

Quelles aides au diagnostic d'IOA peut apporter le laboratoire de microbiologie en 2020

Matthieu Le Scouarnec

Laboratoire de Bactériologie et Hygiène

Réunion bibliographique du CRIOGO

1^{er} Juillet 2020

Sommaire

- Introduction
 - Méthodes usuelles d'identification bactérienne
 - Place de la sérologie : exemple d'un kit multiplex
 - Techniques de biologie moléculaire
 - PCR 16S
 - PCR multiplex : exemple du kit Unyvero
 - NGS (Next Generation Sequencing)
 - Conclusion
-

Introduction

- Les IOA, en particulier les infections sur prothèse, sont souvent diagnostiquées selon un faisceau d'arguments cliniques, d'imagerie, de marqueurs moléculaires, histologiques et microbiologiques

Mais dans l'idéal, un ou plusieurs germes doivent être isolés

- Confirme l'infection
- Conditionne l'antibiothérapie
- Intérêt pronostic

~2% des arthroplasties de hanche et de genou vont se compliquer d'infection (Kurtz 2012 J. Arthroplasty)

Introduction

Difficultés : Cas des infections retardées, avec des germes à croissance lente parfois peu virulents et difficiles à identifier

- Biofilm
- Germes qui ne poussent pas sur les milieux de culture usuels

Ex : Mycoplasmes, Mycobactéries, *Coxiella Burnetii* etc

- Ou plus difficilement que d'autres bactéries

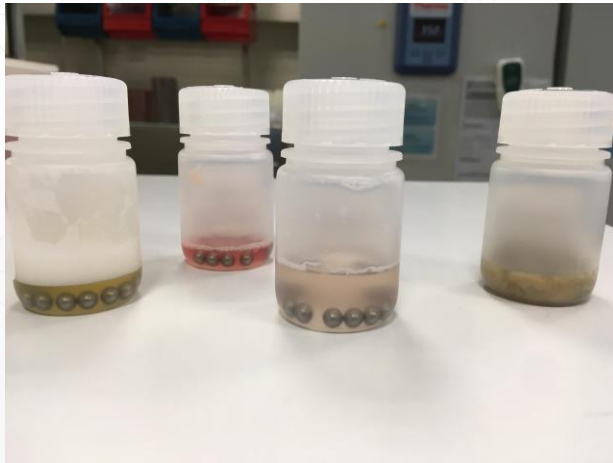
Ex : *Cutibacterium acnes*, *Finnegoldia magna*, *Peptostreptococcus sp*, fungi, *Listeria monocytogenes* etc

→ Difficultés de traitement et d'identification

→ Quelles techniques sont les plus efficaces aujourd'hui pour pallier ces difficultés?

Méthodes usuelles d'identification bactérienne

- **Cultures :**
- Dans l'idéal 4 prélèvements; en cas d'infection sur prothèse, le liquide articulaire et des prélèvements à l'interface os/prothèse sont d'intérêt
- Mise en culture de milieux gélosés standard (gélose au sang, gélose chocolat) et d'un milieu liquide anaérobie. Incubation longue 14 jours



Méthodes usuelles d'identification bactérienne



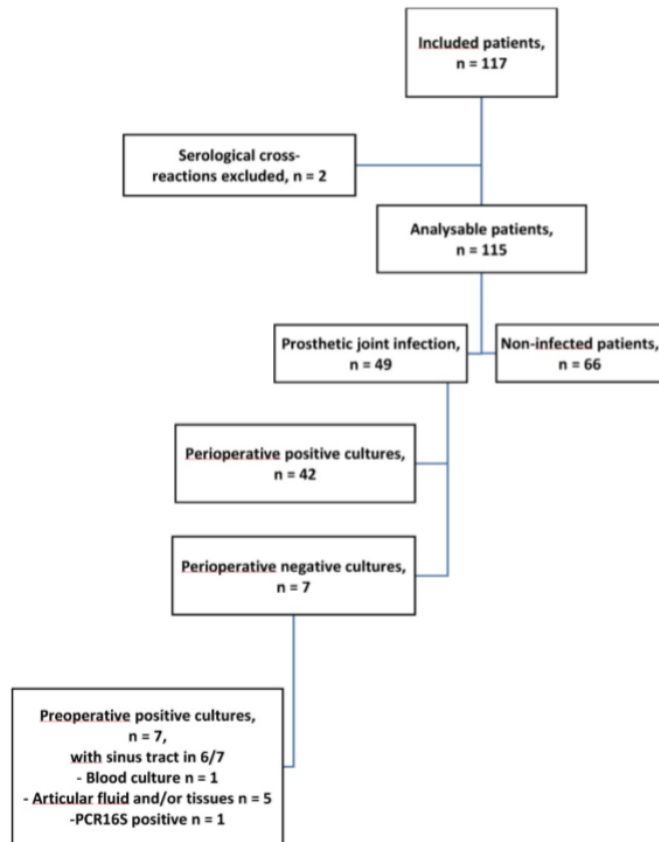
L'ensemencement de flacons d'hémoculture après broyage (déstructuration du biofilm) des prélèvements augmente la sensibilité analytique

- Certains centres utilisent la sonication. L'étude des liquides de sonication avait montré une meilleure sensibilité que les cultures standard sans broyage (Trampuz 2007).
 - Hémocultures à réaliser en parallèle, en particulier en cas de signes généraux
-

Méthodes usuelles d'identification bactérienne

- Cependant la sensibilité des cultures bactériennes reste imparfaite :
 - **10,7 % des cultures en cas d'infection de prothèse de hanche restent négatives** dans la zone CRIOGO avec le broyage pré-culture (Bemer & al, CRIOGO 2016)
 - 85% de ces infections à culture négative concernent les infections >3 mois (Malekzadeh 2010 Clin Orthop RR)
 - Malgré la certitude d'une infection de prothèse articulaire sur des critères cliniques (fistule), purulence du site péri-prothétique, critères anatomopathologiques ainsi que des signes inflammatoires, on peut être parfois dans l'incapacité d'identifier le germe responsable de l'infection :
 - Décapitation préalable par une antibiothérapie
 - Utilisation non optimale des méthodes microbiologiques disponibles
 - Utilisation adéquate mais germes difficiles à isoler
-

Test sérologique multiplex : BIJ InoPlex® Diaxonhit



- Bemer & al 2020 prospective multicentrique
- Ne teste que les IgG → Pas de datation d'infection; Pas utile en cas d'infection aiguë
- *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.lugdunensis*, *S.agalactiae*, *C.acnes*
- 16 antigènes recombinants sont greffés à la surface de microbilles en suspension qui sont mises en contact avec l'échantillon du patient dans un puits unique.

Table 1. Baseline characteristics of the study population

	Total (N = 115)	Uninfected (n = 66)	Infected (n = 49)	p value
Age (years), median (IQR)	69 (63-78)	71 (63-78)	68 (62-79)	0.969
Male sex	57 (49.6)	29 (43.9)	28 (57.1)	0.161
Immunosuppressive therapy	8/114 (7)	4/65 (6.2)	4/49 (8.2)	0.678
Rheumatoid arthritis	4/114 (3.5)	2/65 (3.1)	2/49 (4.1)	0.773
Recent or ongoing antibiotic therapy	11/113 (9.7)	3/65 (4.6)	8/48 (16.7)	0.033
Hospitalization within 3 months	14/106 (13.2)	3/62 (4.8)	11/44 (25.0)	0.003
Site of prosthesis				
Hip	77 (67.0)	47 (71.2)	30 (61.2)	0.300
Knee	34 (29.6)	18 (27.3)	16 (32.6)	
Shoulder	4 (3.5)	1 (1.5)	3 (6.1)	
Time since insertion of the prosthesis (years), median (IQR)	8 (3-18)	13 (4-21)	6 (2-10)	0.001
Sinus tract	16 (13.9)	0	16 (32.6)	<0.0001
CRP ≥10 mg/L ^a	45/111 (40.5)	10/64 (15.6)	35/47 (74.5)	<0.0001
CRP (mg/L), median (IQR)	6 (1-19)	2.7 (1-6.6)	19 (7.8-32.4)	<0.0001

Values are number (%) except where indicated otherwise. IQR, interquartile range;

^aMissing data for 4 patients; total population 111.

Figure 1. Flow chart of the study.

Test sérologique multiplex : BIJ InoPlex® Diaxonhit

Table 2. Microbial species involved in the preoperative or perioperative samples

Documentation of bacterial PJI	All sites	Hip	Knee	Shoulder
Monomicrobial sepsis, n = 43				
<i>Staphylococcus aureus</i>	13 ^a	9	3	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	5	3	1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	1	0	0
Other coagulase-negative staphylococci ^b				
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1	0	0
<i>Streptococcus/Enterococcus spp</i> ^c	5	4	1	0
<i>Cutibacterium acnes</i>	2	1	1	0
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	1	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1	0	0
<i>Mycobacterium bovis</i>	1	0	1	0
Polymicrobial sepsis (n = 6)				
<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>C. acnes</i>	1	0	0	1
<i>S. lugdunensis</i> , <i>Fingoldia magna</i>	1	0	1	0
<i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	1	0	0
<i>S. epidermidis</i> , <i>F. magna</i>	1	0	1	0
<i>S. capitis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	1	1	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>S. dysgalactiae</i>	1	0	1	0
Total	49	30	16	3

^aPCR 16S positive for *S. aureus*, n = 1. ^b*S. capitis*, n = 5; *S. warneri*, n = 2; *S. saprophyticus*, n = 1. ^c*S. dysgalactiae*, n = 1; *S. mitis/oralis*, n = 1; *S. mutans*, n = 1; *E. faecalis*, n = 2.

Table 3. Performances of serological tests according to cultures

Bacterial species	Infected patients (n = 49)		Uninfected patients (n = 66)		Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
	TP	FN	TN	FP				
Targeted Staphylococci (n=112) ^a	21	7	69	15	75 (21/28)	82.1 (69/84)	58.3 (21/36)	90.8 (69/76)
<i>Streptococcus agalactiae</i> (n=112) ^a	1	0	108	3	NA	97.3 (108/111)	NA	100 (108/108)
<i>Cutibacterium acnes</i> (n=114) ^a	0	3	93	18	NA	83.8 (93/111)	NA	96.9 (93/96)

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; TP, true positive; FP, false positive; TN, true negative; FN, false negative. NA, not available.

^aOne indeterminate result excluded from the analysis.

Bonne VPN. Intérêt en complément de la biologie moléculaire en cas de germes potentiellement contaminants?

Autres études :

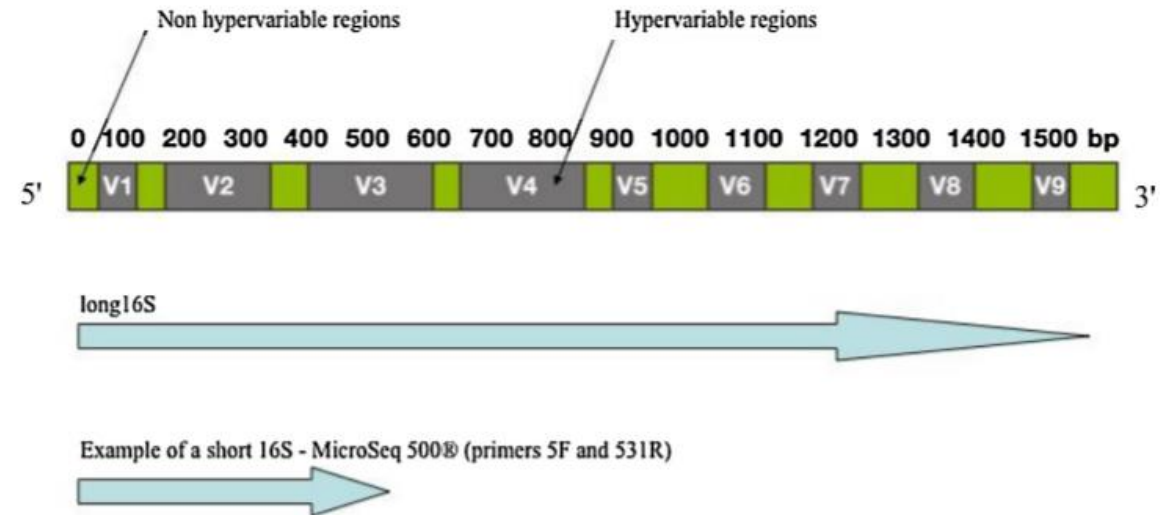
Marmor et al. (Se 72.3% Spe 80.7%)

De Seynes et al. (Se 87.5% et Spe 93.5%)

Techniques de biologie moléculaire : PCR 16S

- Amplification de l'ADN codant pour la sous unité 16S de l'ARNr bactérien
- Gène « universel » codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal bactérien (ARNr)
- Structure très conservée au cours de l'évolution des bactéries

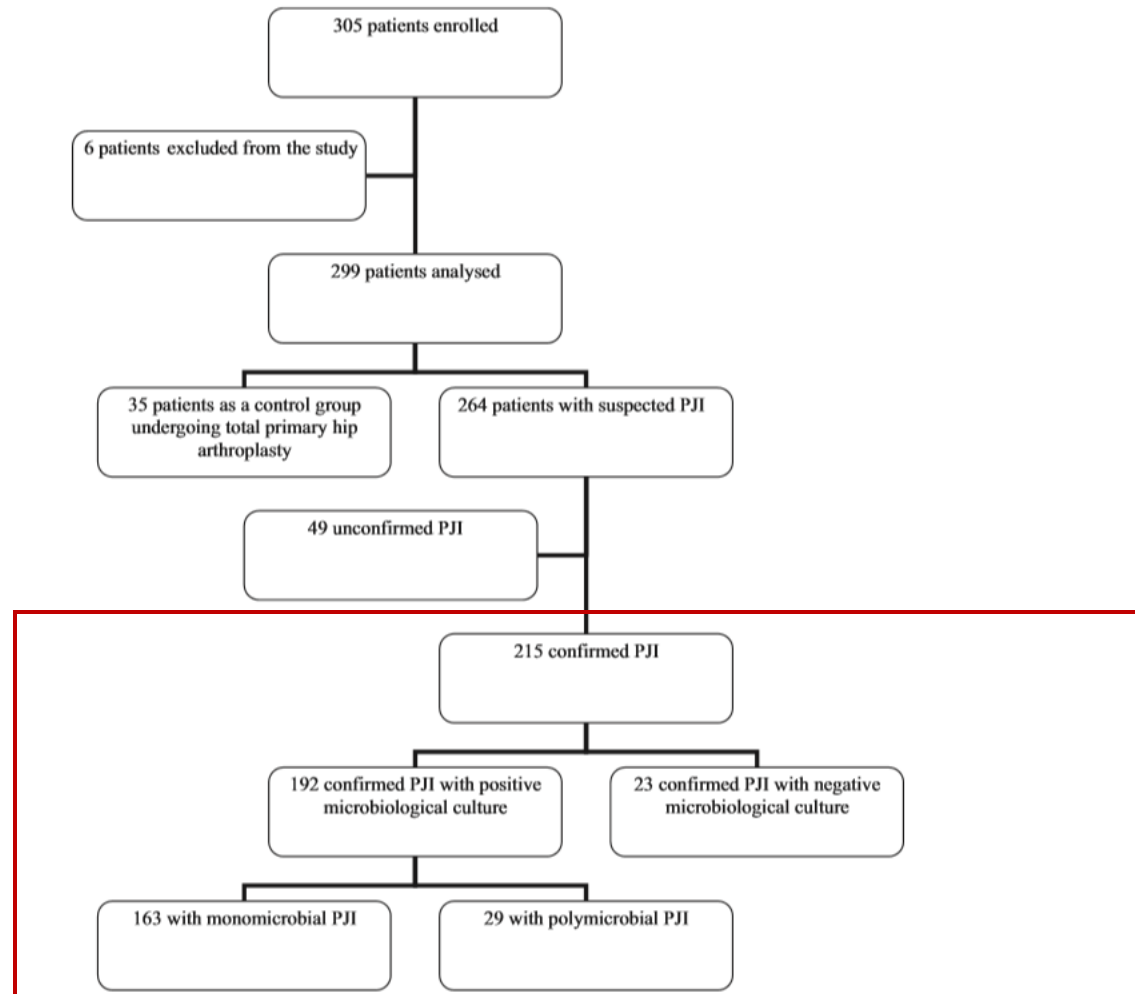
A. Remvoisé et al. / Médecine et maladies infectieuses 43 (2013) 322–330



Techniques de biologie moléculaire : PCR 16S

AVANTAGES	INCONVENIENTS
<ul style="list-style-type: none">• Identification malgré une décapitation par un traitement antibiotique	<ul style="list-style-type: none">• Sensibilité pas meilleure que celle de la culture
<ul style="list-style-type: none">• Large spectre	<ul style="list-style-type: none">• Pas d'information sur les mécanismes de résistance
<ul style="list-style-type: none">• Bonne valeur prédictive positive; meilleure spécificité que la culture	<ul style="list-style-type: none">• Identification de germes contaminants (contamination au moment du prélèvement / lors de l'analyse)
	<ul style="list-style-type: none">• Temps de disponibilité des résultats assez long
	<ul style="list-style-type: none">• Problème de l'ADN résiduel (infection antérieure / présence d'ADN dans les liquides de lavage etc)
	<ul style="list-style-type: none">• Pas de détection des champignons; mauvaise détection des mycobactéries

Pour illustrer :



Etude prospective multicentrique;
Prothèse de hanche

Réalisation sur 5 prélèvements
périprothétiques par patient;
broyage et ensemencement en
flacons et Schaedler

FIG 1 Flow chart of enrolled patients. Six patients were excluded for the following reasons: inclusion criteria not met ($n = 4$), microbiological protocol not respected ($n = 1$), and patient included twice ($n = 1$). The 35 control patients had negative culture results. The 49 unconfirmed cases of PJI had no clinical, bacteriological, or histological evidence.

Bemer, Plouzeau et al. 10/2014

Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest (CRIOGO) Study Team

Se 73.3% IC95%[66,7-79,2]
vs Se 89% pour la culture
Spe 95.5% IC95% [84.5-99.4%]

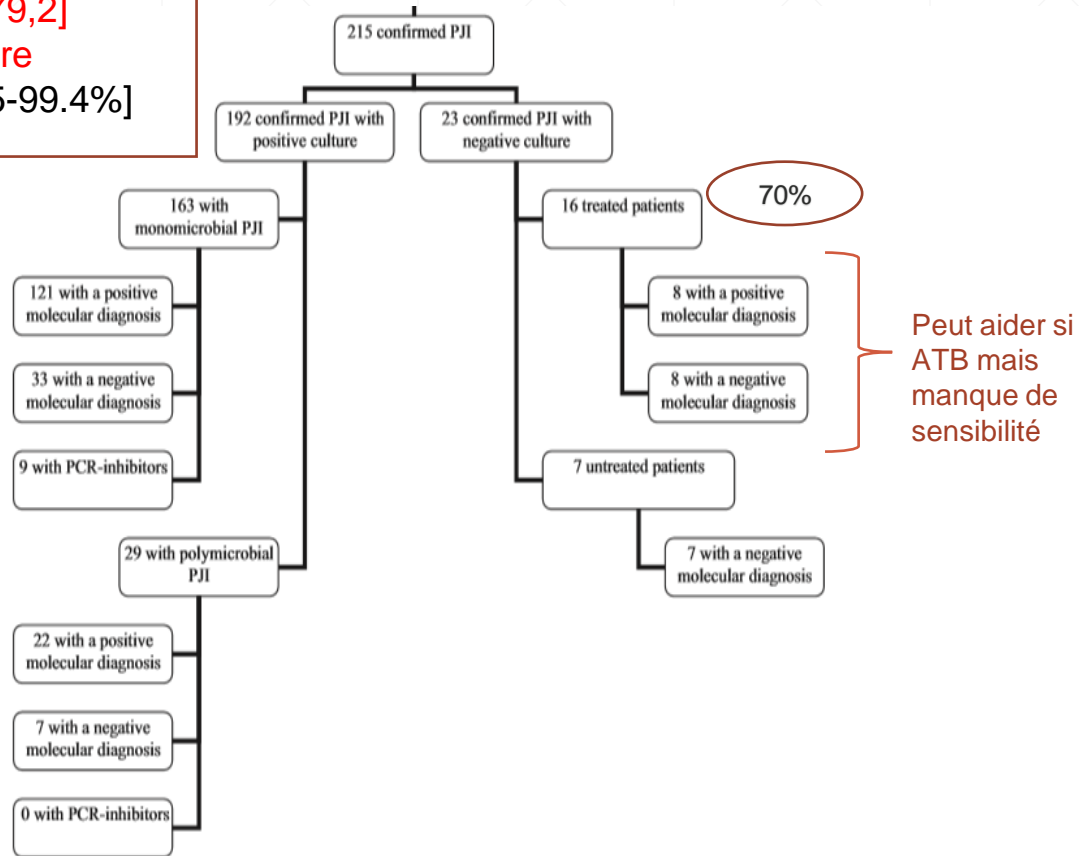


FIG 2 Molecular results. The 49 unconfirmed cases of PJI had no clinical, bacteriological, or histological evidence. Two patients with positive PCR results for *Listeria monocytogenes* or *Staphylococcus aureus* had been treated with antibiotics several months previously for PJIs caused by these bacteria. The diagnosis of 215 cases of PJI was confirmed according to guidelines.

Bémer et al.

TABLE 2 Results of 16S rRNA gene PCR assays and cultures for 192 microbiologically documented infections

Organism	No. (%)		
	Microbiologically documented PJI	Available PCR results	Positive PCR results
<i>S. aureus</i>	63 (33)	62 (34)	56 (39)
CoNS ^a	45 (23)	39 (21)	25 (17.5)
Polymicrobial infection	29 (15)	29 (16)	22 (15.5)
Streptococci ^b	19 (10)	19 (10)	19 (13)
<i>Enterococcus faecalis</i>	3 (2)	3 (2)	2 (1.5)
Gram-negative bacilli ^c	16 (8)	16 (9)	12 (8.5)
Anaerobes ^d	13 (7)	11 (6)	4 (3)
Other ^e	4 (2)	4 (2)	3 (2)
Total	192	183^f	143

^a *S. epidermidis*, n = 31; *S. lugdunensis*, n = 6; *Staphylococcus capitis*, n = 4; *Staphylococcus simulans*, n = 2; *Staphylococcus caprae*, n = 1; *Staphylococcus haemolyticus*, n = 1.

^b *S. agalactiae*, n = 7; *Streptococcus dysgalactiae*, n = 3; *Streptococcus mitis* group, n = 4; *S. milleri* group, n = 3; *Streptococcus pneumoniae*, n = 1; *Streptococcus salivarius*, n = 1.

^c *Escherichia coli*, n = 5; *Klebsiella*, n = 3; *Enterobacter cloacae*, n = 2; *Proteus mirabilis*, n = 2; *P. aeruginosa*, n = 4.

^d *P. acnes*, n = 10; *Propionibacterium avidum*, n = 1; *Peptoniphilus asaccharolyticus*, n = 1; *Parvimonas micra*, n = 1.

^e *Listeria monocytogenes*, n = 2; *Corynebacterium amycolatum*, n = 1; *Bacillus cereus*, n = 1.

^f Nine patients demonstrated PCR inhibitors.

Dans les prélèvements plurimicrobiens :

TABLE 3 Comparison of 16S rRNA gene PCR assay and culture results for 29 polymicrobial infections

Culture results	No. of infections	No. with available PCR results			Negative
		1 bacterium	2 bacteria ^a	Uninterpretable ^b	
2 bacteria	22 ^c	14	1	2	5
3 bacteria	3 ^d	2			1
4 bacteria	4 ^d	3			1
Total	29	19	1	2	7

^a One patient had 1 sample positive by PCR for *Staphylococcus aureus* and another sample positive for *Streptococcus oralis*.

^b Results were uninterpretable because of unreadable sequences.

^c Twenty-two polymicrobial infections involved 2 different bacteria, i.e., 2 different staphylococcal species ($n = 3$), staphylococci with anaerobes ($n = 5$), staphylococci with *Enterobacteriaceae* ($n = 5$), staphylococci with *P. aeruginosa* ($n = 1$), staphylococci with streptococci or enterococci ($n = 4$), staphylococci with corynebacteria ($n = 2$), *E. coli* with *P. aeruginosa* ($n = 1$), or *Finnegoldia magna* with *Anaerococcus vaginalis* ($n = 1$).

^d Seven polymicrobial infections were due to 3 or 4 bacteria, involving Gram-positive cocci in association with Gram-negative bacilli and anaerobes.

Bemer, Plouzeau et al. 10/2014

Centre de Référence des Infections
Ostéo-articulaires du Grand Ouest
(CRIOGO) Study Team

→ Le plus souvent, identification d'un seul germe voire aucun

Techniques de biologie moléculaire : PCR multiplex : exemple du kit mPCR Unyvero i60 ITI ®

Table 2
Microorganisms of the Unyvero ITI panel

GROUP	PATHOGEN	GROUP	PATHOGEN
Universal Bacteria ²		Non-fermenting bacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Gram-positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	Anaerobes	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex ¹¹
	Coagulase-negative staphylococci ³		<i>Cutibacterium acnes</i> (<i>Propionibacterium acnes</i>)
	<i>Streptococcus</i> spp. ⁴		<i>Fingoldia magna</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		<i>Bacteroides fragilis</i> group ¹²
	<i>Streptococcus agalactiae</i>		<i>Candida</i> spp. ¹³
	<i>Streptococcus pyogenes</i> / <i>dysgalactiae</i>	Fungi	<i>Candida albicans</i>
	<i>Granulicatella adiacens</i>		<i>Candida tropicalis</i>
	<i>Abiotrophia defectiva</i>		<i>Candida glabrata</i>
	<i>Enterococcus</i> spp. ⁵		<i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>C. krusei</i>)
	<i>Enterococcus faecalis</i>		
<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i> spp. ⁶		
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>		
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex ⁷		
	<i>Proteus</i> spp. ⁸		
	<i>Klebsiella aerogenes</i> (<i>Enterobacter aerogenes</i>)		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ⁹		
	<i>Klebsiella oxytoca</i>		
	<i>Klebsiella variicola</i> ¹⁰		
	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>koseri</i>		

Table 3
Resistance markers of the Unyvero ITI panel ¹⁸

MARKER	POSSIBLE RESISTANCE	REFERENCE
<i>ermA</i>	Macrolides / lincosamides	Roberts <i>et al.</i> , FEMS Microbiol Lett, 282(2), 2008
<i>ermC</i>	Macrolides / lincosamides	Roberts <i>et al.</i> , FEMS Microbiol Lett, 282(2), 2008
<i>mecA</i>	Oxacillin / methicillin	Carvalho <i>et al.</i> , Braz J Infec Dis, 14(1), 2010
<i>mecC</i>	Oxacillin / methicillin	Katayama <i>et al.</i> , Antimicrob Agents Chemother, 44(6), 2000
<i>vanA</i>	Glycopeptides	Cetinkaya <i>et al.</i> , Clin Microbiol Rev, 13(4):686-707, 2000
<i>vanB</i>	Glycopeptides	Cetinkaya <i>et al.</i> , Clin Microbiol Rev, 13(4):686-707, 2000
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	Aminoglycosides	Shaw <i>et al.</i> , Microbiol Rev, 57(1), 1993
<i>aacA4</i>	Aminoglycosides	Shaw <i>et al.</i> , Microbiol Rev, 57(1), 1993
<i>ctx-M</i> ¹⁹	3 rd generation cephalosporins, class A	Bonnet <i>et al.</i> , Antimicrob Agents Chemother, 45(8), 2001
<i>imp</i> ²⁰	Carbapenems, class B	Kawa <i>et al.</i> , J Clin Microbiol, 34(12), 1996
<i>kpc</i> ²¹	Carbapenems, class A	Queenan <i>et al.</i> , Clin Microbiol Rev, 20(3), 2007
<i>ndm</i> ²²	Carbapenems, class B	Cornaglia <i>et al.</i> , Lancet Infect Dis, 11(5), 2011
<i>oxa-23</i>	Carbapenems, class D	Walther-Rasmussen <i>et al.</i> , J Antimicrob Chemother, 57(3), 2006
<i>oxa-24/40</i>	Carbapenems, class D	Walther-Rasmussen <i>et al.</i> , J Antimicrob Chemother, 57(3), 2006
<i>oxa-48</i> ²³	Carbapenems, class D	Walther-Rasmussen <i>et al.</i> , J Antimicrob Chemother, 57(3), 2006
<i>oxa-58</i>	Carbapenems, class D	Walther-Rasmussen <i>et al.</i> , J Antimicrob Chemother, 57(3), 2006
<i>vim</i> ²⁴	Carbapenems, class B	Cornaglia <i>et al.</i> , Lancet Infect Dis, 11(5), 2011

² More information on this analyte can be found in the text.

³ incl. *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*

⁴ incl. *S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. sanguinis*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. gordonii*

⁵ incl. *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. raffinosus*

⁶ incl. *C. jeikeium*, *C. belfanti*, *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. aurimucosum*

⁷ incl. *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*

⁸ incl. *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. penneri*, *P. hauseri*

⁹ incl. *Klebsiella pneumoniae* Cluster kp I + II, Alves *et al.*, J Clin Microbiol, 44(10), 2006; incl. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*

¹⁰ *Klebsiella variicola* (Cluster kp III; formerly *K. pneumoniae*, classified as its own species in 2004)

¹¹ incl. *A. baumannii*, *A. oleivorans*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii*

¹² incl. *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. uniformis*

¹³ More information on this analyte can be found in the text.

Techniques de biologie moléculaire : PCR multiplex; exemple du kit mPCR Unyvero i60 ITI ®

- Etude prospective multicentrique CRIOGO (Malandain, Bemer & al)
- Version 1 du kit (52 pathogènes et 19 marqueurs de résistance)
- A partir des échantillons ayant servi à l'étude précédente sur la PCR 16S

Table 1
Concordance of mPCR results compared with those obtained with culture

Culture results	mPCR results				Total	
	Concordant	Discordant				
		≥1 bacteria less	Difference in genus or species	≥1 bacteria more		Negative
Monomicrobial	101	—	3	15 ^a	132 ^b	251
Polymicrobial	1	9 ^d	—	2	13 ^c	25
Sterile	154	0	—	10	—	164
Total	256	9	3	27	145	440

- ^a 13 positive in the panel.
^b 110 positive in the panel.
^c 5 positive in the panel.
^d 7 positive in the panel.

115/145 (92%) des échantillons positifs en culture et négatifs en mPCR concernaient des germes inclus dans le panel de PCR

En lien avec un effet inoculum négatif

Techniques de biologie moléculaire : PCR multiplex : exemple du kit mPCR Unyvero i60 ITI ®

Malandain, Bemer & al

Taux de concordance avec la culture : 58%

Taux de concordance avec la PCR 16S : 70%

Taux de détection du gène *mecA* sur les souches
connues *meti-R* en culture : 35%

- Des discordances avec la culture
 - Des performances moyennes
 - Un gain de temps non négligeable vs culture
(résultat en 5 heures)
 - Performances à réévaluer sur de nouvelles versions
du kit
-

Techniques de biologie moléculaire : PCR multiplex : exemple du kit mPCR Unyvero i60 ITI ®

- Hischebeth 2016 : Cultures sur liquide articulaire pré ou péri opératoires et fluides de sonication des tissus mis en culture (y compris flacons d'hémocultures) Cultures 14 jours au total
- Prospectif - 31 patients
- Se 66.7% Spe 100% VPP 100% VPN 68.4%

Les autres études ont comme défaut de ne pas broyer les prélèvements ni ensemercer de flacons pour les cultures standard (Aamot, Sigmund 2018 & 2019, Borde, Villa, Suren...)

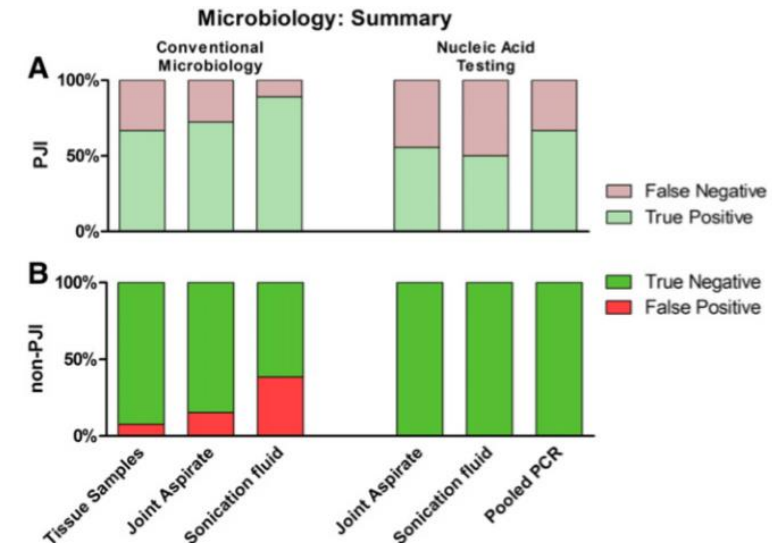
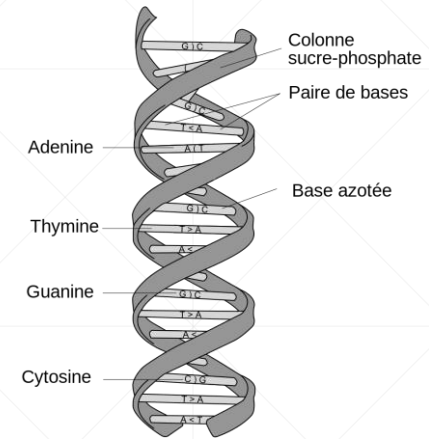


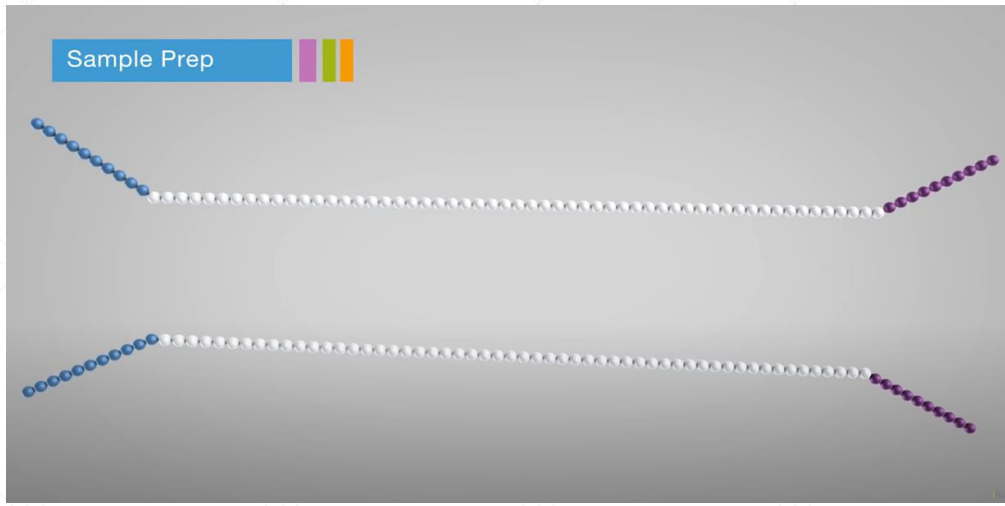
Fig. 1. Summary of microbiological methods. The graph depicts the summarized results from the patient collective. Above (A) is the group of patients matching PJI criteria, below (B) those that did not. The three left side bars represent conventional microbiology methods and the right three bars the NAT methods. False positives and false negatives are shown in red as percentage of the total. N = 31 specimen for aspirate, sonication and PCR, respectively 62 for the pooled PCR data. Per patient, 3 to 5 tissue specimens were taken, and the test was regarded positive if any one of them showed growth in culture.

NGS (Next Generation Sequencing) :

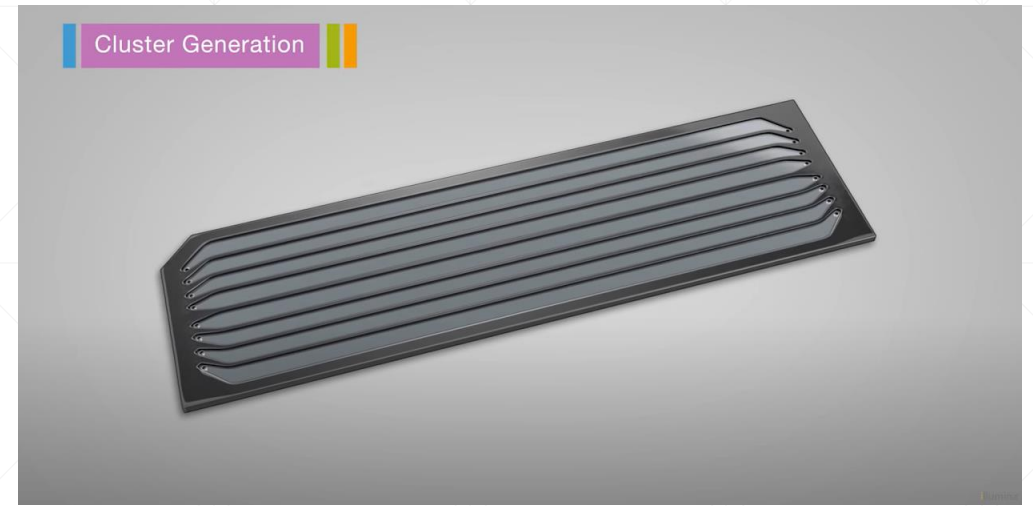
- « Metagenomic **shotgun** »



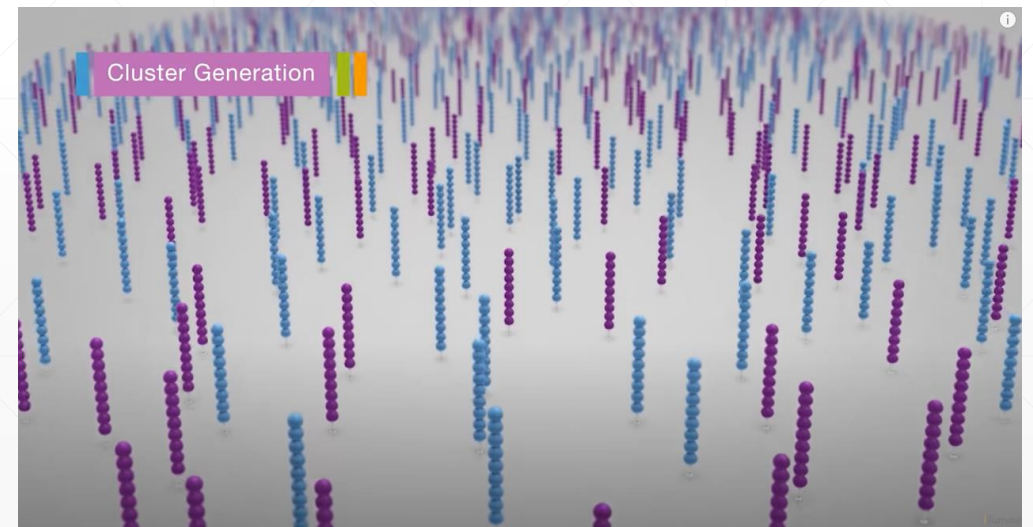
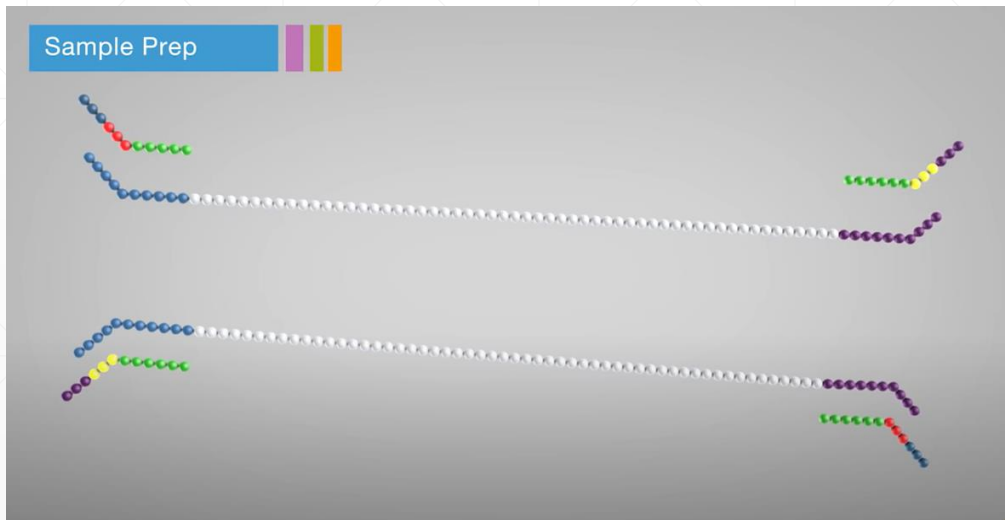
- Métagénomique : caractériser les différents génomes présents dans un échantillon
 - Plusieurs milliers de brins d'ADN sont séquençables en même temps
 - Préparation de librairie : prendre l'ADN, le casser aléatoirement en morceaux d'environ 300 pnb (« shotgun »)
-

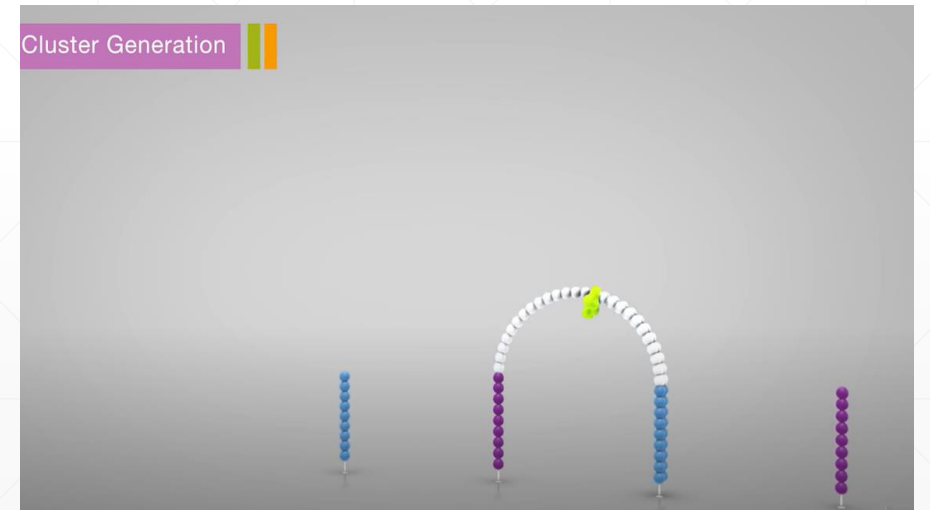
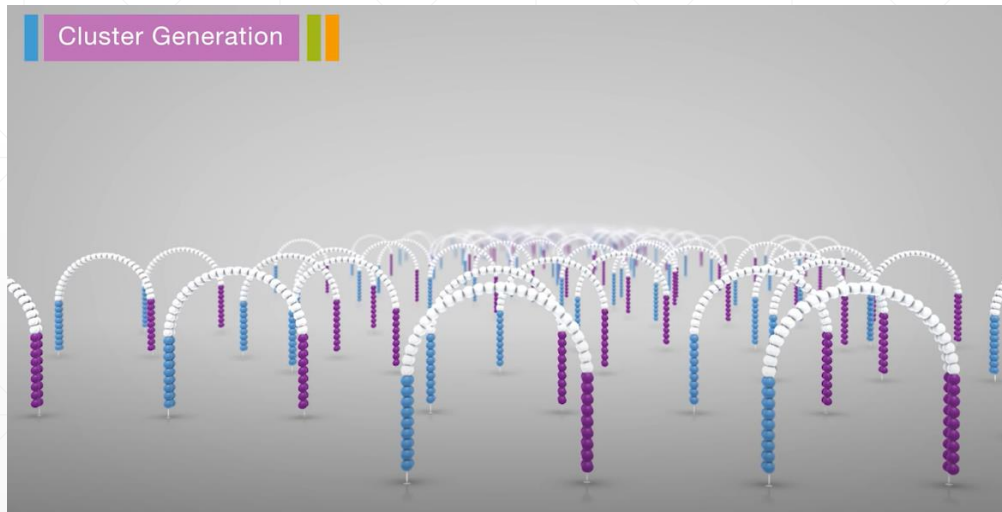
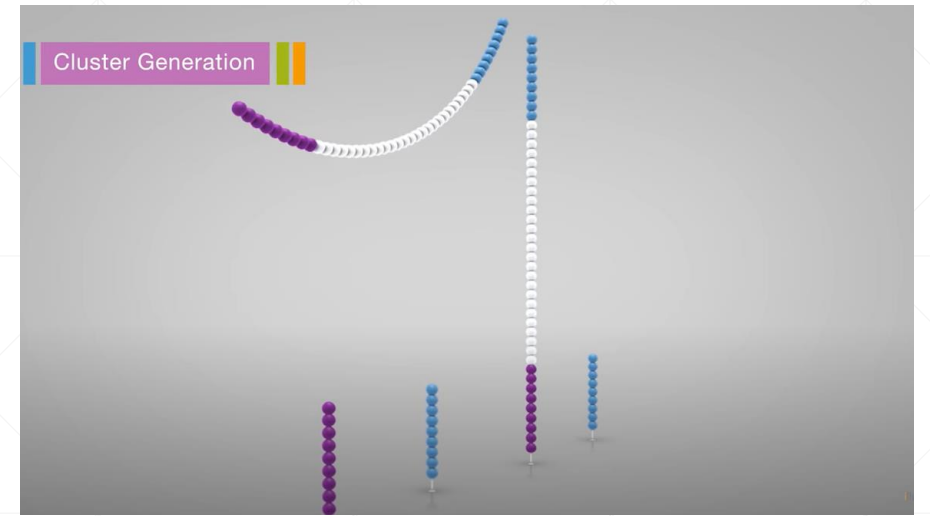
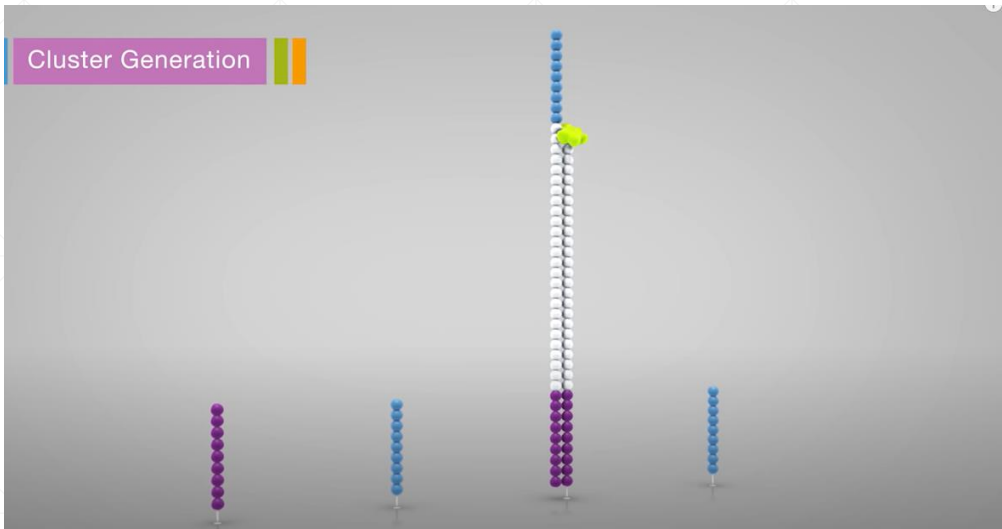


Chaque morceau est marqué avec un adaptateur aux deux extrémités

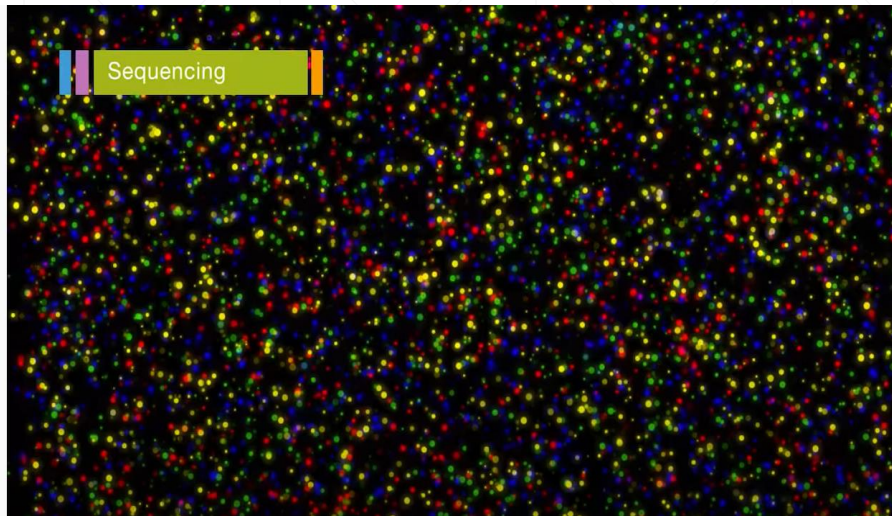
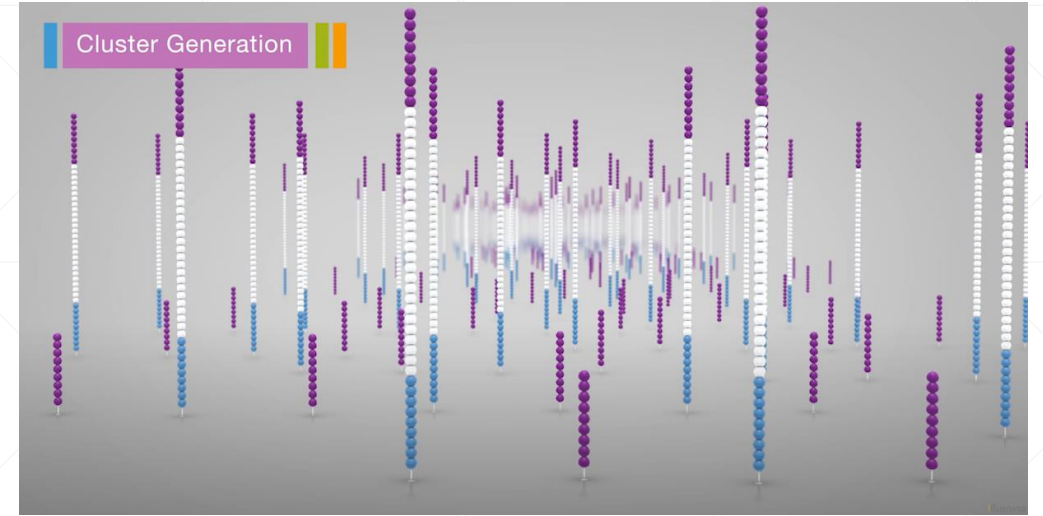
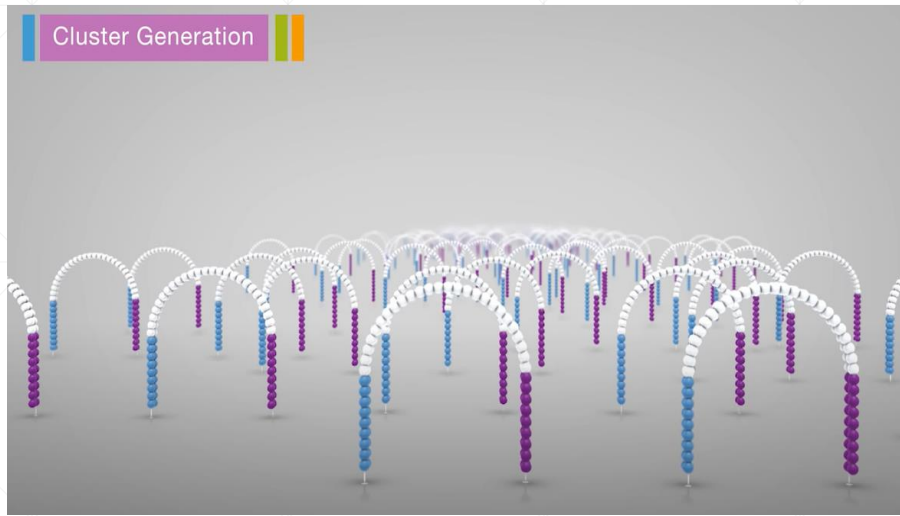


→ On obtient une banque d'ADN matrice double brin; cet ADN est ensuite dénaturé, et les simple brins vont venir se fixer aléatoirement sur le « flow cell ».

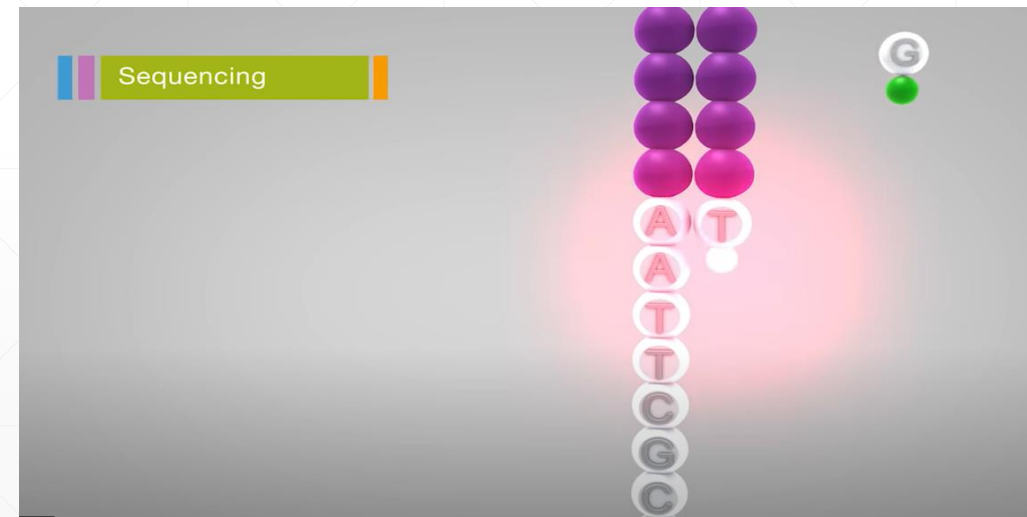




Les brins fixés au flow cell vont former des ponts en se liant aux adaptateurs complémentaires du flow cell. On réalise alors une PCR « bridge » pour former des clusters dans lesquels chaque brin est amplifié.

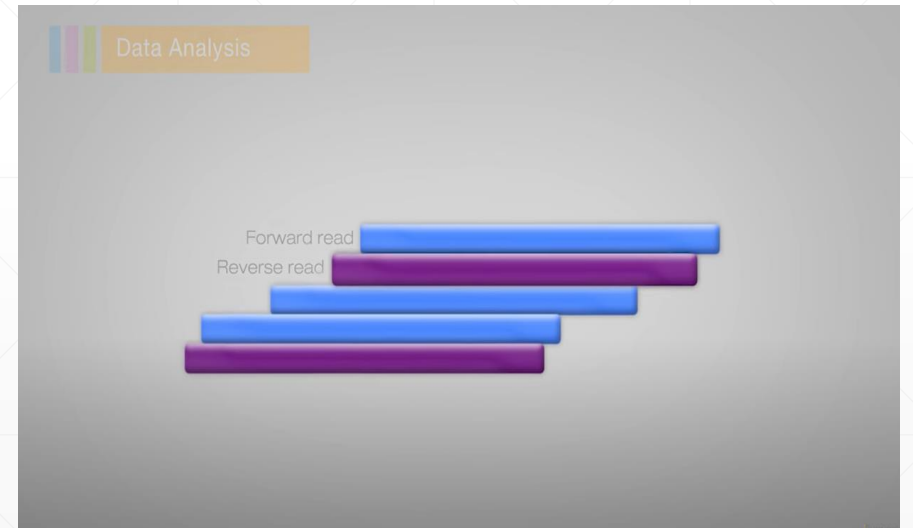
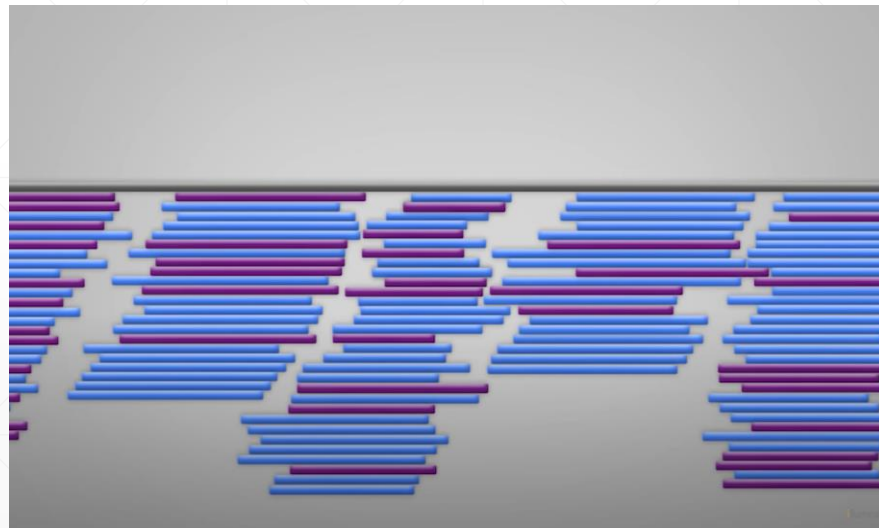
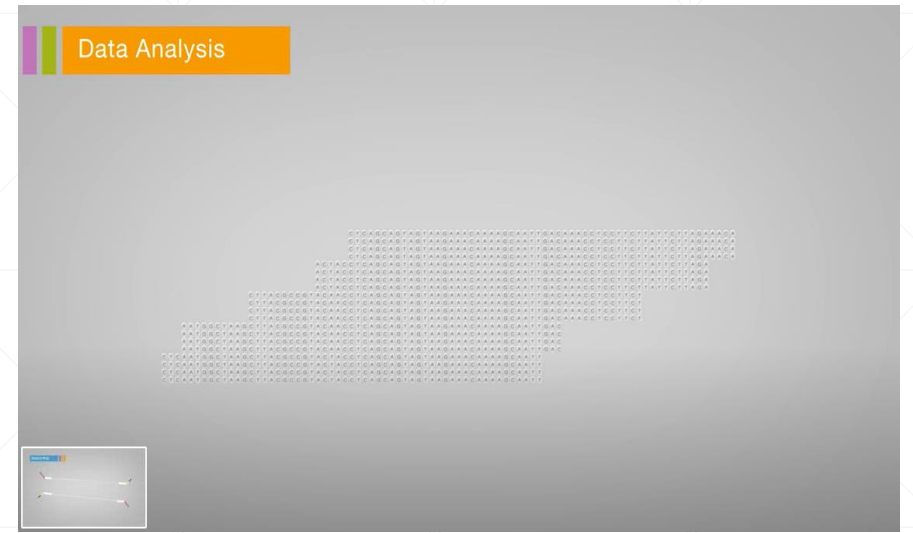


Une plaque = des centaines de millions de clusters



Puis un séquençage par synthèse est réalisé : on ajoute à chaque cycle : amorce, ADN polymérase et les quatre 4 terminateurs réversibles marqués. Après excitation par un laser, la fluorescence émise par chaque cluster est récupérée et la première base est lue. La lecture est effectuée à chaque position sur toutes les séquences en parallèle.

“Illumina Sequencing by Synthesis” – Illumina – Youtube <https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>



On obtient ainsi des lectures ou reads qui se chevauchent. Les programmes informatiques assemblent alors ces reads grâce aux extrémités qui se chevauchent pour reconstruire la séquence d'ADN d'intérêt, d'abord sous forme de contigs, puis les contigs sont reliés entre eux en comparaison à un génome de référence.

NGS (Next Generation Sequencing) :

Thoendel et al 2018 : Identification of Prosthetic Joint Infection Pathogens Using a Shotgun Metagenomic Approach; Clinical Infectious Diseases 2018

Cultures réalisées à partir des liquides de sonication (vortexage/sonication)

Table 3. Metagenomic Sequencing Versus All Cultures From All Sources (Intraoperative Tissue, Preoperative Synovial Fluid, and Sonicate Fluid)

Case Classification	Samples, No.	Identical Findings	Organisms Not Identified by Metagenomics	New Organisms Detected by Metagenomics
Aseptic failure	195	188 (96.4)	NA	7 (3.6)
Culture-positive PJI	146	121 (82.9)	16 (11.0)	12 (8.2)
Culture-negative PJI	67	46 (68.7)	NA	21 (31.3)

Abbreviations: NA, not applicable; PJI, prosthetic joint infection.

Data are the No. (%) of samples in which identical findings or discrepant findings between sonicate fluid culture and metagenomic sequencing were observed.

→ De nombreuses infections à culture négatives sont désormais documentées;

NGS (Next Generation Sequencing) :

Thoendel et al 2018 : Identification of Prosthetic Joint Infection Pathogens Using a Shotgun Metagenomics Approach; Mayo Clinic; Clinical Infectious Disease

Table 4. Species From Discordant Samples

Discrepancy Between Methods	New or Missed Identifications by Metagenomics vs Sonicate Fluid Culture	New or Missed Identifications by Metagenomics vs Sonicate Fluid Culture	New or Missed Identifications by Metagenomics vs Sonicate Fluid Culture
PJI organisms not detected by metagenomics	<i>Bacillus</i> spp <i>Candida albicans</i>	<i>Mycobacterium abscessus</i> <i>Porphyromonas</i> species	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)
New organisms detected in aseptic failure	<i>Cutibacterium acnes</i> (2)	<i>Staphylococcus aureus</i> (3)	<i>Streptococcus sanguinis</i> (2)
New organisms detected in culture-positive PJI	<i>Anaerococcus obesiensis</i> <i>Clostridium</i> species <i>C. acnes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> ^a	<i>Fingoldia magna</i> (3) ^a <i>Peptoniphilus harei</i> <i>Prevotella nanciensis</i> <i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (5) <i>Staphylococcus lugdunensis</i> (3) <i>Varibaculum cambriense</i>
New organisms detected in culture-negative PJI	<i>Anaerococcus urinae</i> <i>C. albicans</i> (2) ^a <i>Candida parapsilosis</i> ^a <i>Clostridium perfringens</i> <i>Corynebacterium pseudogenitalium</i> <i>C. acnes</i> <i>Enterococcus faecalis</i> (3) ^a	<i>E. cloacae</i> (2) ^a <i>Facklamia languida</i> <i>Granulicatella adiacens</i> (2) ^a <i>Mycobacterium bovis</i> BCG ^a <i>Mycoplasma salivarium</i> <i>Peptoniphilus</i> species <i>Pasteurella multocida</i> ^a	<i>S. aureus</i> (10) ^a <i>S. epidermidis</i> (5) ^a <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (2) ^a <i>S. lugdunensis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> (4) <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (4) ^a <i>Streptococcus oralis</i> ^a

Abbreviation: PJI, prosthetic joint infection.

Listed are species identified or missed by shotgun metagenomics compared to sonicate fluid culture alone. Values in parentheses indicate detection in >1 subject; the number given is the number of subjects.

^aIndicates organism identified in cultures other than sonicate fluid.

NGS (Next Generation Sequencing) :

- Namdari et al JSES 2018 : Etude comparative NGS et cultures dans le diagnostic des infections de prothèse d'épaule

Broyage des échantillons et milieu de transport anaérobie

→ L'interprétation des résultats du NGS semble plus difficile sur les prélèvements d'épaule que genou et hanche; Beaucoup de discordances avec la culture, et de flores polymorphes (Infection à flore polymorphe? microbiote articulaire? flore cutanée?)

Table II Cases of positive cultures and next-generation sequencing

Case #	Surgery	Clinical signs of PJI (yes/no)	Elevated lab markers (yes/no)	Intra-op signs of PJI (yes/no)	Cultures		Next-generation sequencing	
					Organism(s)	No. positive	Organism(s)*	No. positive
2	Single-stage	No	No	No	<i>C. acnes</i>	1		
6	Single-stage	No	No	No	<i>C. acnes</i>	4		
7	Single-stage	No	No	No	CNS (<i>S epidermidis</i>)	1		
9	Single-stage	No	No	No	CNS (<i>S epidermidis</i>)	1		
10	Dual-stage	No	No	Yes	CNS (<i>S epidermidis</i>)	1	<i>E coli</i> , <i>C. acnes</i> , <i>R insidiosa</i> , <i>E hormaechei</i> , <i>C paradoxus</i> , <i>A junii</i> , <i>A tetradius</i> , <i>C tuberculostearicum</i> , <i>C hominis</i> , <i>K palustris</i> , <i>S hominis</i> , <i>L crispatus</i> , <i>S maltophilia</i>	3
11	Dual-stage	No	No	Yes			<i>E coli</i> , <i>C. acnes</i> , <i>R insidiosa</i>	2
12	Single-stage	No	No	No	CNS (<i>S epidermidis</i>)	1		
13	Single-stage	No	No	No			<i>C. acnes</i> , <i>A radioresistens</i> , <i>C chromoreductans</i> , <i>C quinii</i> , <i>C hveragerdense</i> , <i>C acidisoli</i> , <i>C circulans</i> , <i>S agalactiae</i> , <i>R picettii</i> , <i>P aeruginosa</i>	3
14	Single-stage	No	No	No			<i>A radioresistens</i> , <i>C. acnes</i> , <i>G ruanii</i> , <i>C tuberculostearicum</i> , <i>S pettenkoferi</i> , <i>C vibrioides</i> , <i>B aggregatus</i> , <i>S cohnii</i>	2
15	Single-stage	No	No	No	<i>C. acnes</i>	1	<i>A radioresistens</i> , <i>C. acnes</i> , <i>S melonis</i> , <i>A calcoaceticus</i> , <i>S condimenti</i> , <i>A rhizogenes</i> , <i>B cepacia</i> , <i>S aureus</i> , <i>S epidermidis</i> , <i>C tuberculostearicum</i> , <i>C striatum</i> , <i>S mitis</i> , <i>B fungorum</i>	3
16	Single-stage	No	No	No	<i>C. acnes</i>	1	<i>C. acnes</i> , <i>A calcoaceticus</i> , <i>S hominis</i> , <i>B mycoides</i> , <i>S aureus</i> , <i>P aeruginosa</i> , <i>C tuberculostearicum</i> , <i>P saccharophilia</i> , <i>S melonis</i> , <i>S epidermidis</i>	3
17	Single-stage	No	No	No	<i>C. acnes</i>	1		
18	Dual-stage	No	No	No	CNS (<i>S epidermidis</i>)	1		
20	Single-stage	No	No	No			<i>S agalactiae</i> , <i>P aeruginosa</i> , <i>A radioresistens</i> , <i>L albida</i>	2
21	Dual-stage	No	Yes	Yes	<i>B fragilis</i>	5	<i>B fragilis</i> , <i>B nordii</i> , <i>B thetaiotaomicron</i> , <i>B virosa</i> , <i>A radioresistens</i>	5
22	Single-stage	No	No	No	<i>C. acnes</i>	5		
23	Dual-stage	No	No	No	<i>C. acnes</i>	5	<i>C. acnes</i> , <i>M luteus</i> , <i>B dorei</i> , <i>B casei</i> , <i>C xerosis</i> , <i>A ferrireducens</i> , <i>R gnnavus</i> , <i>S pettenkoferi</i> , <i>K rosea</i> , <i>B cepacia</i>	4
25	Dual-stage	No	Yes	Yes	<i>S aureus</i> (MRSA)	5	<i>S aureus</i> (MRSA)	5
26	Dual-stage	No	No	No	CNS	1	<i>S epidermidis</i> , <i>K pneumoniae</i>	2
27	Single-stage	No	No	No	<i>C. acnes</i>	1		
28	Single-stage	No	Yes	No	<i>C. acnes</i>	2		
30	Single-stage	No	No	No	<i>C. acnes</i>	1	<i>C. acnes</i> , <i>A radioresistens</i> , <i>B cepacia</i> , <i>S maltophilia</i> , <i>E coli</i> , <i>K oxytoca</i> , <i>M granosa</i>	2
31	Single-stage	No	Yes	No			<i>C. acnes</i> , <i>C diptheriae</i> , <i>L agilis</i> , <i>B cepacia</i> , <i>K oxytoca</i> , <i>C testosteronei</i> , <i>A radioresistens</i>	2
34	Single-stage	No	No	No			<i>P agglomerans</i> , <i>P aeruginosa</i> , <i>B thermosphacta</i> , <i>S parasanguinis</i> , <i>L manihotivorans</i> , <i>C. acnes</i> , <i>P aeruginosa</i> , <i>C aurimucosum</i>	2
36	Single-stage	No	No	No	<i>C. acnes</i>	3	<i>M catarrhalis</i> , <i>S mitis</i> , <i>C kroppenstedtii</i> , <i>C. acnes</i> , <i>S piscifermentans</i> , <i>S lugdunensis</i> , <i>S pettenkoferi</i> , <i>S sanguinis</i>	3
37	Dual-stage	No	No	No	<i>C. acnes</i>	2		
40	Single-stage	No	No	No	<i>C. acnes</i>	4		
41	Dual-stage	No	Yes	Yes	CNS (<i>S epidermidis</i>)	2	<i>S epidermidis</i> , <i>A excentricus</i>	4
44	Dual-stage	No	Yes	No	<i>S epidermidis</i>	2	<i>S epidermidis</i>	1

PJI, prosthetic joint infection; CNS, coagulase-negative *Staphylococcus*; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
* Bold font indicates that the bacterial species was identified in at least 2 specimens.

Allison & al 2019 *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. NGS for diagnosis of infection : is more sensitive really better?

= Etude prospective observationnelle; Première arthroplastie d'épaule; exclusion si ATCD d'infection ou de chirurgie de l'épaule ou traitement antibiotique dans les 60 jours

Pas de broyat pour les cultures

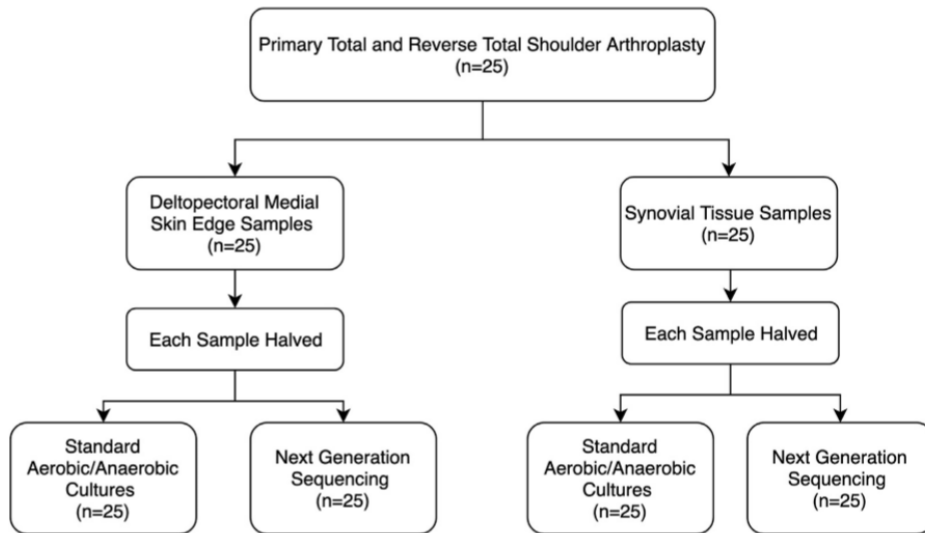


Figure 1 Study flowchart.

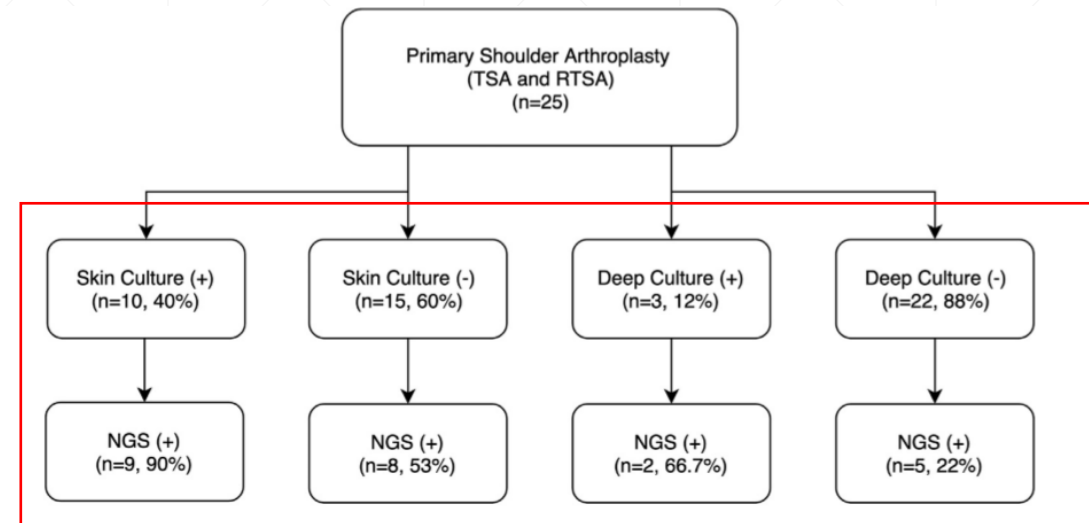


Figure 3 Concordance of standard culture and next-generation sequencing (NGS) results.

Beaucoup de cultures positives sur des prélèvements chez des patients **non septiques**;
Autant avec le NGS → Toujours difficile de trancher entre processus infectieux et contamination

Conclusion

- Intérêt de la biologie moléculaire en cas de cultures stériles après une antibiothérapie
 - NGS : technique prometteuse
 - Meilleure sensibilité vs culture.
 - Permet de diagnostiquer les infections plurimicrobiennes + les mécanismes de résistance rapidement
 - Difficultés d'interprétation : infection vs contamination ?
-

Merci pour votre attention
