

DIU Infections ostéo-articulaires 2019

7 mars 2019

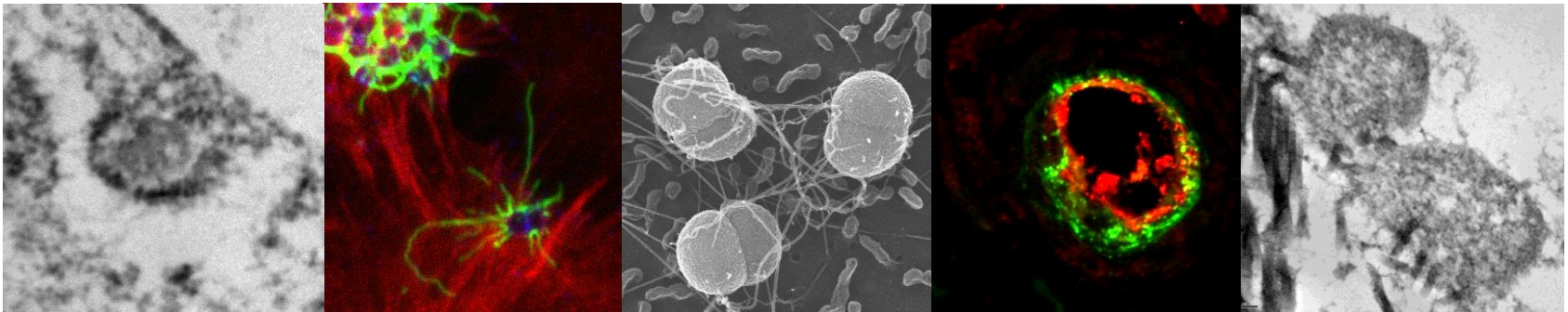
Diagnostic microbiologique des IOA

... et le NGS ?

Philippe Morand

Hôpital Cochin - HUPC - APHP

Université Paris-Descartes



Détection de l'agent étiologique (diagnostic direct)

Sensibilité aux antibiotiques

Typage / épidémiologie

Etude du pouvoir pathogène

Apport du Laboratoire : NGS ?

Next Generation Sequencing

- séquençage d'ADN
(... mais possible aussi pour ARN / reverse transcriptase)
- différentes technologies



Illumina
(>>> 2x300bp)



Ion Torrent
(>>> 400bp)



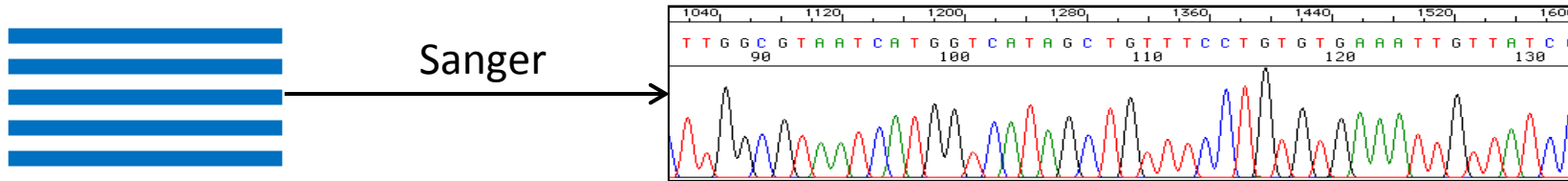
Nanopore
MinION
(>>> 100**k**b)



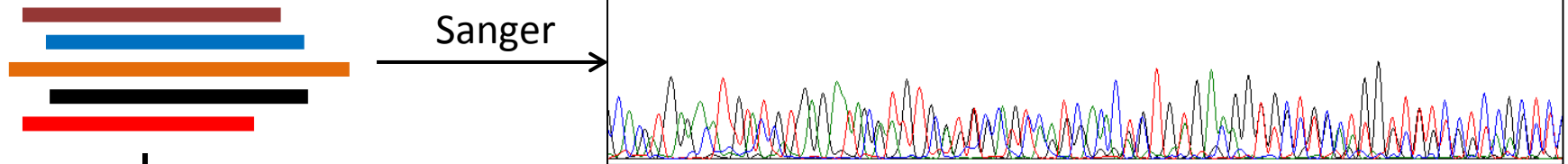
Pacific
Biosciences
(>>> 60**k**b)

Apport du Laboratoire : pourquoi le NGS ?

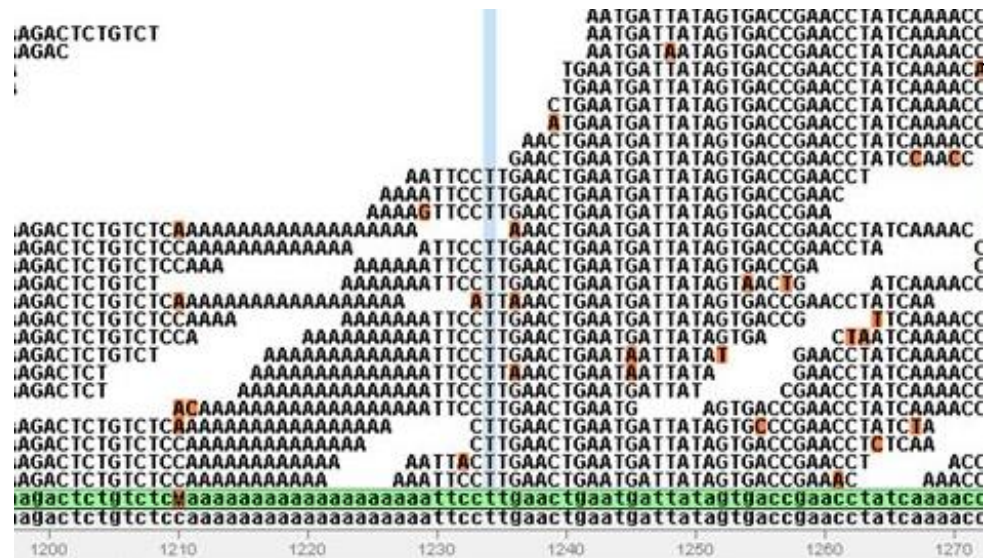
Brins d'ADN identiques



Brins d'ADN différents



NGS

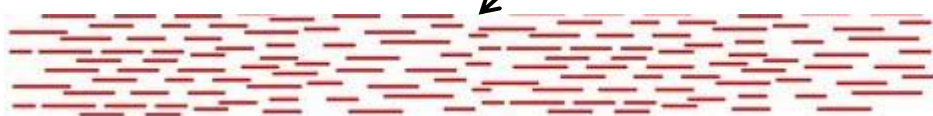


profondeur

NGS – shotgun / NGS - amplicon

Shotgun

>>> Analyse de l'ensemble de l'ADN de l'échantillon



PCR (16S ou autre)

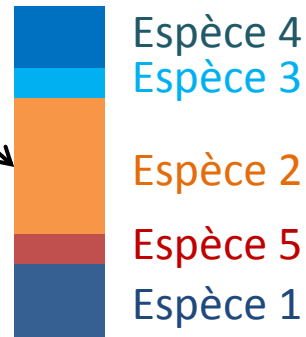
>>> Analyse des amplicons uniquement



séquençage

```
ATCGGTACTAGACGATAGTAGCTGTAGACT
TAGTAGCTGTAGACTATCGGTAAGACGA
GCTGTAGACTAGACGATAGTATCGGTACTA
GACTAGGGTACACGAGCTGTATAGTATCTA
GAGCTTACACGTATGACTAGGGAGTATCTA
TGACTAGAGCTTAGGGAGTATCTCACGTAA
```

Interrogation bases de données
>>> Assignment à une espèce



diagnostic microbiologique et IOA : NGS shotgun

Référence	Echantillons	Technologie NGS	Concordance avec culture +	Discordances
Street <i>et al</i> J Clin Micr 2017	97 sonicats PJI	Illumina	88% (species level)	<i>Fusobacterium</i> , <i>Finnegoldia</i> , <i>Parvimonas</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. acnes</i> etc
Ruppé <i>et al</i> Nat Sci Rep 2017	24 culture positive IOA	Illumina	Monomicrobial : 100% Polymicrobial : 58%	<i>C. acnes</i> +++ (contaminant ?) 273 bacteria not found in culture (91 contaminants)
Ivy <i>et al</i> J Clin Micr 2018	168 liquides articulaires (PTK)	Illumina	81%	<i>Staphylococcus sp</i> <i>Afipia sp</i> <i>Finnegoldia sp</i> etc
Thoendel <i>et al</i> Clin Inf Dis 2018	Sonicats PJI 213 pat. infectés 195 non infectés	Illumina	95%	Anaerobies ++ Mycobactéries <i>S. aureus</i>

diagnostic microbiologique et IOA : NGS shotgun

Avantages

Approche « large spectre » bactéries + champignons + virus + parasites (+ humain)

Analyse polymicrobienne

Mise en évidence d'agents pathogènes :

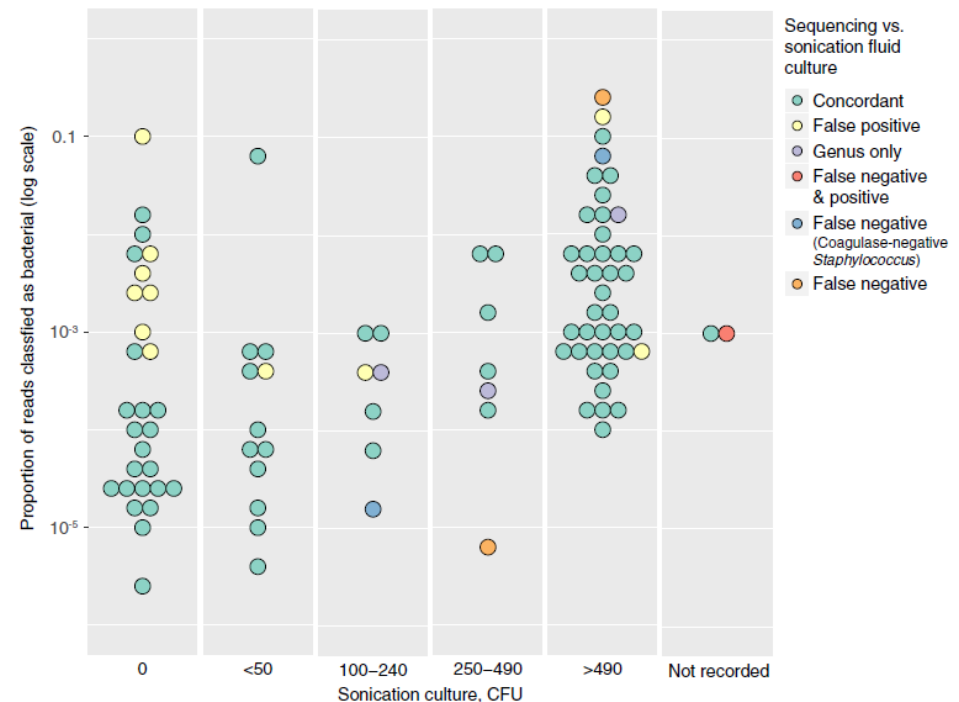
- à croissance difficile : *Afipia*, anaérobies, etc
- non recherchés en culture classique : mycobactéries (ex *M. bovis*)
- culture inhibée (antibiotiques) : *S. aureus*, etc

Limites

Coût

Interprétation difficile

- contaminations par ADN bactérien +++
- Présence d'ADN humain
- quantification
- nombre / proportion de « reads utiles »



diagnostic microbiologique et IOA : NGS amplicon

Exemple :

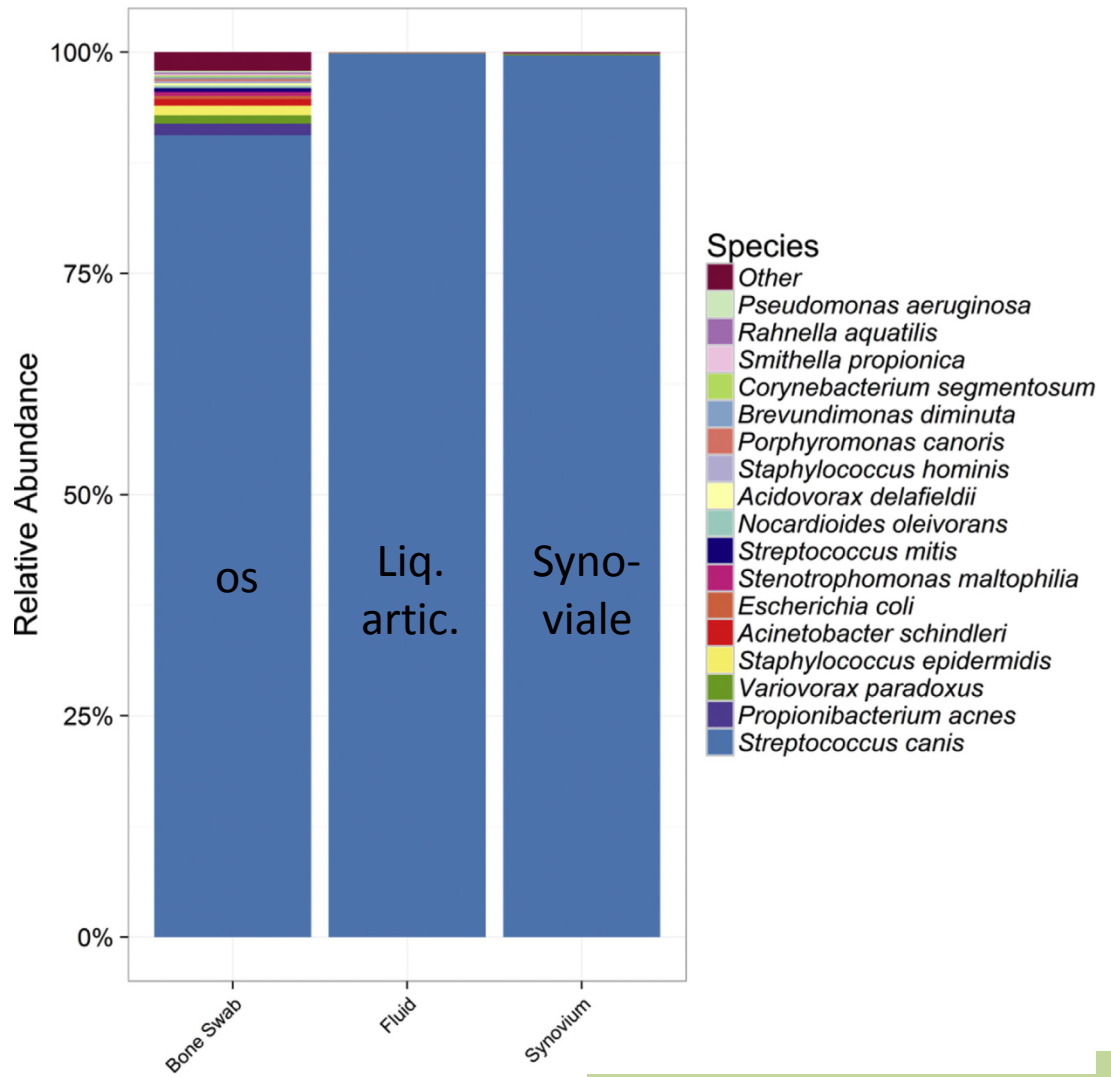
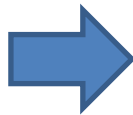
- Prothèse de genou (3 ans)
- Culture négative

- Os
- Liquide articulaire
- Synoviale

↓
PCR 16S

↓

NGS



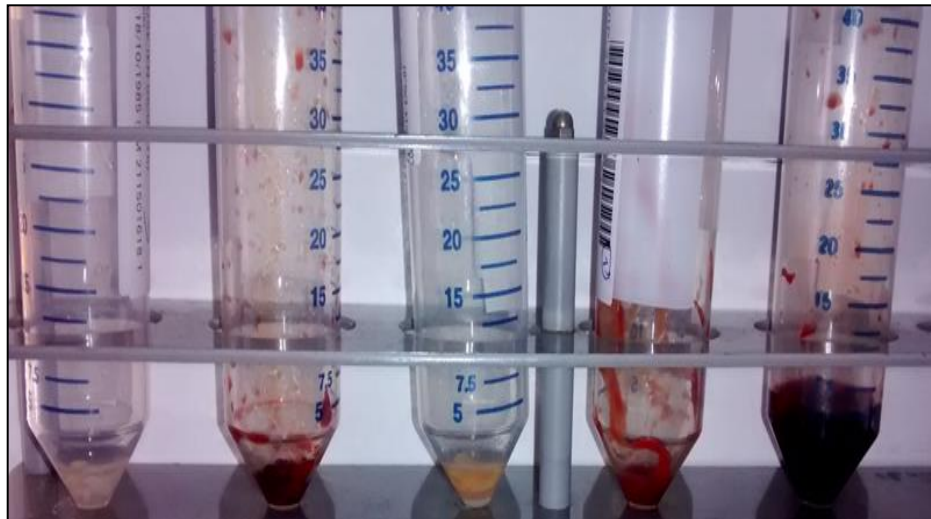
(Tarabichi, Arthr Today 2018
Namdari J Shoulder Elbow Surg 2019
Sabat, SciRep 2017
Abayasekara, BMC Inf Dis 2017)

**>>> Diagnostic :
Infection à *S. canis***

diagnostic microbiologique et IOA : NGS amplicon

Exemple : Etude expérimentale à Cochin (Thèse d'exercice de Thibaud Delerue)

- 10 prélèvements
- Culture positive
- Plurimicrobiens (ou suspectés de l'être)
- **Comparaison Culture / 16S-Sanger / 16S-NGS**

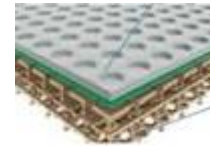


Patient	Prélèvement	Contexte clinique
1	Vis de pied	Fistulisation cutanée sur vis post hallux valgus
2	Tissu au contact de la prothèse	Reprise prothèse de hanche post cancer de la branche ilio-pubienne avec fistulisation vaginale.
3	Fausse membrane	Reprise tumeur sacro-coccygienne
4	Prélèvement au contact du périoste	Abcès sous périoste de la jambe
5	Hématome profond cuisse droite	Sarcome de la cuisse
6	Os pubien droit	Ostéite, désarticulation post tumorale
7	Abcès hanche	Tumeur de cuisse avec fistulisation cutanée
8	Hématome sous cutané bras droit	Reprise de tumeur des parties molles du bras avec ostéomyélite.
9	Hématome sténose lombaire	Hématome post arthrodèse T4
10	Os orteil pied droit	Ostéite avec mal perforant plantaire chez un diabétique

diagnostic microbiologique et IOA : NGS amplicon

Etude expérimentale à Cochin

- Technologie : Ion Torrent



6 millions de puits.

- Kit ION 16S™ METAGENOMICS



- ❑ 6 couples d'amorces, 8 des 9 régions hypervariables.
- ❑ PCR multiplex → amplifiats de 210-295 pb

diagnostic microbiologique et IOA : NGS amplicon

Exploitation des résultats

Résultats après analyse pour un échantillon

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
Primer	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	% ID	Count	DB	counters	F:R %	% of total re	% of valid re	% of mapped reads
(consensus)	Actinobacteri	Actinobacteri	Actinomycet	Actinomycet	(family level ID only)			10	00:10			0	0	0
(consensus)	Actinobacteri	Actinobacteri	Actinomycet	Brevibacteri	Brevibacteri	(slash calls)		79	79:00:00			0.02	0.02	0.03
(consensus)	Actinobacteri	Actinobacteri	Actinomycet	Corynebacte	Corynebacte	(slash calls)		234	234:00:00			0.05	0.06	0.09
(consensus)	Actinobacteri	Actinobacteri	Actinomycet	Corynebacte	Corynebacte	sp.	100 - 100	12	00:12	100:00:00		0	0	0
(consensus)	Actinobacteri	Actinobacteri	Actinomycet	Corynebacte	Corynebacte	tuberculo	99.54 - 100	115	115:00:00	38.26 : 61.74	0.02	0.03	0.05	
(consensus)	Actinobacteri	Actinobacteri	Actinomycet	Microbacteri	Microbacteri	(slash calls)		11	11:00			0	0	0
(consensus)	Actinobacteri	Actinobacteri	Actinomycet	Microbacteri	Microbacteri	ginsengisoli	100 - 100	40	40:00:00	32.5 : 67.5	0.01	0.01	0.02	
(consensus)	Actinobacteri	Actinobacteri	Actinomycet	Micrococcac	Micrococcac	(slash calls)		45	45:00:00			0.01	0.01	0.02
(consensus)	Actinobacteri	Actinobacteri	Actinomycet	Micrococcac	Arthrobacter	(slash calls)		11	00:11			0	0	0
(consensus)	Actinobacteri	Actinobacteri	Actinomycet	Nocardioida	Marmoricola	(slash calls)		31	31:00:00			0.01	0.01	0.01
(consensus)	Actinobacteri	Actinobacteri	Actinomycet	Propionibact	Propionibact	acnes	99.58 - 100	358	264 : 94	29.33 : 70.67	0.07	0.09	0.14	
(consensus)	Actinobacteri	Actinobacteri	Actinomycet	Williamsiace	Williamsiace	(slash calls)		10	10:00			0	0	0
(consensus)	Actinobacteri	Thermoleop	Solirubrobac	Conexibacte	(family level ID only)			11	00:11			0	0	0
(consensus)	Bacteroidete	Bacteroidia	Bacteroidale	Bacteroidace	(family level ID only)			50	00:50			0.01	0.01	0.02
(consensus)	Bacteroidete	Bacteroidia	Bacteroidale	Bacteroidace	Bacteroides	(genus level ID only)		145	0,10069444			0.03	0.04	0.06
(consensus)	Bacteroidete	Bacteroidia	Bacteroidale	Bacteroidace	Bacteroides	(slash calls)		12	00:12			0	0	0
(consensus)	Bacteroidete	Bacteroidia	Bacteroidale	Bacteroidace	Bacteroides	dorei	100 - 100	34	34:00:00	41.18 : 58.82	0.01	0.01	0.01	
(consensus)	Bacteroidete	Bacteroidia	Bacteroidale	Bacteroidace	Bacteroides	fragilis	99.09 - 100	12106	11960 : 146	55.54 : 44.46	2.4	3.13	4.87	
(consensus)	Bacteroidete	Bacteroidia	Bacteroidale	Prevotellace	Prevotella	bivia	99.44 - 100	40	00:40	57.5 : 42.5	0.01	0.01	0.02	
(consensus)	Bacteroidete	Bacteroidia	Bacteroidale	Prevotellace	Prevotella	buccalis	99.44 - 99.44	14	00:14	0,06944444		0	0	0.01
(consensus)	Bacteroidete	Flavobacteri	Flavobacteri	Flavobacteri	(family level ID only)			40	00:40			0.01	0.01	0.02
(consensus)	Bacteroidete	Flavobacteri	Flavobacteri	Flavobacteri	(slash calls)			41	00:41			0.01	0.01	0.02
(consensus)	Bacteroidete	Flavobacteri	Flavobacteri	Flavobacteri	Cloacibacter	normanense	99.44 - 99.44	25	25:00:00	100:00:00		0	0.01	0.01
(consensus)	Bacteroidete	Sphingobact	Sphingobact	Sphingobact	Pedobacter	piscium	100 - 100	41	41:00:00	56.1 : 43.9	0.01	0.01	0.02	

Identifications à partir des séquences

→ Précision ? Significativité ?

diagnostic microbiologique et IOA : NGS amplicon

Etude expérimentale à Cochlin

Concordance Culture / 16S-NGS

Prélèvement	Culture	PCR 16S-Sanger	PCR 16S-NGS
4 Périoste	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
9 Hématome lombaire	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Enterococcus faecalis</i> + contaminants
10 Os orteil	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus lugdunensis</i> <i>Corynebacterium striatum</i> <i>Escherichia coli</i>	ininterprétable	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp. <i>Enterobacteriaceae</i> + contaminants

diagnostic microbiologique et IOA : NGS amplicon

Etude expérimentale à Cochlin

16S-NGS plus sensible que la culture

Prélèvement	Culture	PCR 16S-Sanger	PCR 16S-NGS
1 Vis pied	<i>Helcoccoccus kunzii</i> <i>Finegoldia magna</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus simulans</i>	ininterprétable	Anaerococcus vaginalis <i>Helcoccoccus kunzii</i> <i>Finegoldia magna</i> <i>Staphylococcus</i> sp. + contaminants
3 Fausse membrane	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	ininterprétable	<i>Enterobacteriaceae</i> (dont <i>S. marcescens</i> et <i>K. pneumoniae</i>) Bacteroides fragilis + contaminants
6 Os pubien	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonadaceae</i> Anaerococcus vaginalis <i>Enterobacteriaceae</i> (dont <i>P. mirabilis</i>) + contaminants
8 Hématome	<i>Eikenella corrodens</i> <i>Aggregatibacter aphrophilus</i> <i>Streptococcus intermedius</i>	ininterprétable	Prevotellaceae Fusobacterium sp. Porphyromonas endodontalis <i>Streptococcus intermedius</i> <i>Eikenella corrodens</i> <i>Aggregatibacter aphrophilus</i>

diagnostic microbiologique et IOA : NGS amplicon

Etude expérimentale à Cochlin

Bactéries non retrouvées en 16S-NGS

Prélèvement	Culture	PCR 16S-Sanger	PCR 16S-NGS
2 Contact prothèse	<i>Escherichia coli</i> Flore anaérobie <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus warnerii</i> *	ininterprétable	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Prevotella bivia</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Vibrionaceae</i> <i>Veillonellaceae</i>
3 Fausse membrane	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Enterococcus faecalis</i> *	ininterprétable	<i>Enterobacteriaceae</i> (dont <i>S. marcescens</i> et <i>K. pneumoniae</i>) <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Staphylococcus</i> sp. + contaminants
5 Hématome cuisse	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	ininterprétable	<i>Enterobacteriaceae</i> (dont <i>P. mirabilis</i> , <i>Escherichia/Shigella</i> et <i>Morganella</i> sp.)
6 Os pubien	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i> *	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonadaceae</i> <i>Anaerococcus vaginalis</i> <i>Enterobacteriaceae</i> (dont <i>P. mirabilis</i>) + contaminants
7 Absès hanche	<i>Morganella morganii</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> (dont <i>M. morganii</i>) <i>Propionibacterium acnes</i> + contaminants

Contamination de culture ou faible inoculum bactérien ?

Etude expérimentale à Cochin

Contaminations

	Culture	PCR 16S-Sanger	PCR 16S-NGS
Liquide articulaire non enrichi	Stérile	Négatif	<i>Oxalobacteraceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Pseudomonadaceae</i> <i>Xanthomonadaceae</i> <i>Halomonadaceae</i> <i>Comamonadaceae</i>
NaCl 0.85% Biomerieux®	Non effectué	Négatif	<i>Oxalobacteraceae</i> <i>Flavobacteriaceae</i> <i>Pseudomonadaceae</i> <i>Xanthomonadaceae</i> <i>Halomonadaceae</i> <i>Comamonadaceae</i>

→ Liquide articulaire « de contrôle » contaminé par NaCl « stérile »

Conclusion

NGS : Evolutions technologiques majeures

- Diagnostic
- Susceptibilité aux agents anti-bactériens
- Typage
- Épidémiologie
- Physiopathologie

Limites

- Mise en œuvre complexe
 - Personnel spécialisé
 - Coût
 - Interprétation difficile +++
- Implémentation en routine ?

Perspectives

- Standardisation des techniques
- Rapport coût-efficacité
- Changements dans la prise en charge des patients

merci