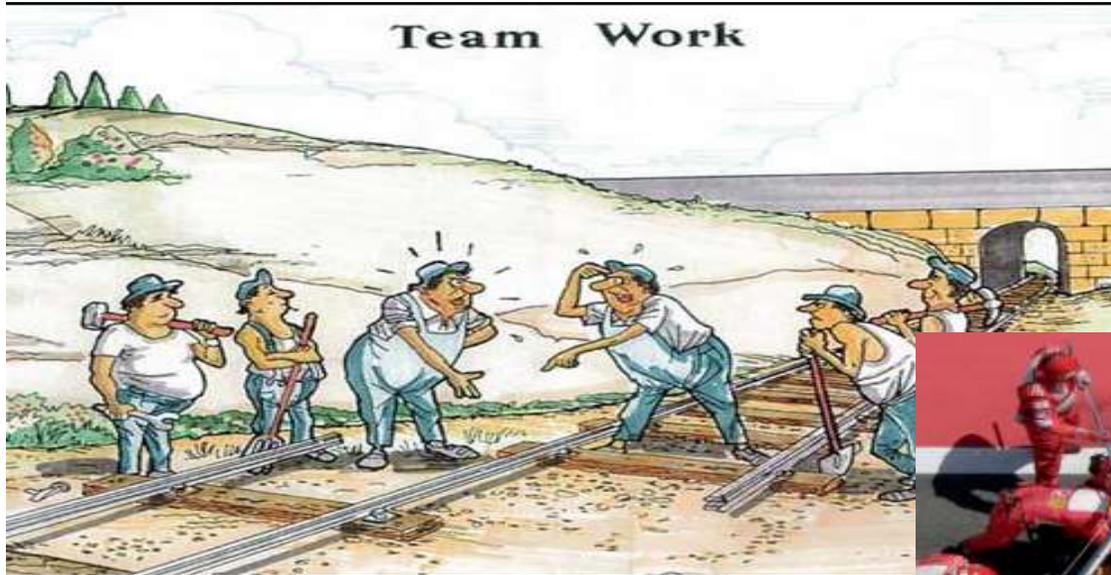
Sandrine Boisset



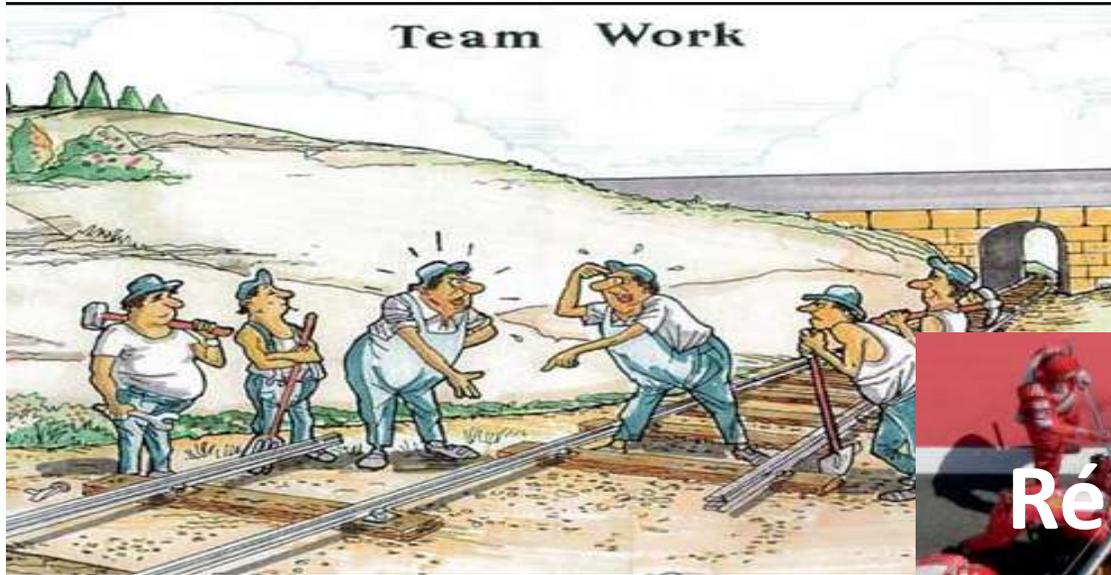
Anne Carricajo



Prise en charge des infections ostéo-articulaires



Prise en charge des infections ostéo-articulaires



Coming together is a beginning, staying together is progress, and working together is success.

(Henry Ford)