

Apport et limites des approches moléculaires dans le diagnostic des infections du SNC

Christophe Rodriguez

*Microbiology Dpt, INSERM U955 Team 18,
Responsable de la plateforme "Génomiques" IMRB/APHP,
University hospital Henri Mondor, APHP, Créteil, France,*

Etat des lieux Infections du SNC



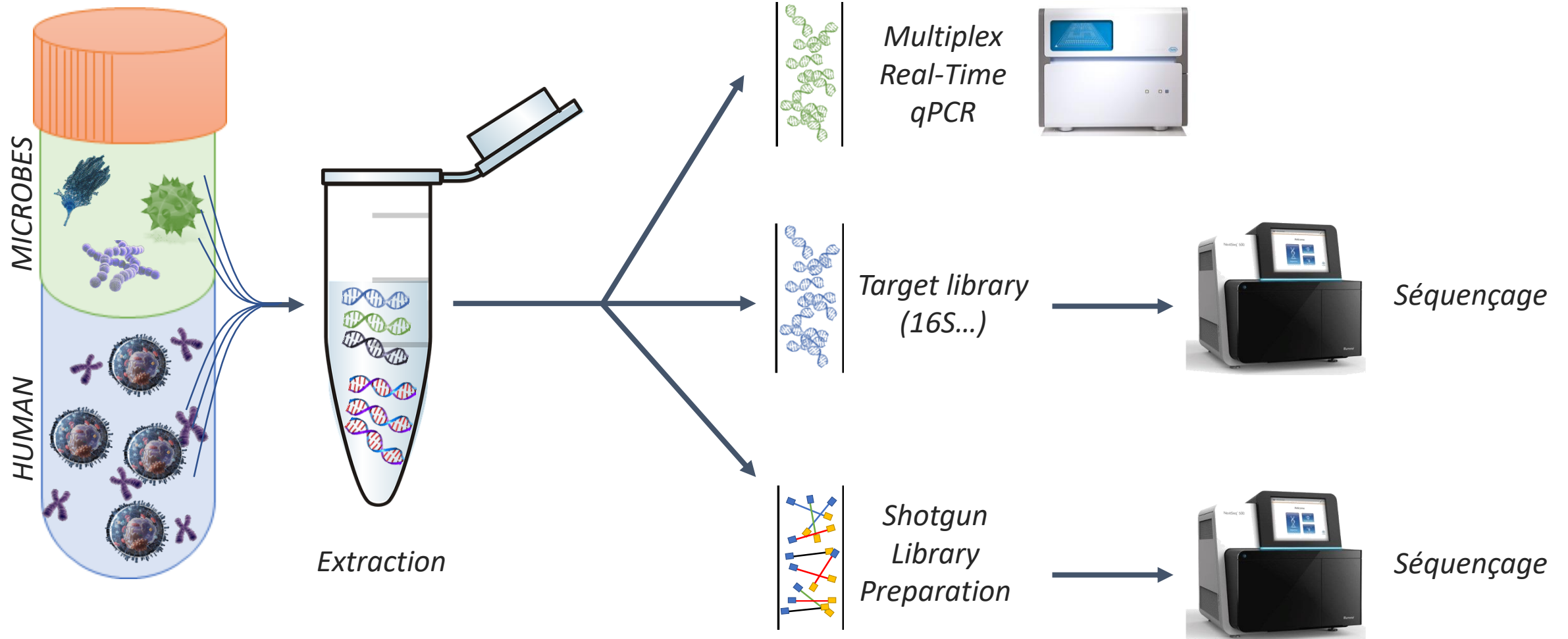
- Symptomatologie aspécifique
- Pas de recommandation claire sur le diagnostic microbiologique
- Diversité importante des pathogènes possiblement impliqués
- Multiplication des outils diagnostics dont l'accès et les performances sont très variables
 - ⇒ Mauvaise connaissance de la documentation de ces pathologies
 - ⇒ Nombreux diagnostics restant infructueux

Diagnostic microbiologique

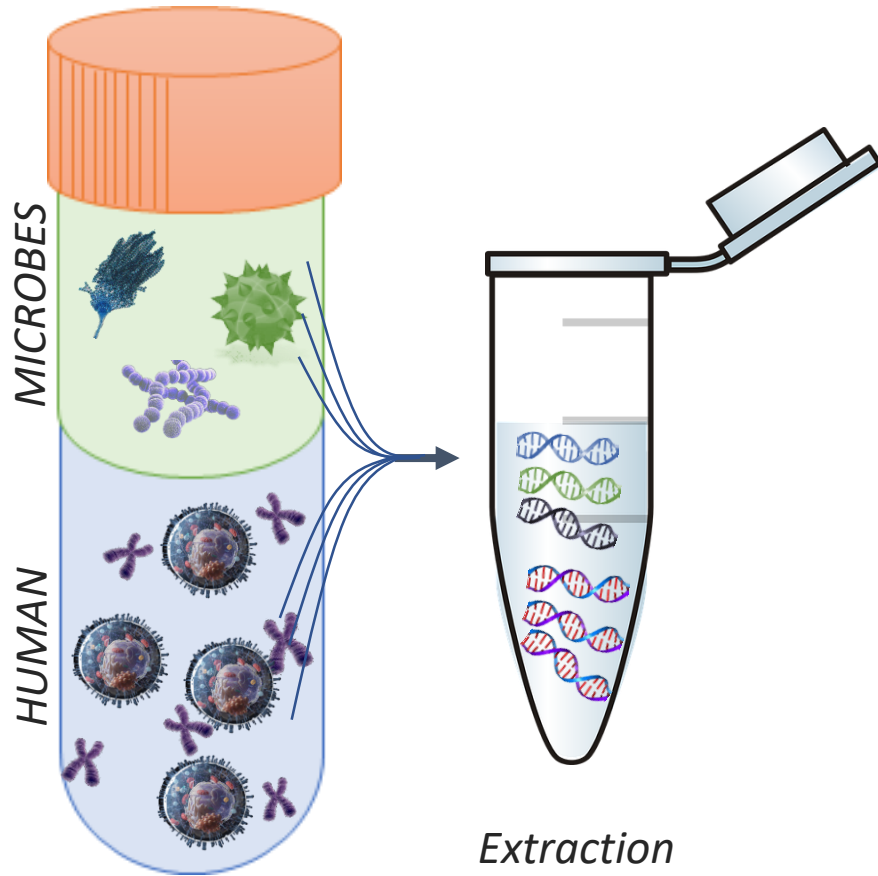
- Positionnement des techniques de biologies moléculaires

Organisms	Culture+MALDI-TOF	PCR Panels	Ag/Antibody	Sanger Amplicon	NGS Amplicon	Shotgun Metagenomic
Bacteria	Partial	Targeted	Targeted	16S	16S	Yes
Fungi	Partial	Targeted	Targeted	ITS	ITS	Yes
Virus	Not used	Targeted	Targeted	No	No	Yes
Plurimicrobial	partial	Targeted	Targeted	No	Partial	Yes
New pathogen	Limited	No	No	Limited	Limited	Yes
Characterization	Phenotypical Resistance	Mutation(s)	No	Target (VIH, VHC..)	Target (VIH, VHC..)	Whole genome
Host exploration	No	No	No	No	No	Yes
Turn around time	24-72h	1h30	<4h-1 week	72h-1 week	72h-1 week	72h-1 week

La biologie moléculaire en infectiologie



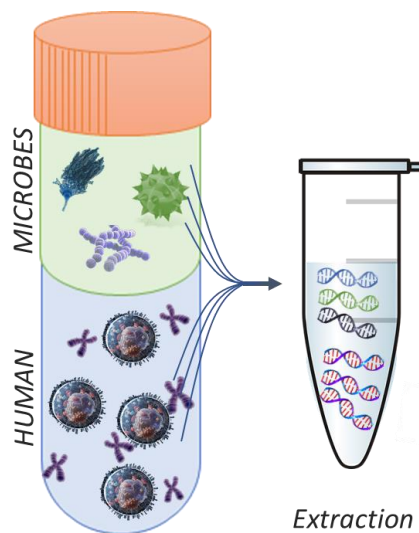
Limites liées à l'extraction



Problématique de l'extraction

- Structure externe des microorganismes (impacte toutes les techniques)
 - Difficiles à extraire
 - Gram+ (surtout *S. aureus*)
 - Les mycobactéries
 - Les champignons filamenteux
- ADN/ARN
- Pollution par les séquences humaines (impacte les techniques Shotgun)

Limites liées au(x) choix de la/les cible(s)



PCR Temps Réel (Simplex ou multiplex)

Détection d'une portion de génome spécifique d'un microorganisme (PCR Simplex), ou de plusieurs portions de génomes différents simultanément (PCR Multiplex)

- ⇒ Très sensible, très spécifique
- ⇒ Panel limité 25-30 cibles maximum
- ⇒ Très rapide

PCR multiplex performances



Journal of
Clinical Microbiology

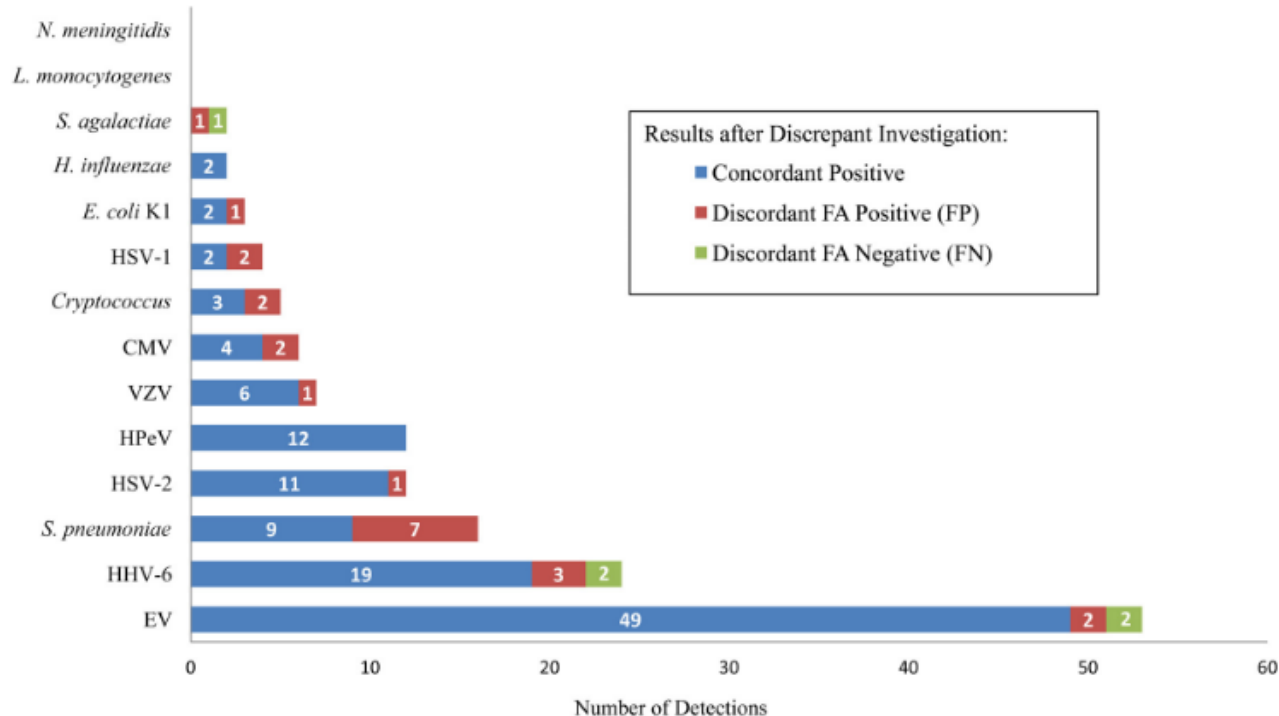
Advanced Search

Home Articles For Authors About the Journal Subscribe

Bacteriology

Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens

Amy L. Leber, Kathy Everhart, Joan-Miquel Balada-Llasat, Jillian Cullison, Judy Daly, Sarah Holt, Paul Lephart, Hossein Salimnia, Paul C. Schreckenberger, Sharon DesJarlais, Sharon L. Reed, Kimberle C. Chapin, Lindsay LeBlanc, J. Kristie Johnson, Nicole L. Soliven, Karen C. Carroll, Jo-Anne Miller, Jennifer Dien Bard, Javier Mestas, Matthew Bankowski, Tori Enomoto, Andrew C. Hemmert, Kevin M. Bourzac



Journal of
Clinical Microbiology®

BACTERIOLOGY



Utilization, Yield, and Accuracy of the FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel with Diagnostic Stewardship and Testing Algorithm

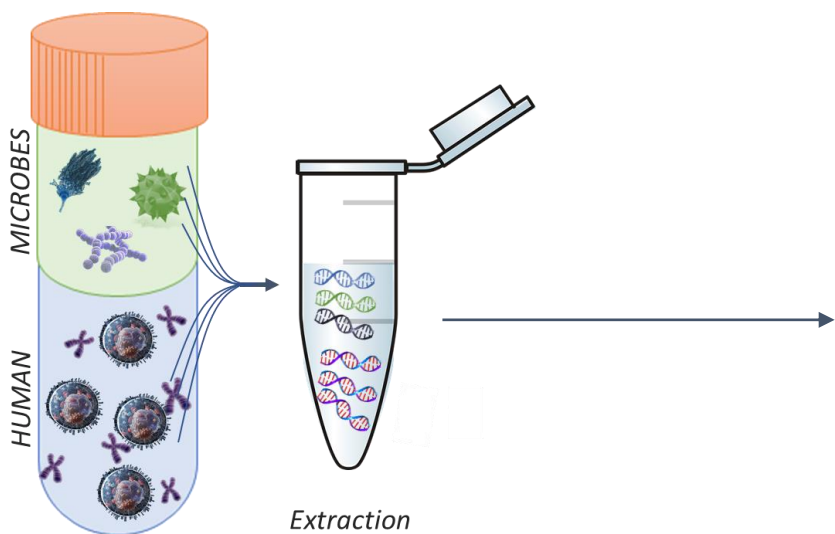
M. Jana Broadhurst,^a Shefali Dujari,^b Indre Budvytiene,^d Benjamin A. Pinsky,^{a,c} Carl A. Gold,^b Niaz Banaei^{a,c,d}

TABLE 7 Duration of acyclovir treatment before and after implementation of the FilmArray ME panel

Parameter ^a	Value		
	Pre-ME panel (<i>n</i> = 38)	Post-ME panel (<i>n</i> = 39)	<i>P</i> value
No. of female patients (%)	13 (34.2)	18 (46.2)	0.29
Mean age (yr) (SD)	61 (±22)	52 (±19)	0.06
Median treatment time (h) (IQR)	60 (32–89)	32 (6–72)	0.03

^aIQR, interquartile range.

Limites liées au(x) choix de la/les cible(s)

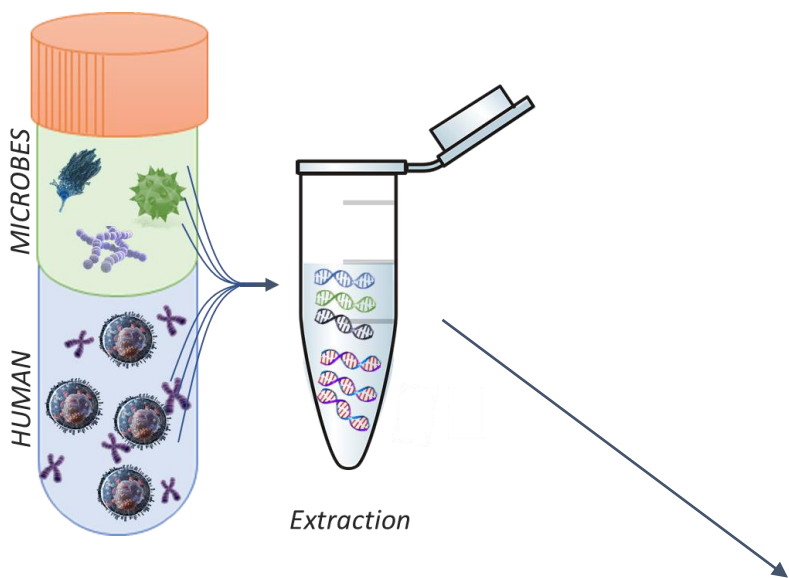


Approche 16S ou ITS

Séquençage d'une portion de ribosome dont le contenu génétique est spécifique des bactéries (domaine 16S) ou des champignons (ITS)

- ⇒ Peu à moyennement sensible, moyennement spécifique
- ⇒ Panel limité aux bactéries ou champignons
- ⇒ lent

Limites liées au(x) choix de la/les cible(s)



Approche Shotgun métagénomique

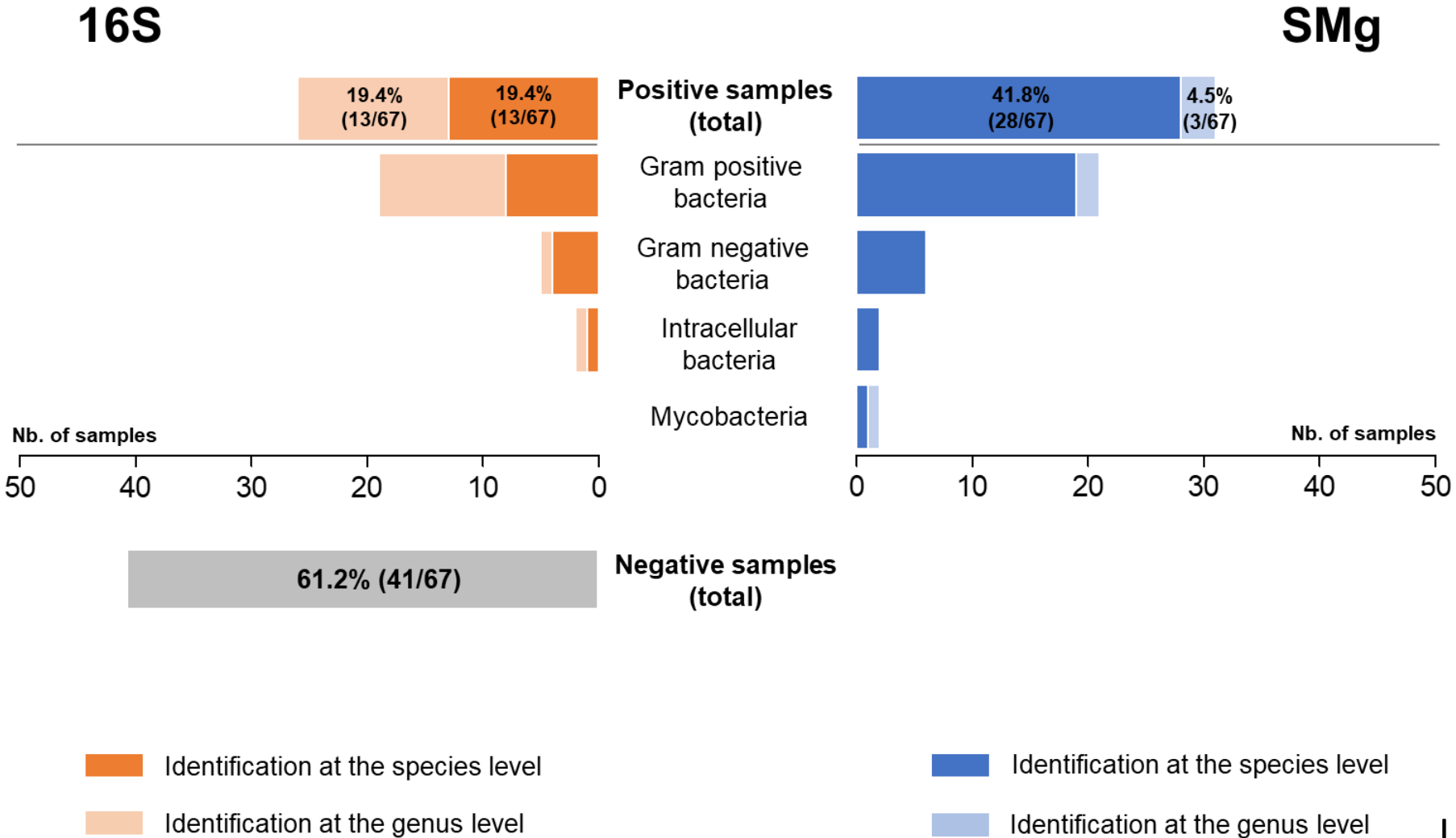
Séquençage de la totalité des acides nucléiques d'un échantillon

⇒ moyennement sensible à très sensible, moyennement à très spécifique

⇒ Tous les microorganismes

⇒ lent

16S vs Shotgun

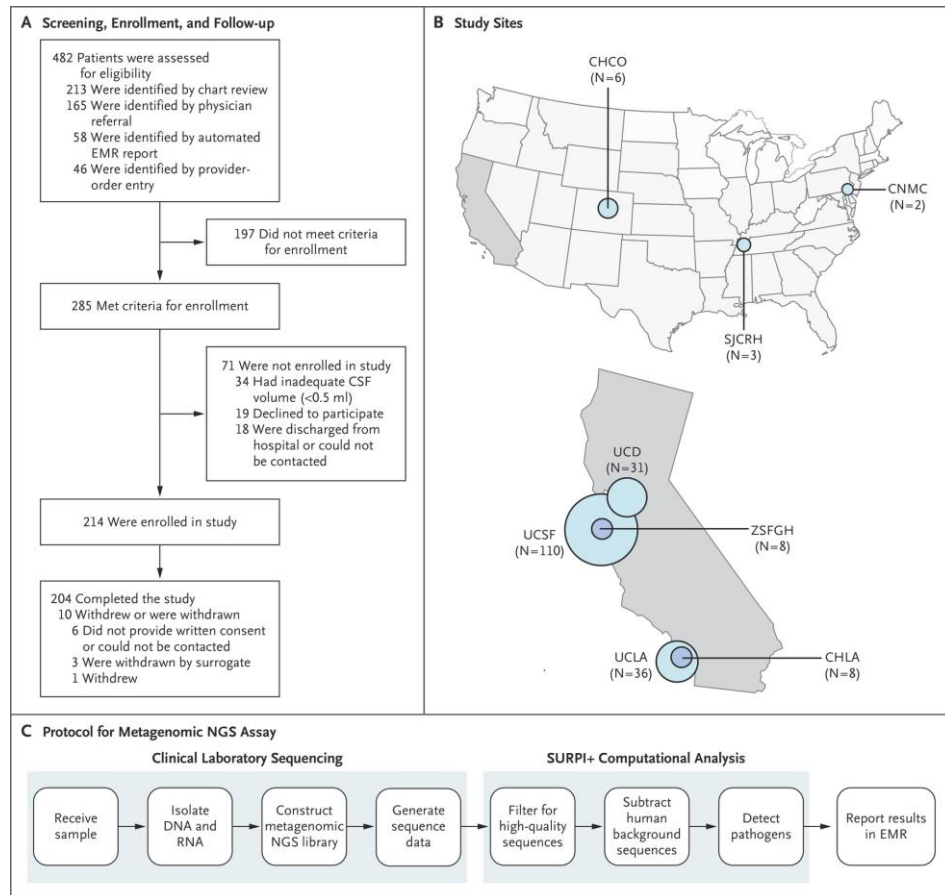


Conclusion:

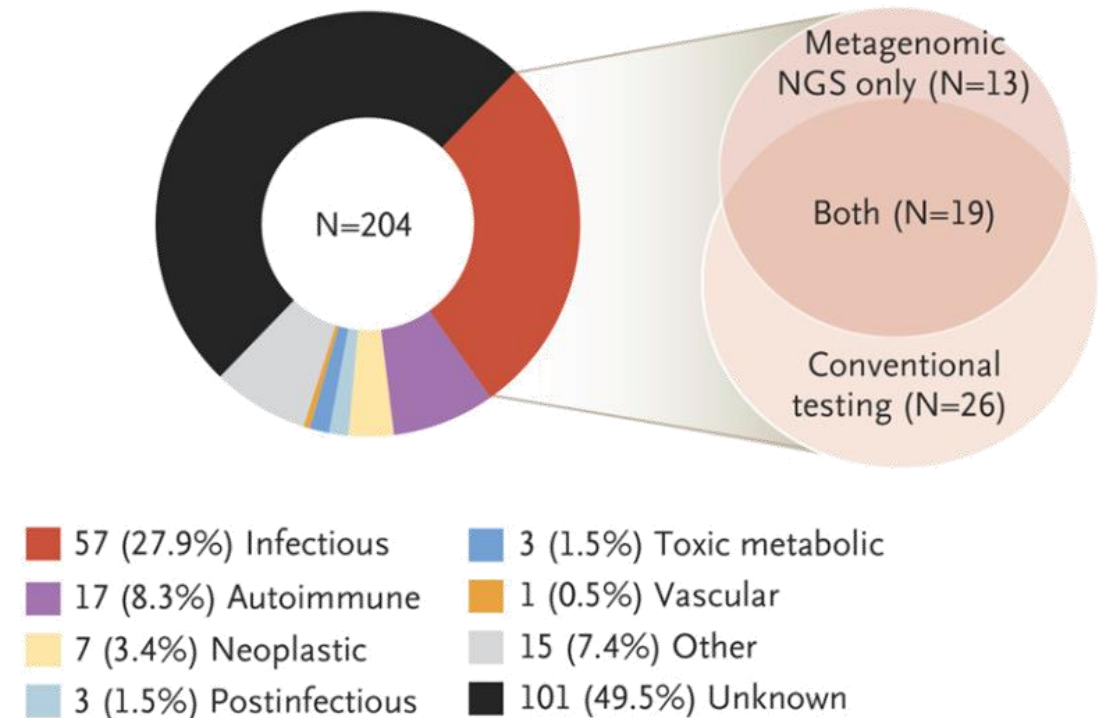
- Pas de différence de **sensibilité** entre les deux méthodes
- Meilleure **discrimination** du NGS comparée au 16S (espèce)
- Conséquences sur le **diagnostic** et la **prise en charge**

Première étude prospective par SMg

- 204 patients présentant une symptomatologie d'infection du SNC => 58 d'origine infectieuse +6% par la SMg



Established Diagnosis in the Study Patients



Diagnostic pan-pathogène par SMg MetaMIC, retour d'expérience en routine

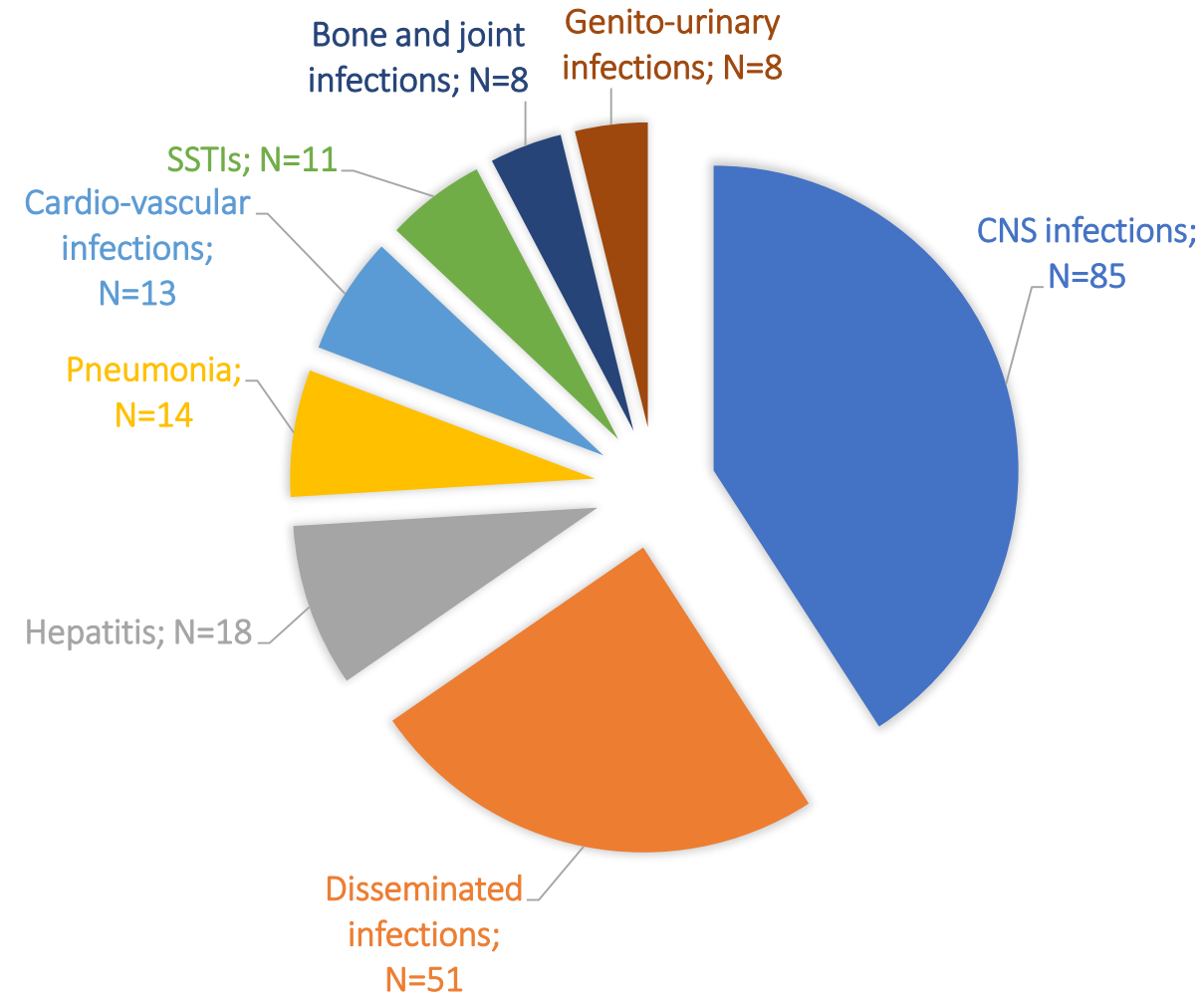
Objectif :

Analyse rétrospective de la contribution microbiologique des examens de métagénomique demandés dans le cadre d'exploration de maladies infectieuses « complexes » en routine.

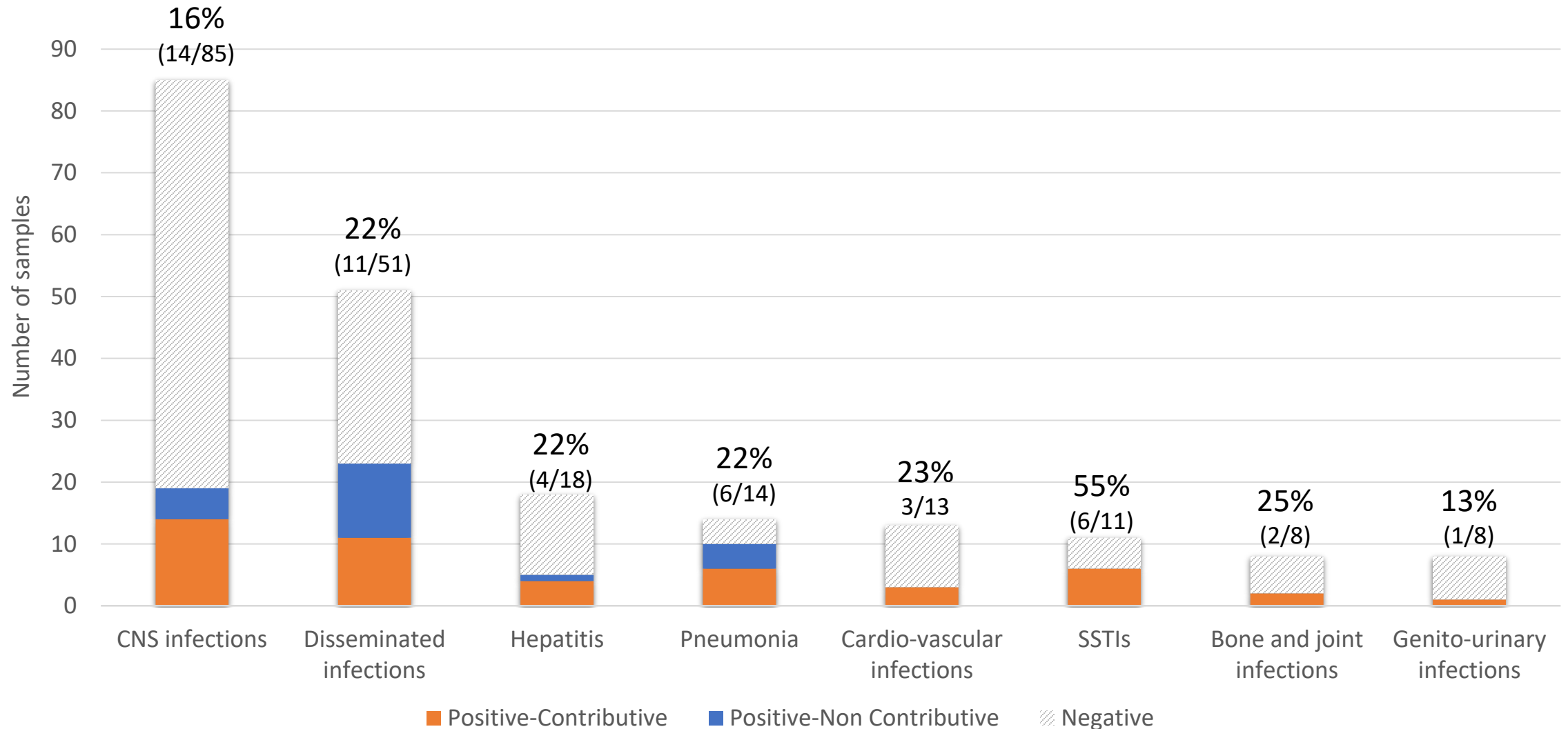
Patients :

208 échantillons analysés inclus sur l'année 2019 :

- Recueil des indications
- Recueil des résultats (négatif/positif)
- Interprétation (contributif/non contributif)



Diagnostic pan-pathogène par métagénomique clinique, retour d'expérience en routine



Exemple d'intérêt de la Métagénomique Shotgun

Patient



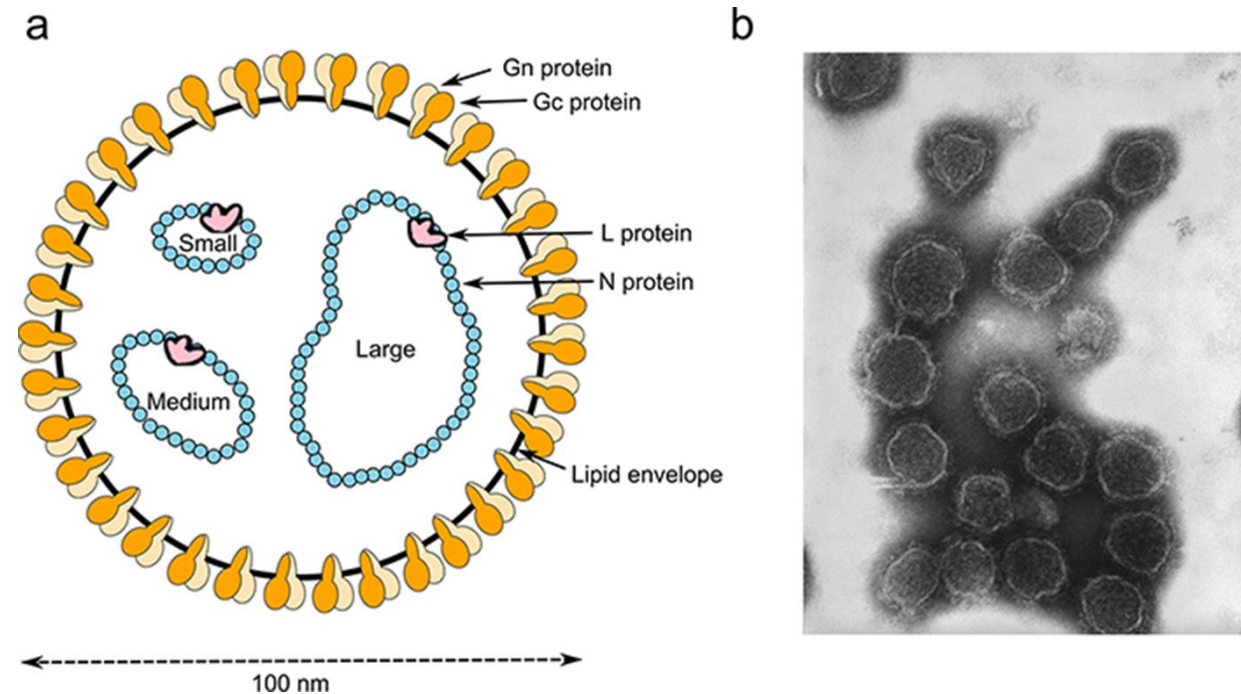
- Mme P, 58 ans, lymphome en 2002 avec rémission complète, hypogammaglobulinémie liée à un possible déficit immunitaire non étiqueté, syndrome myélodysplasique, hépatite auto-immune avec cirrhose (Child B) contrôlée sous Sirolimus.

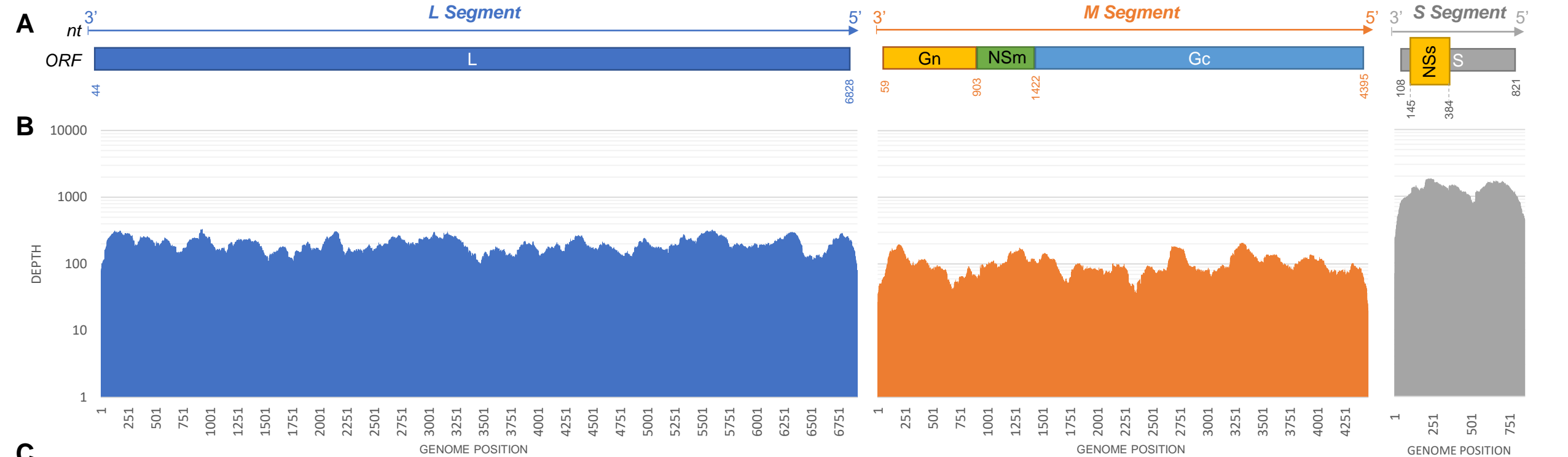


- Oct 2018 : Premiers épisodes de troubles neurologiques et consultations aux urgences de la PSL
- Nov 2018 : Admission aux urgences et transfert en neurologie. Nombreuses explorations bactériologiques et immunitaires sans diagnostic étiologique.
- Février 2019 : Aggravation des signes neuro, transfert en réa-neuro, LCR avec qq élts, IFN alpha +++ . IRM du 23/02/19 évoquant une possible encéphalite. Biopsie envoyée à Mondor.
- Diagnostic 15/03
- Décès le 27/03/19.

Résultats MetaMIC

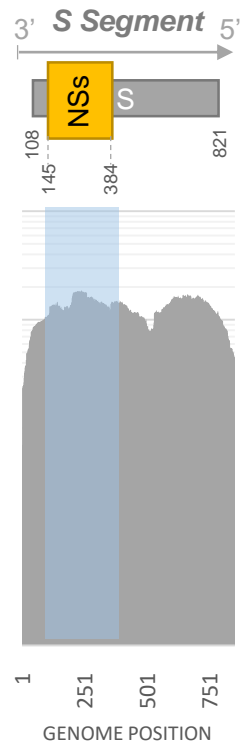
- *Orthobunyavirus*, serogroup Turlock
 - Possiblement Little Sussex ou Umbre mais impossibilité du logiciel de le déterminer précisément, quantité intermédiaire
 - Lancement de l'algo de reconstruction *de novo* (c'est à dire sans référence)





La protéine NSs

- Détection d'un cadre de lecture codant correspondant à une protéine NSs
- Charge de transcrit N+NSs 10x plus importante que le reste du virus -> lien avec la virulence ?

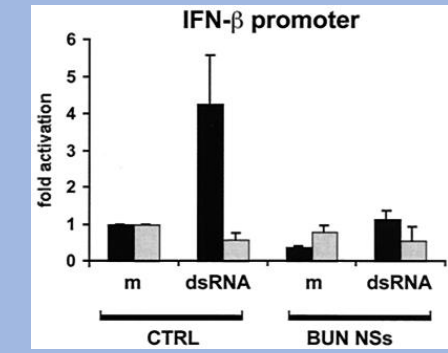


Bunyamwera Bunyavirus Nonstructural Protein NSs Counteracts the Induction of Alpha/Beta Interferon

Friedemann Weber,¹ Anne Bridgen,² John K. Fazakerley,³ Hein Streitenfeld,¹ Nina Kessler,¹ Richard E. Randall,⁴ and Richard M. Elliott^{2*}

Abteilung Virologie, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Freiburg, D-79008 Freiburg, Germany,¹ and Division of Virology, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow G11 5JR,² Laboratory for Clinical and Molecular Virology, University of Edinburgh, Edinburgh EH9 1QH,³ and School of Biology Sciences, University of St. Andrews, Fife KY16 9TS,⁴ Scotland, United Kingdom

Received 12 February 2002/Accepted 9 May 2002

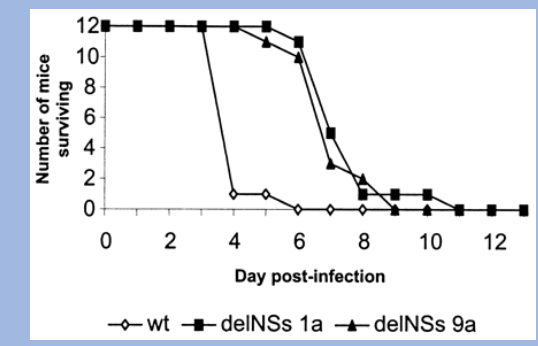


Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis

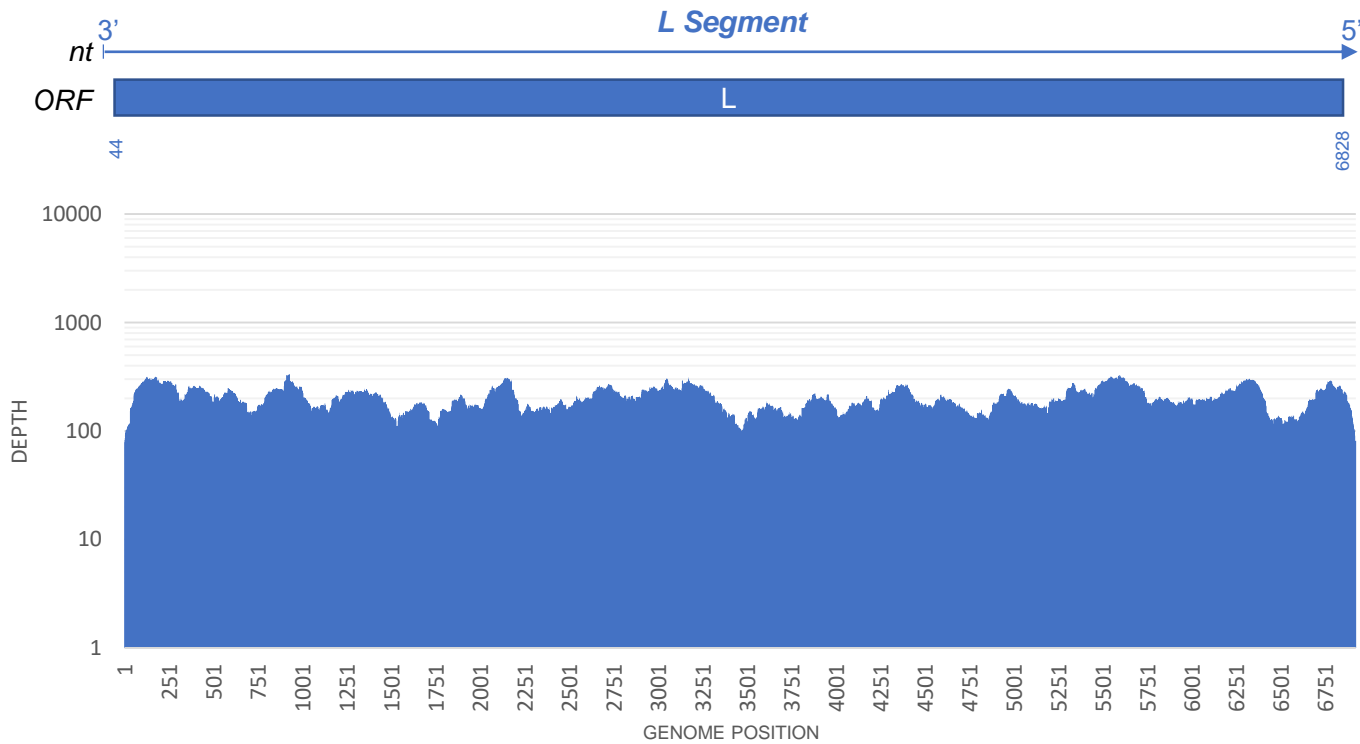
Anne Bridgen^{*†}, Friedemann Weber^{*†}, John K. Fazakerley[‡], and Richard M. Elliott^{*§}

**Division of Virology, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow G11 5JR, Scotland, United Kingdom; and [†]Laboratory for Clinical and Molecular Virology, University of Edinburgh, Summerhall, Edinburgh EH9 1QH, Scotland, United Kingdom*

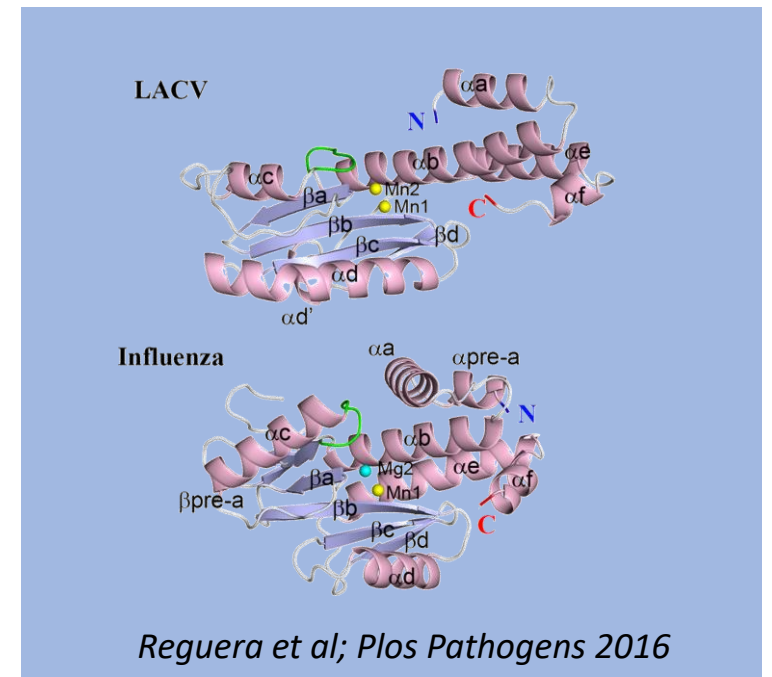
Communicated by Peter Palese, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, October 31, 2000 (received for review September 13, 2000)



La protéine L



Conserved H...PD...DxK *Orthobunyavirus* catalytic domain => Traitement possible par un inhibiteur de polymérase ?



Conclusion

- Les techniques de biologie moléculaire peuvent surpasser les techniques conventionnelles de diagnostic en microbiologie notamment :
 - Sur le délai de diagnostic par approche de Multiplex PCR
 - Sur l'exhaustivité d'exploration par approche de Shotgun métagénomique
- La culture conserve pour le moment l'avantage pour la caractérisation phénotypique bactérienne et fongique (antibiogramme)
- Aujourd'hui, la place de ces nouvelles technologies reste à définir dans les recommandations
- Pour le futur, la technique de SMg présente un avantage décisif dans plusieurs situations cliniques importantes :
 - Ne pas rater l'évidence -> Exhaustivité du screening de micro-organisme
 - Découvrir de nouveaux pathogènes
 - Un seul prélèvement/Un seul labo
 - Elle permettra dans le futur de donner des caractéristiques importantes sur l'hôte (réponse immune)

Perspectives :

Metagenomics for neurological infections – expanding our imagination

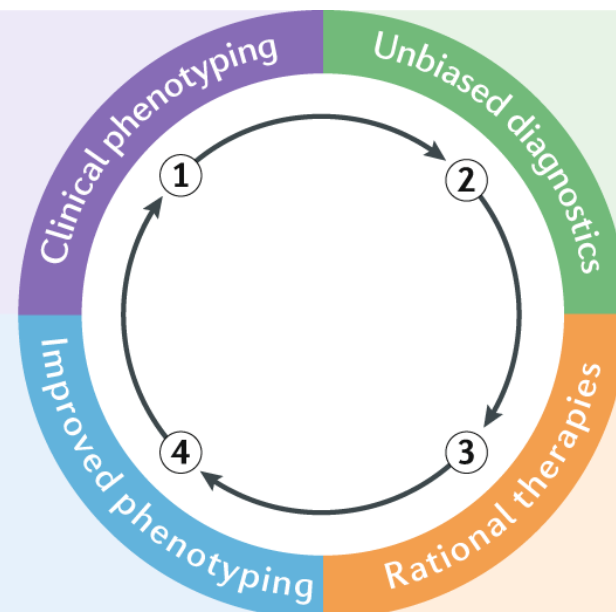
Prashanth S. Ramachandran & Michael R. Wilson [✉](#)

Nature Reviews Neurology **16**, 547–556(2020) | [Cite this article](#)

3839 Accesses | **2** Citations | **3** Altmetric | [Metrics](#)

Prior knowledge combined with the patient history, physical examination, neuroimaging and initial laboratory studies form the backbone for the initial differential diagnosis.

Knowledge about clinical course and response to therapy is enhanced by a better understanding of the underlying aetiology and improves future patient evaluations.



Metagenomic next-generation sequencing allows the neurologist to test for infections that are part of their differential diagnosis as well as for unanticipated infections.

A comprehensive approach to ruling in or ruling out infectious causes of meningitis and encephalitis enables more confident decisions about antimicrobial and/or anti-inflammatory therapies.

Remerciements

MetaMIC Project

Technique

Vanessa Demontant,
Anais Nguyen

Bioinformatique

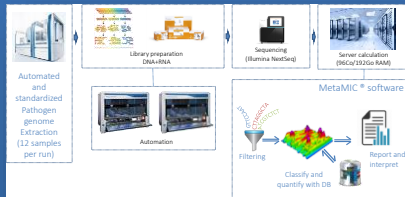
Guillaume Gricourt,
Melissa Ndebi

Experts microbio

Emilie Sitterle, Cécile Angebault,
Françoise Botterel,
Paul-Louis Woerther

Responsables projets

Christophe Rodriguez,
Jean-Michel Pawlotsky



Contributors

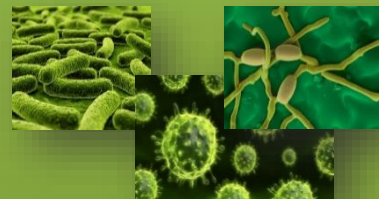
Inserm U955 Team 18

French National Reference Center for hepatitis

Microbiology Dpt of Henri Mondor Hospital, Créteil, France

U2TI (infectious diseases unit), Henri Mondor, Créteil, France

Clinicians from Mondor, St Antoine Necker, Pitie Salpetrière, Paris France



Sponsors



Département
Hospitalo-Universitaire

