

Apports 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



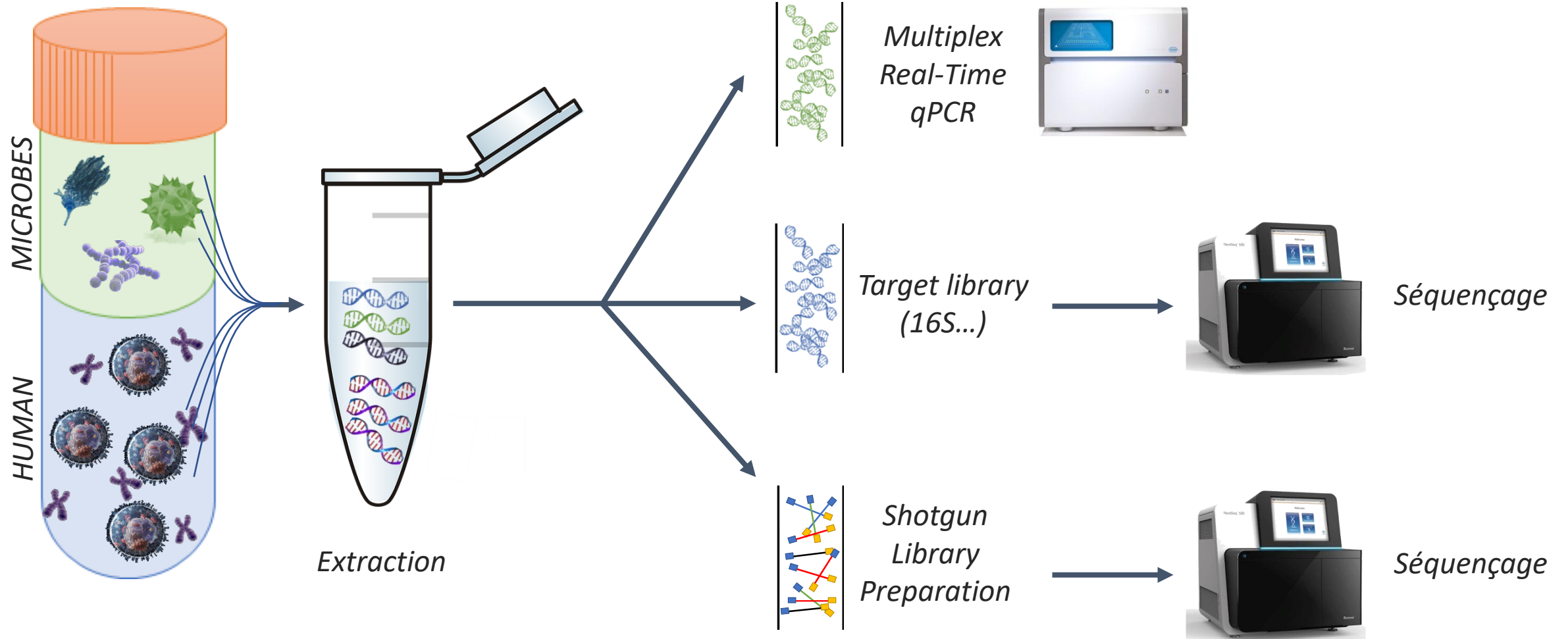
- Symptomatologie aspécifique
- Pas de recommandation claire sur le diagnostic microbiologique
- Diversité importante des pathogènes possiblement impliqués
- Multiplication des outils diagnostics dont l'accès et les performances sont très variables
 - ⇒ Mauvaise connaissance de la documentation de ces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

Diagnostic microbiologique

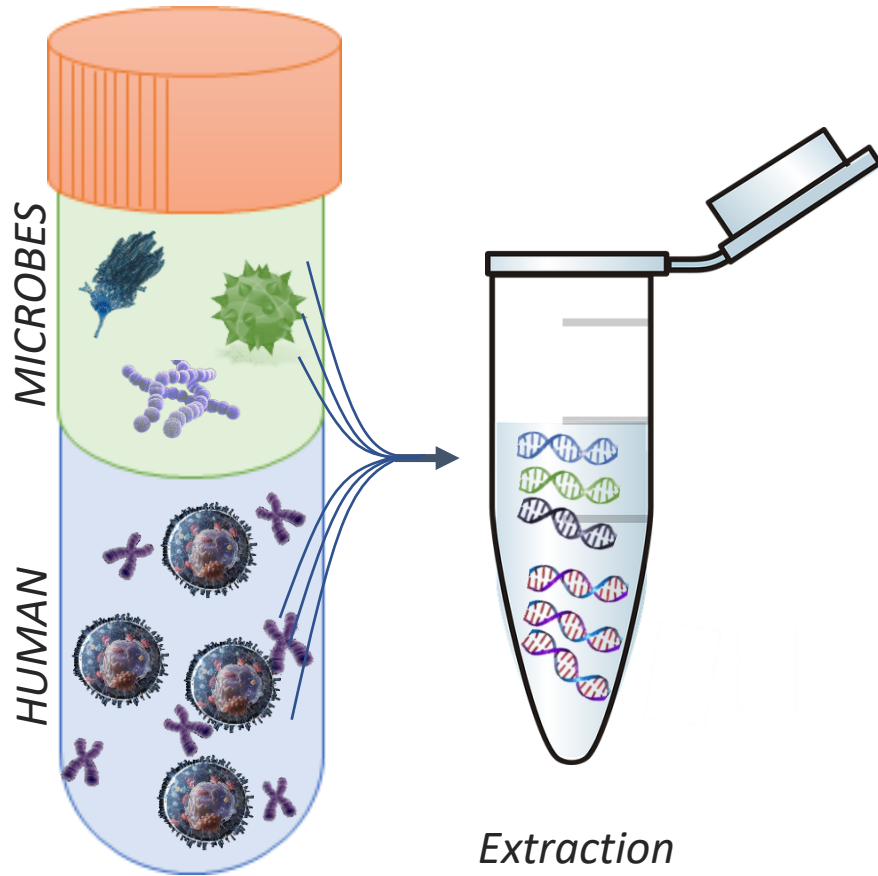
- Positionnement des techniques de biologies moléculaires

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



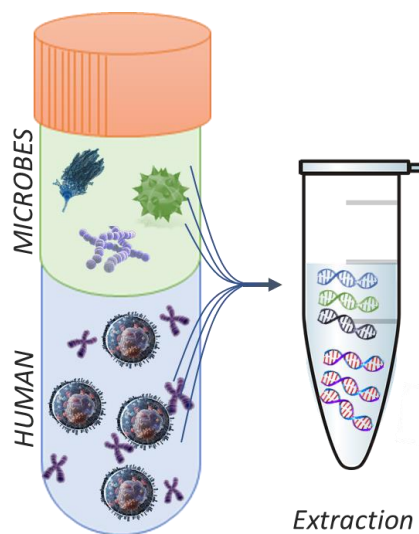
Limites liées à l'extraction



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 (qq heures)
- ⇒ Peu évolutif
- ⇒ Couteux

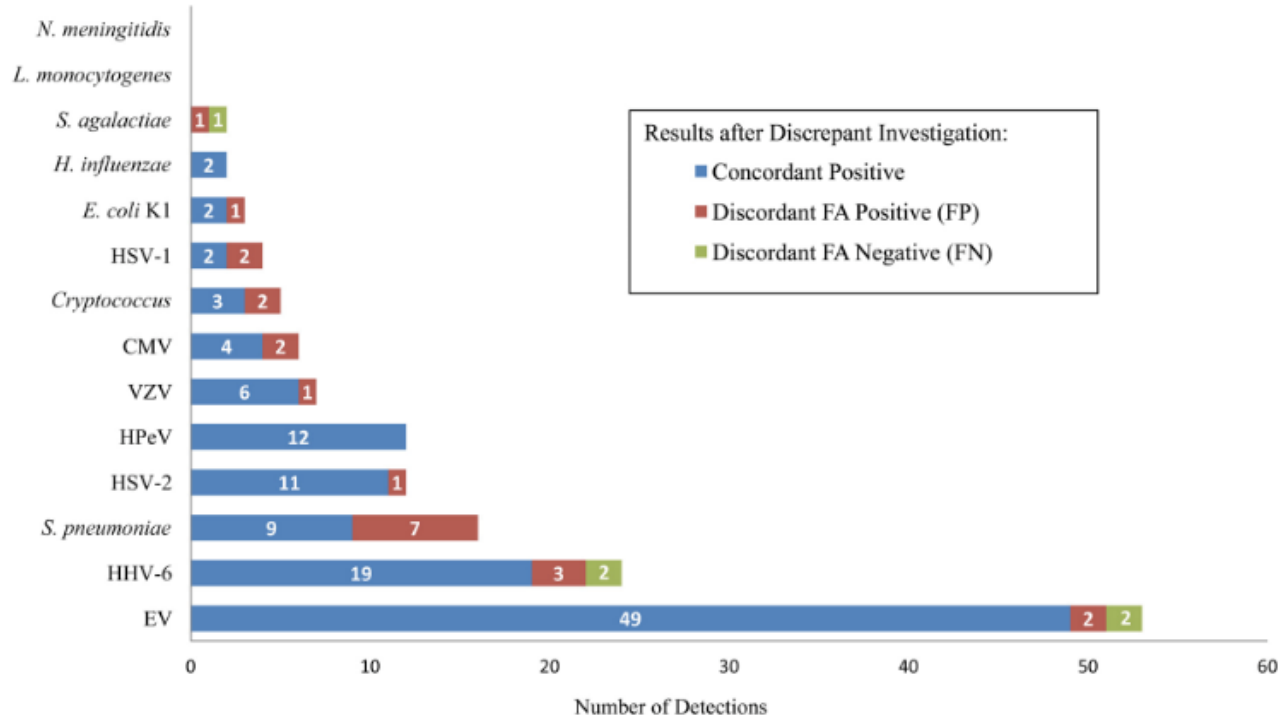
PCR multiplex performances



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



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

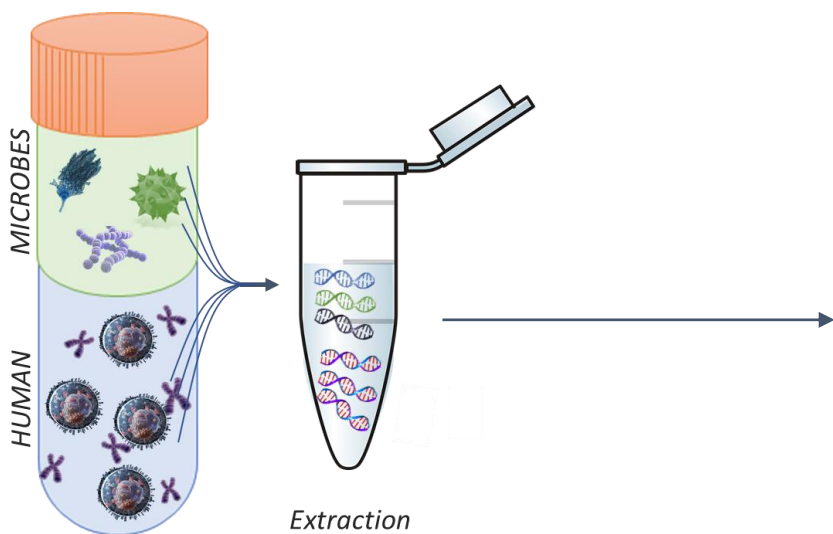
M. Jana Broadhurst,^a Shefali Dujari,^b Indre Budvytiene,^d Benjamin A. Pinsky,^{a,c} Carl A. Gold,^b Niaz Banaei^{a,c,d}

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)

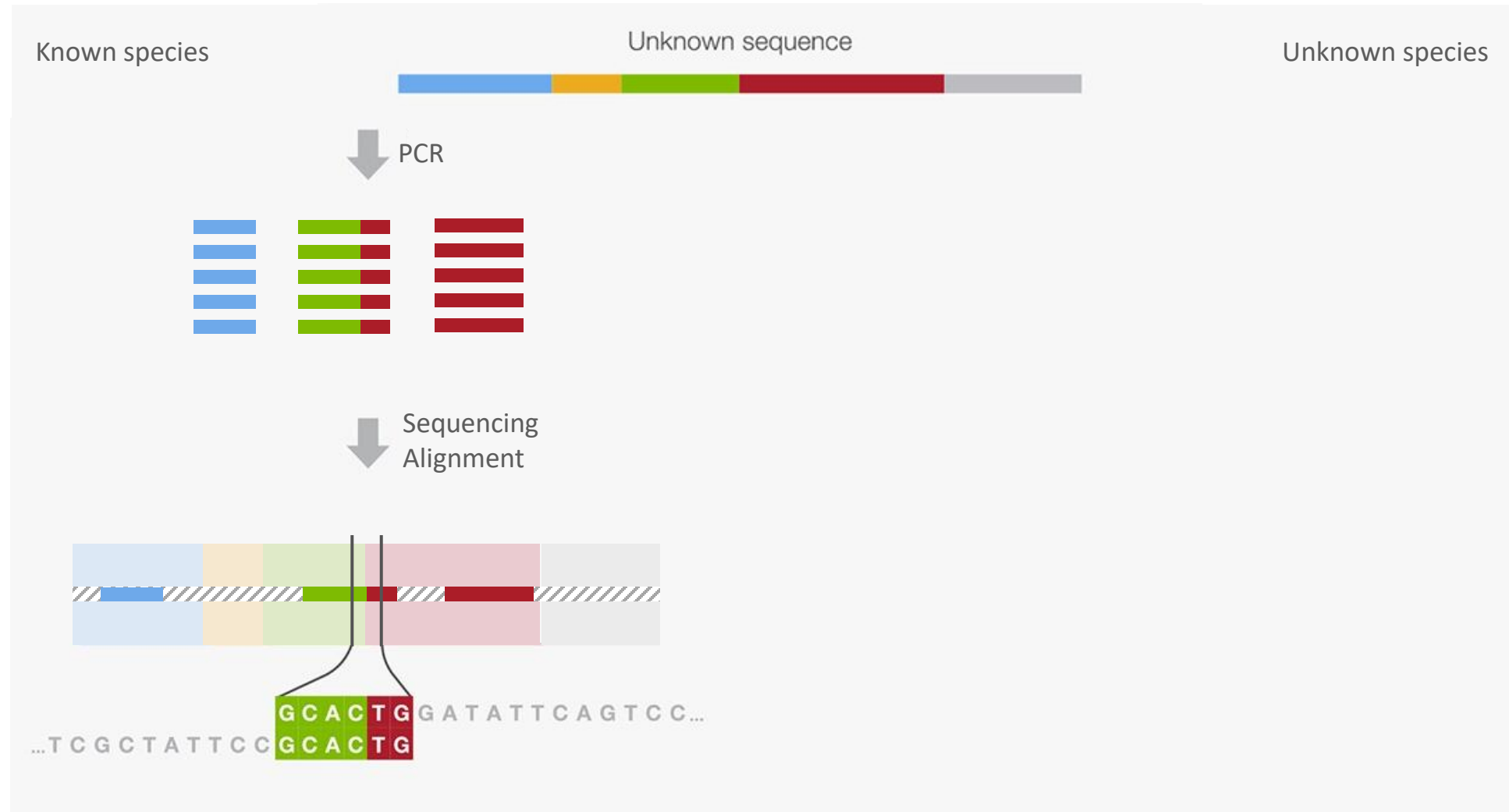
⇒ Assez sensible, moyennement spécifique (diagnostic au genre)

⇒ Panel limité aux bactéries ou champignons

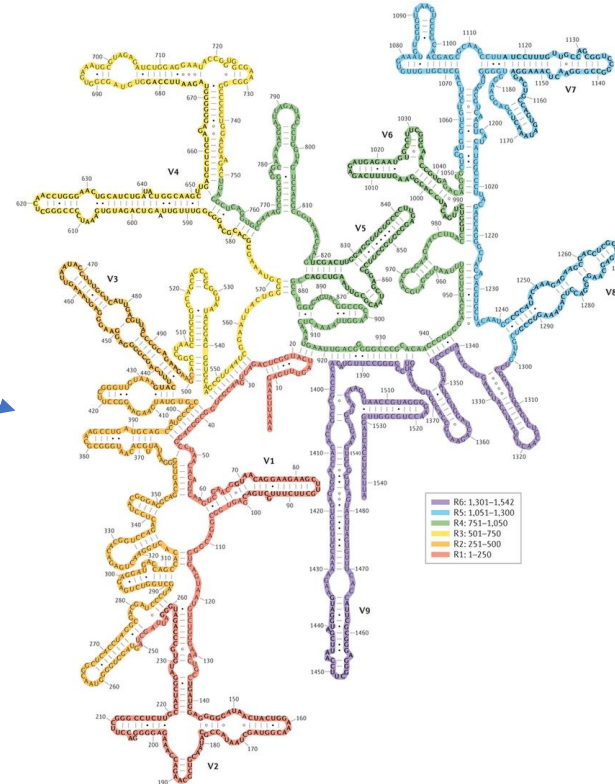
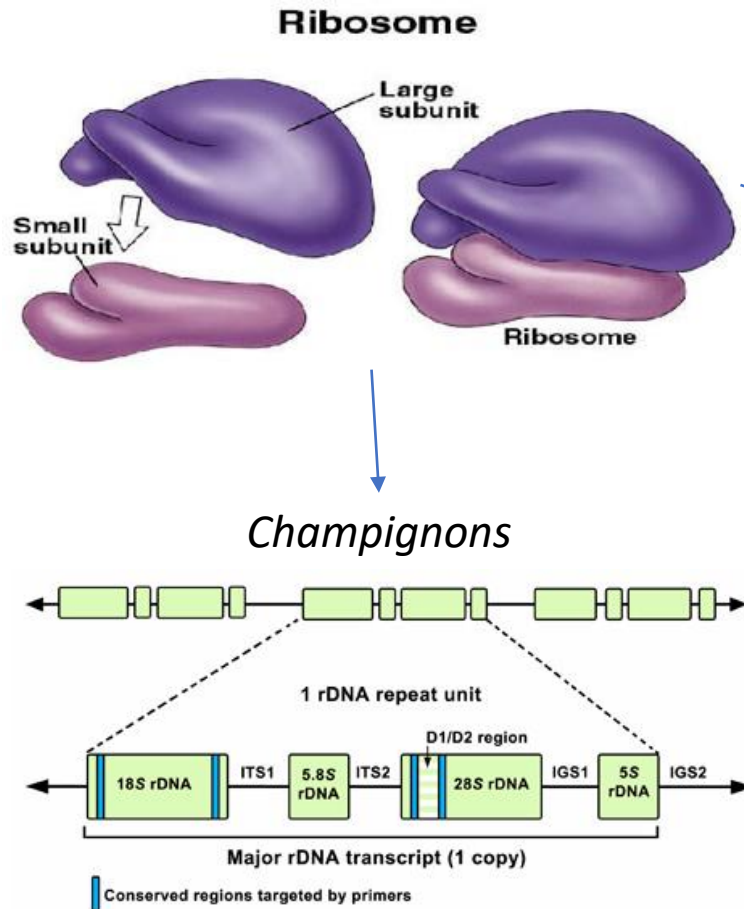
⇒ Lent (48-72h)

⇒ Assez peu coûteux

NGS Ciblé vs NGS Non ciblé (Shotgun)



Qu'est ce que le 16S/ITS



Nature Reviews | Microbiology

Bactéries

16S identification

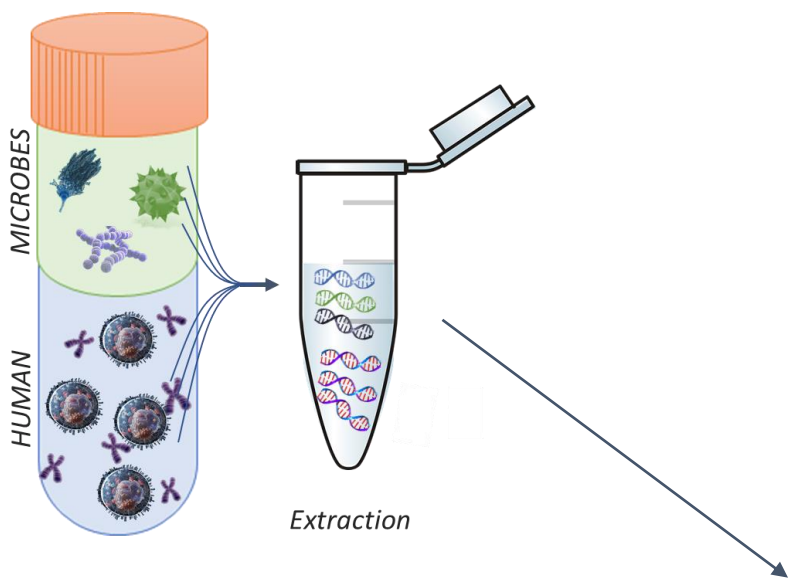
A

Strain	Sequence	Accession number
<i>S. epidermidis</i>	TCCT CTGACCCCTCTAGAGATAGAGT TTT	L37605
<i>S. saccharolyticus</i>	TCCT CTGACCCCTCTAGAGATAGAGT TTT	L37602
<i>S. capitis</i>	TCCT CTGATCCCTCTAGAGATAGAGT TTT	L37599
<i>S. auricularis</i>	TCCT TTGACCGCTCTAGAGATAGAGT TTT	L37598
<i>S. warneri</i>	TCCT TTGACCGCTCTAGAGATAGAGT TTT	L37603
<i>S. haemolyticus</i>	TCCT TTGACAACCTCTAGAGATAGAGC TTT	L37600
<i>S. aureus</i>	TCCT TTGACAACCTCTAGAGATAGAGC TTT	L37597
<i>S. hominis</i>	TCCT TTGACCCCTTCTAGAGATAGAAG TTT	L37601
<i>S. saprophyticus</i>	TCCT TTGAAAACCTCTAGAGATAGAGC TTT	L37596

B

Strain	Sequence	Accession number
<i>S. aureus</i>	CGAA CGGACGAGAAGCTTG CTTCTCT GAT	L37597
<i>S. epidermidis</i>	CGAA CAGACGAGGAGCTTGCTCCTCT GAC	L37605
<i>S. capitis</i>	CGAA CAGACGAGGAGCTTGCTCCTCT GAC	L37599
<i>S. warneri</i>	CGAA CAGATAAGGAGCTTGCTCCTTT GAC	L37603
<i>S. haemolyticus</i>	CGAA CAGACAAGGAGCTTGCTCCTTT GAC	L37600
<i>S. hominis</i>	CGAA CAGACGAGGAGCTTGCTCCTTT GAC	L37601
<i>S. saprophyticus</i>	CGAA CAGATAAGGAGCTTGCTCCTTT GAC	L37596

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



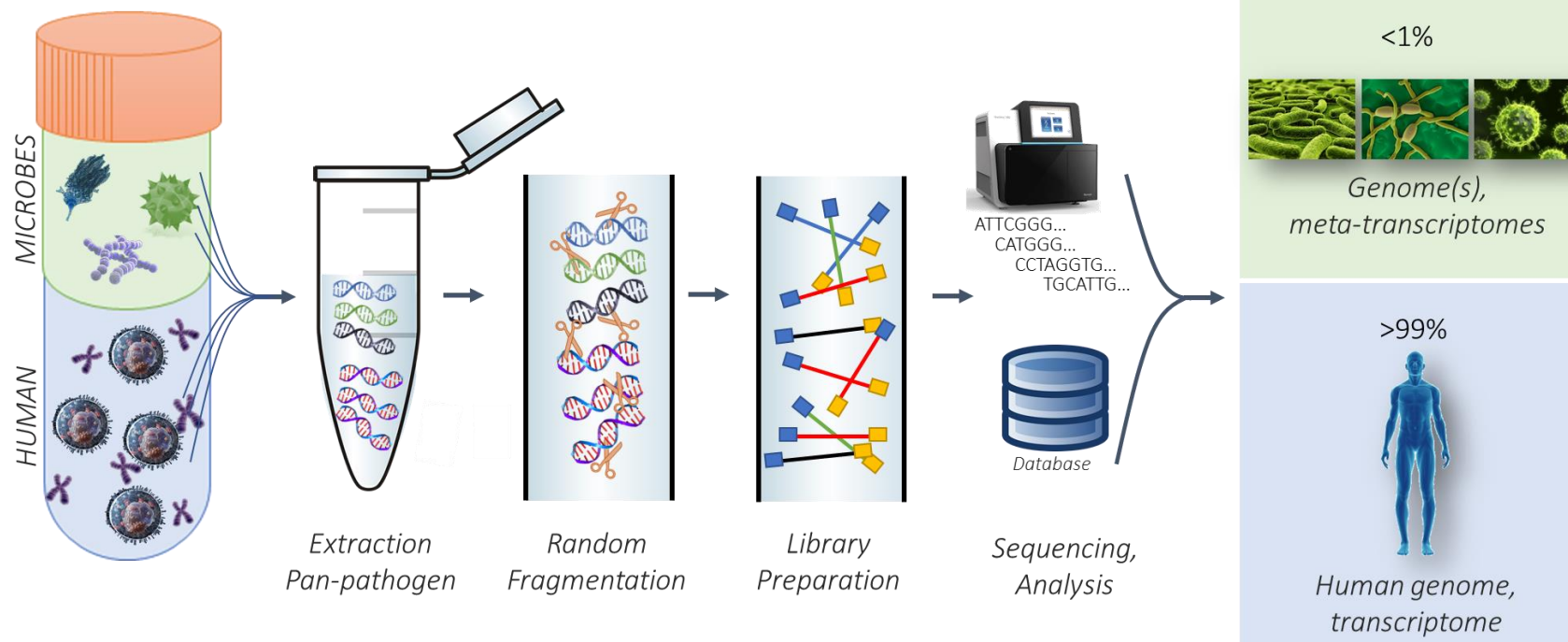
Approche Shotgun métagénomique

Séquençage de la totalité des acides nucléiques d'un échantillon

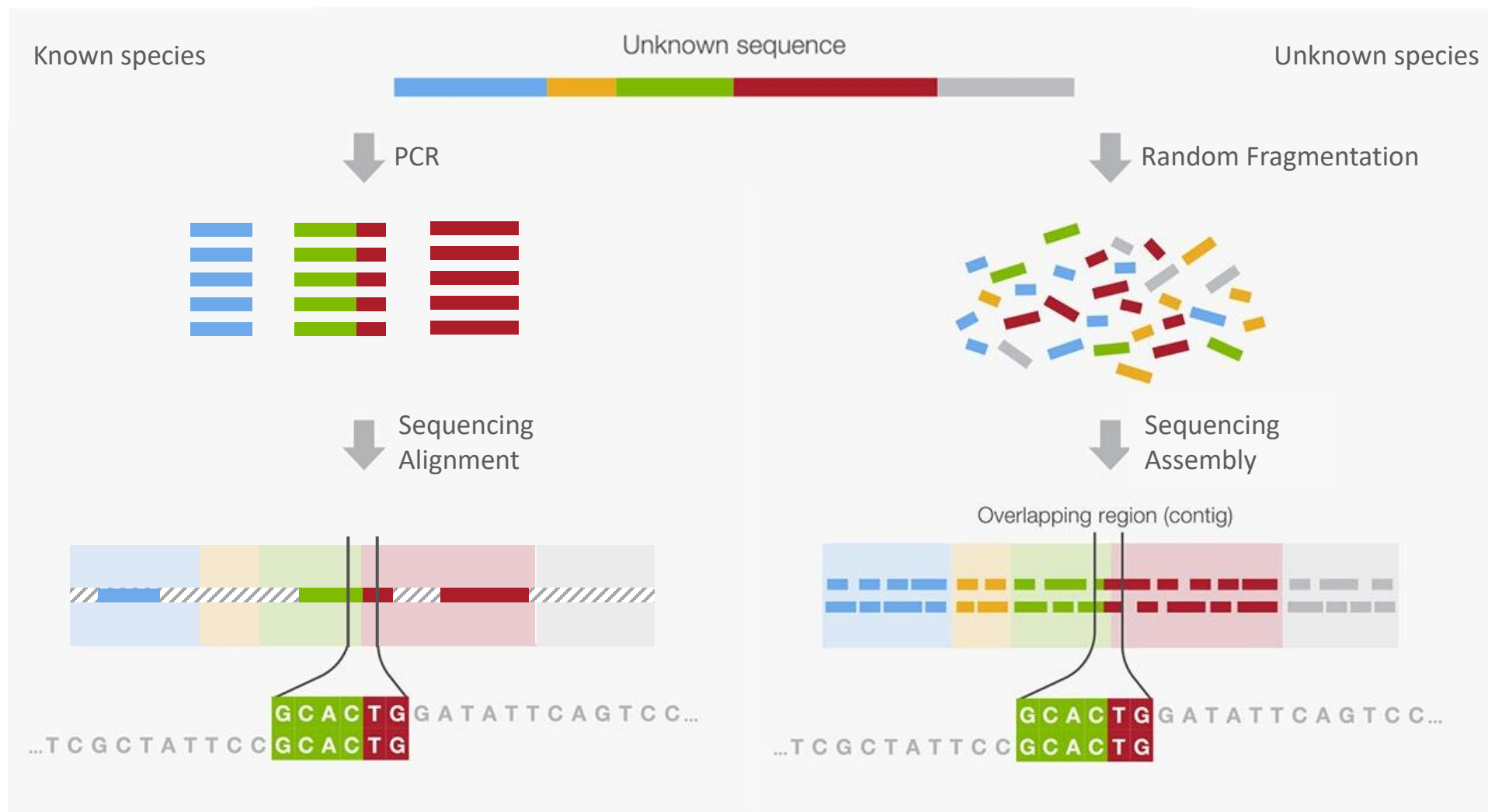
- ⇒ Assez sensible, très spécifique
- ⇒ Tous les microorganismes
- ⇒ Lent (1 semaine)
- ⇒ Couteux

Approche métagénomique Shotgun (SMg)

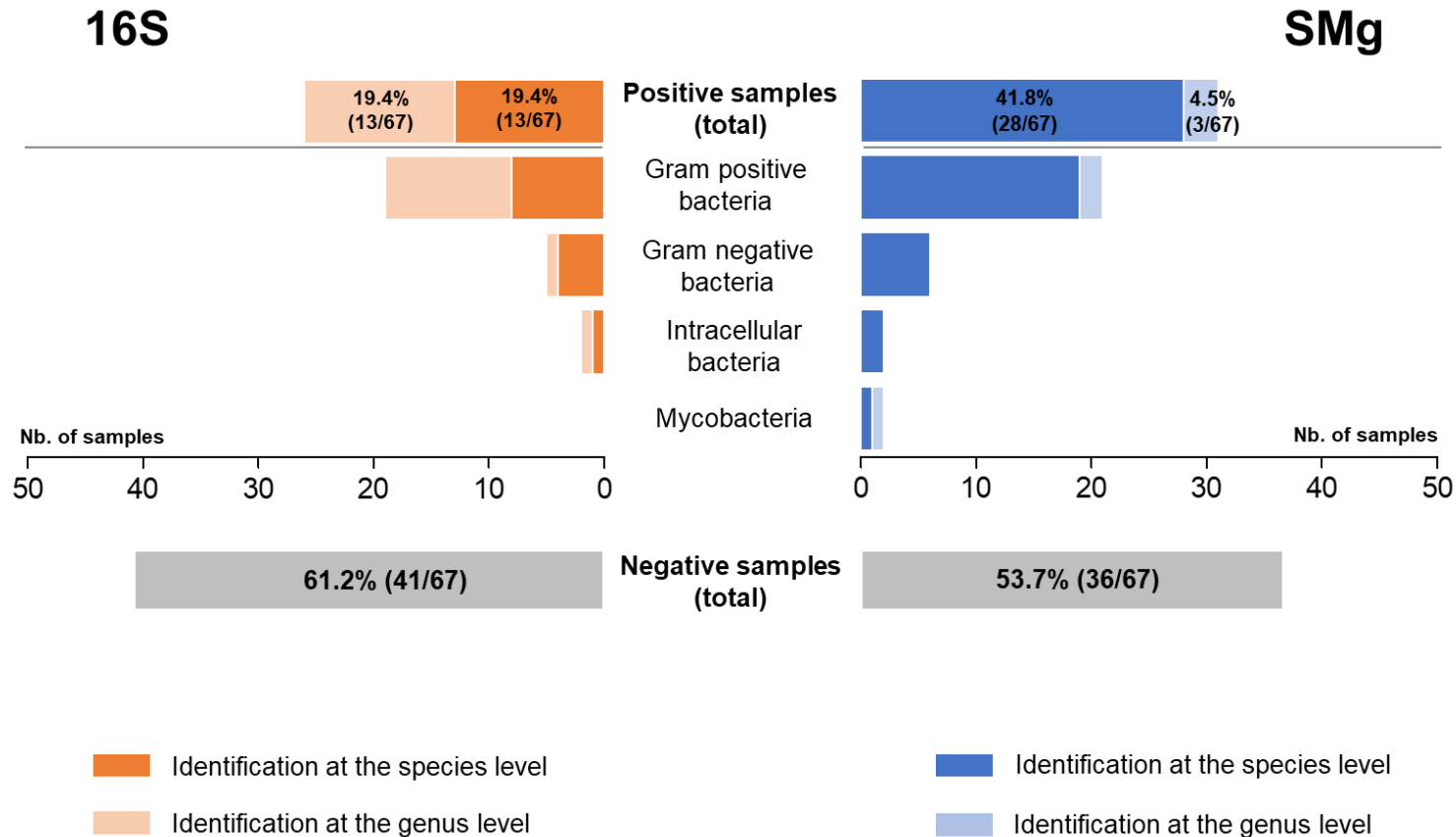
- Métagénomique : étude de la totalité du contenu génétique d'un échantillon par séquençage à haut débit
- Dans le cadre d'une infection chez l'homme :



NGS Ciblé vs NGS Non ciblé (Shotgun)



16S vs Shotgun

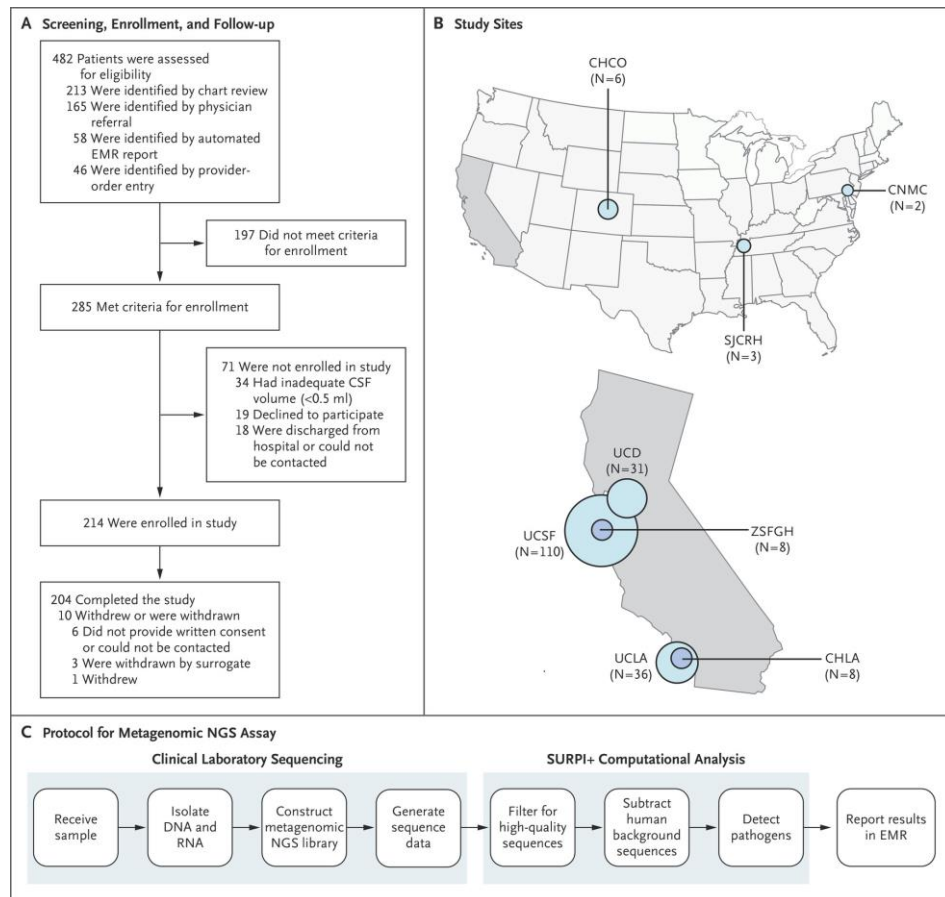


Conclusion:

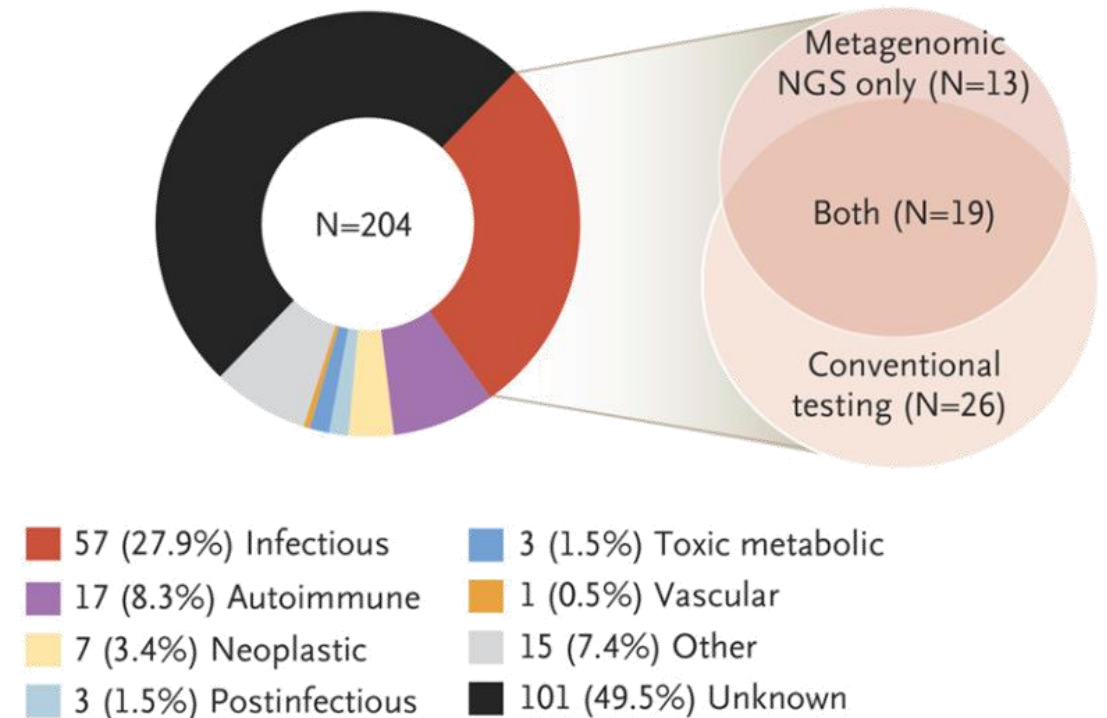
- Pas de différence de **sensibilité** significative entre les deux méthodes
- Meilleure **discrimination** d'espèce de la SMg comparée au 16S (espèce)
- Conséquences sur le **diagnostic** et la **prise en charge**

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

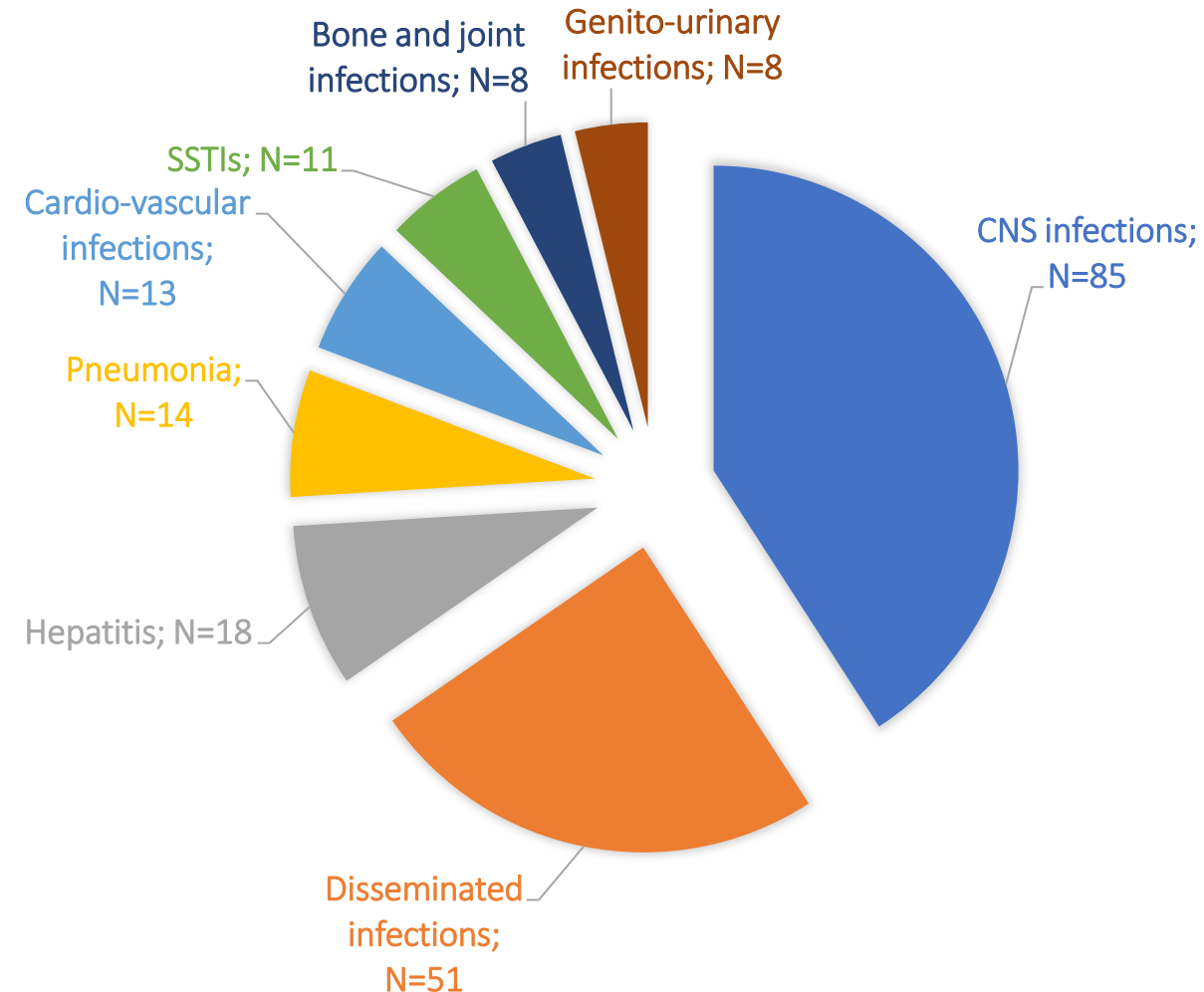
Objectif :

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

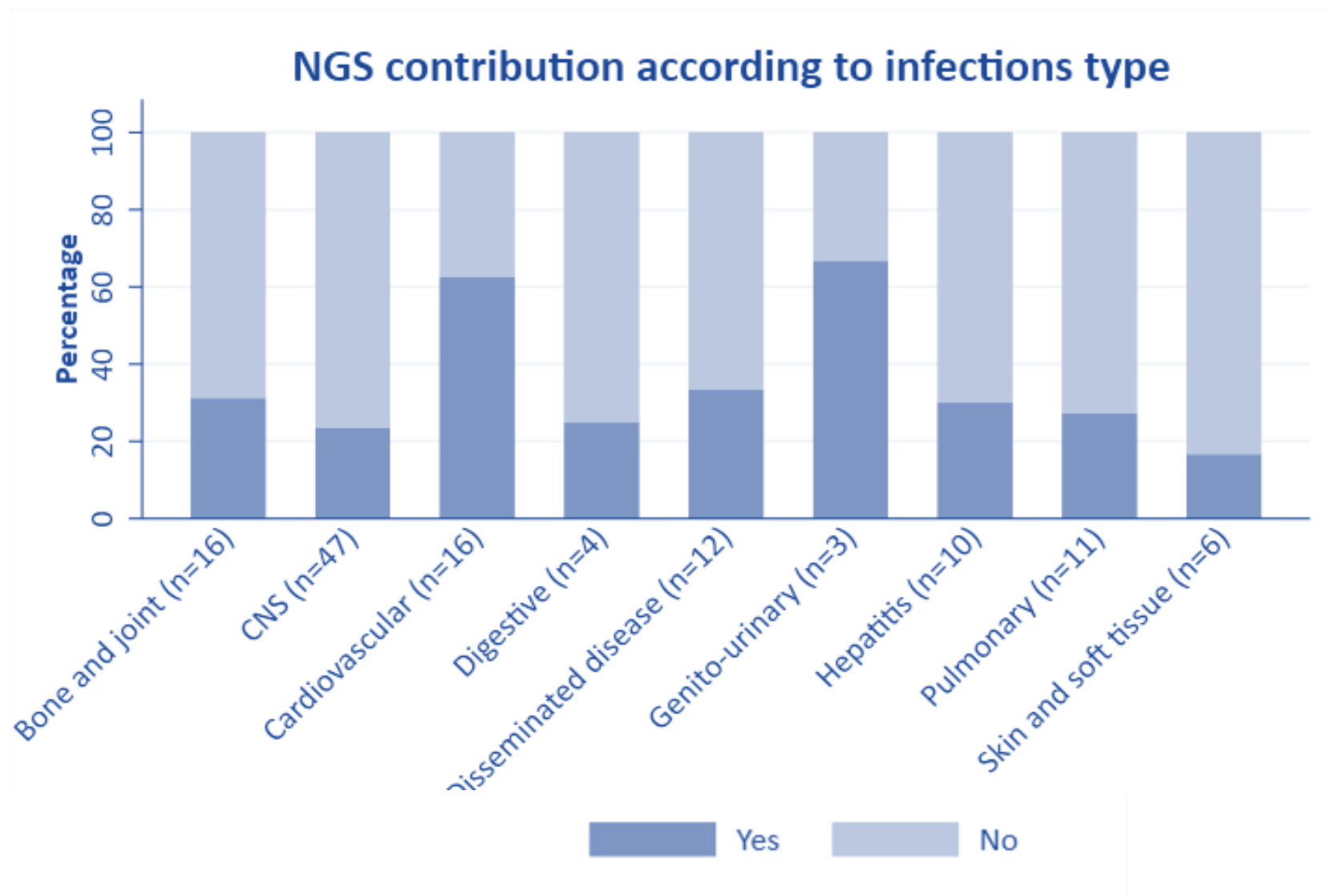
Patients :

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



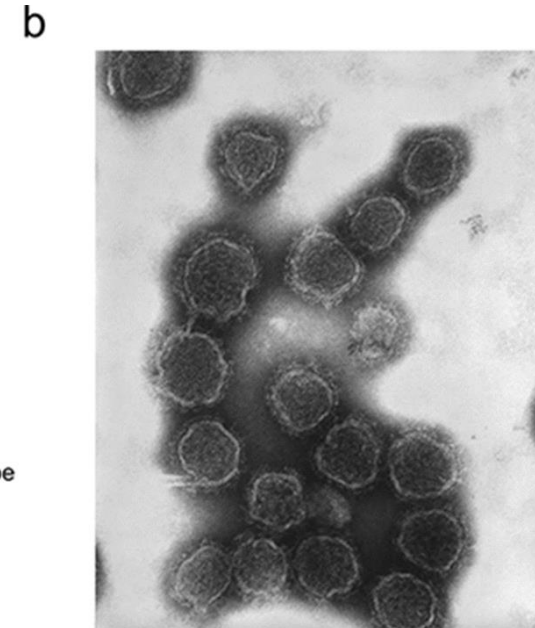
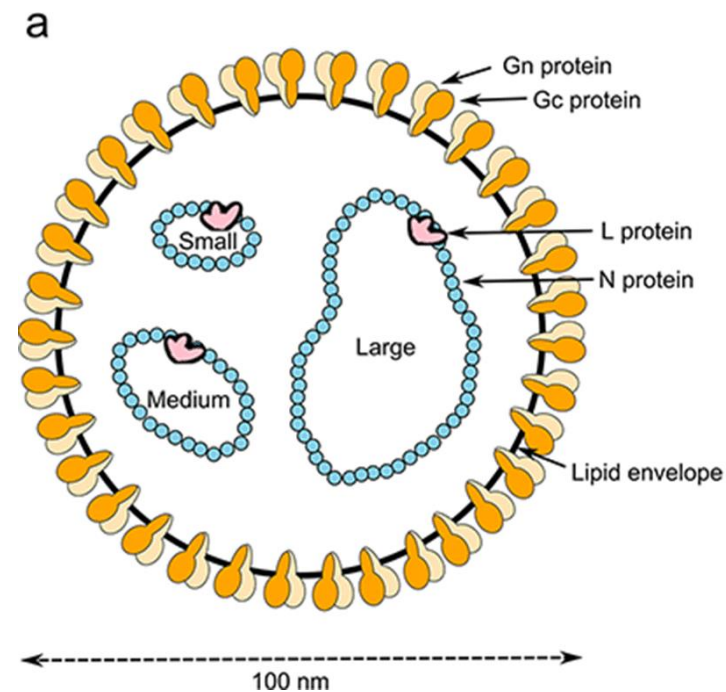
- Mme P, 58 ans, lymphome en 2002 avec rémission complète, hypogammaglobulinémie liée à un possible déficit immunitaire non étiqueté, syndrome myélodysplasique, hépatite auto-immune avec cirrhose (Child B) contrôlée sous Sirolimus.

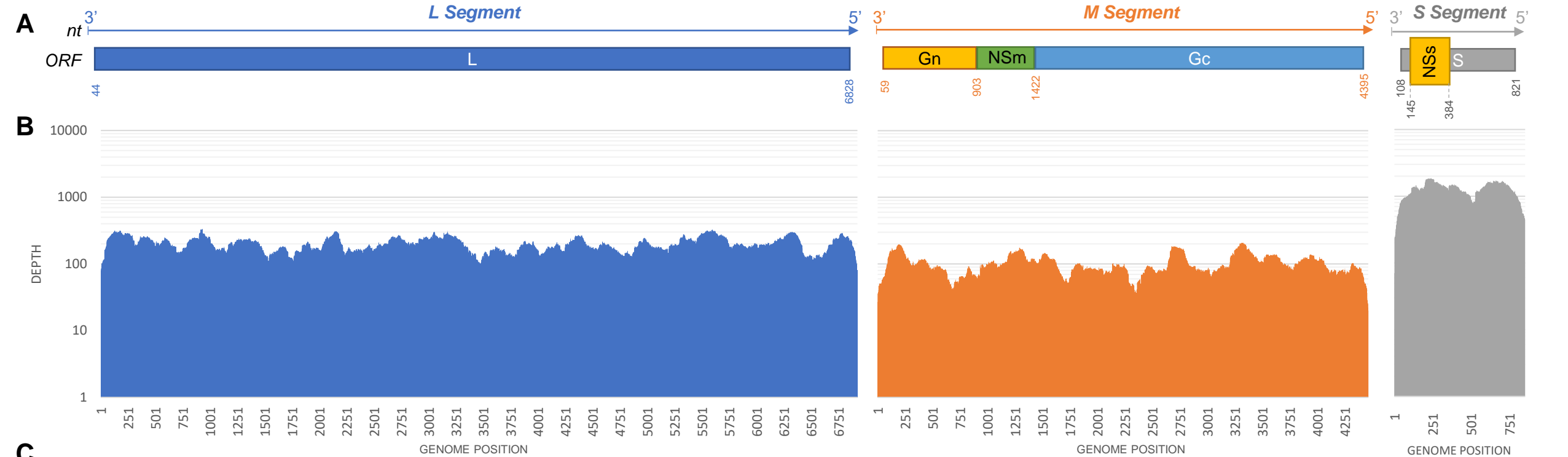


- Oct 2018 : Premiers épisodes de troubles neurologiques et consultations aux urgences de la PSL
- Nov 2018 : Admission aux urgences et transfert en neurologie. Nombreuses explorations bactériologiques et immunitaires sans diagnostic étiologique.
- Février 2019 : Aggravation des signes neuro, transfert 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

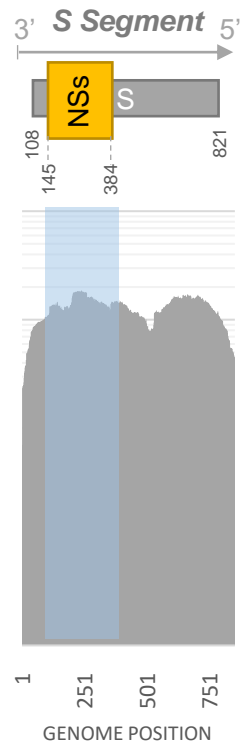
- *Orthobunyavirus*, serogroup Turlock
 - Possiblement Little Sussex ou Umbre mais impossibilité du logiciel de le déterminer précisément, quantité intermédiaire
 - Lancement de l'algo de reconstruction *de novo* (c'est à dire sans référence)





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 ?

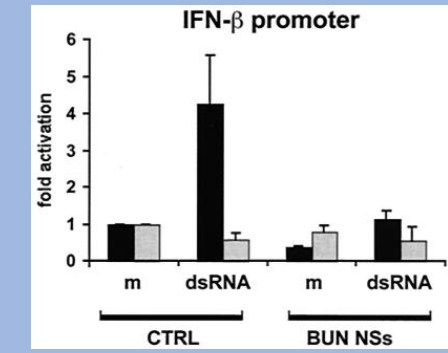


Bunyamwera Bunyavirus Nonstructural Protein NSs Counteracts the Induction of Alpha/Beta Interferon

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

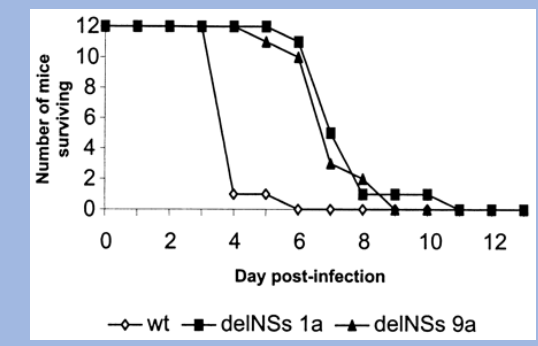


Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis

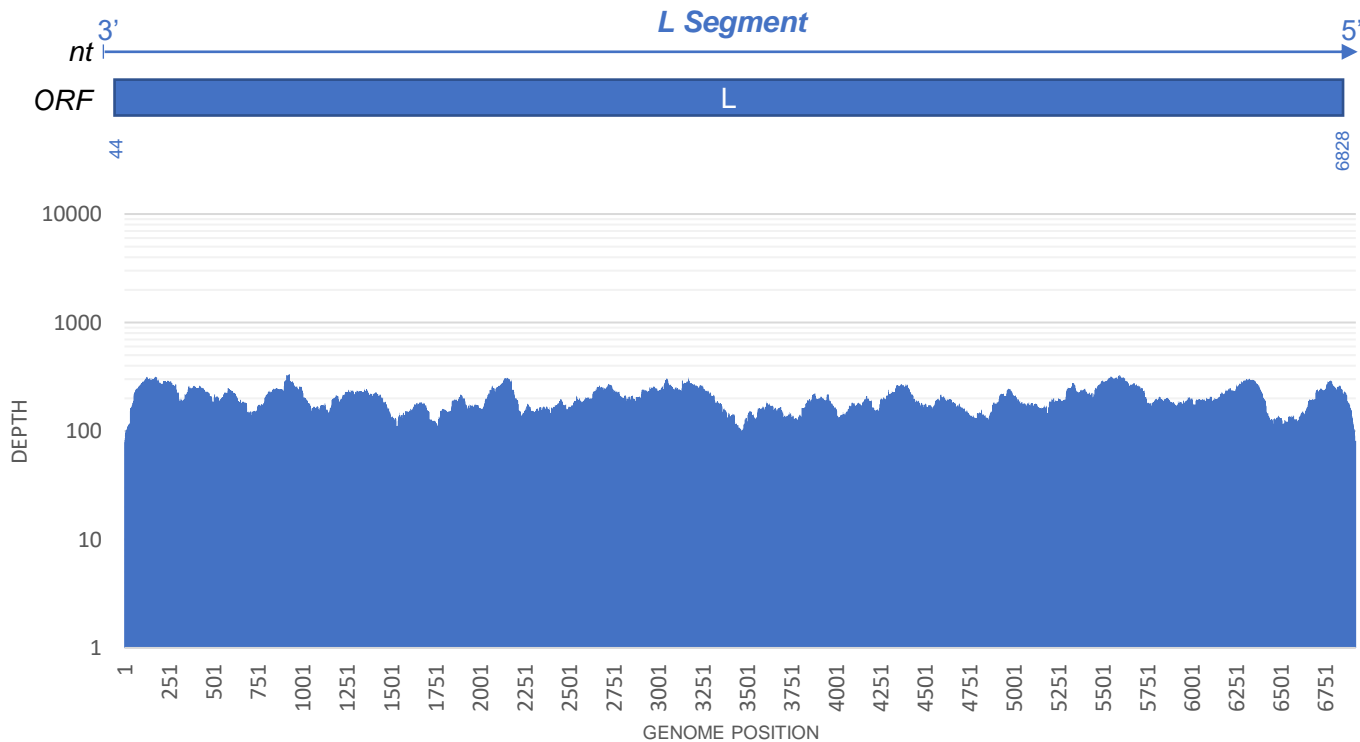
Anne Bridgen^{*†}, Friedemann Weber^{*†}, John K. Fazakerley[‡], and Richard M. Elliott^{*§}

**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*

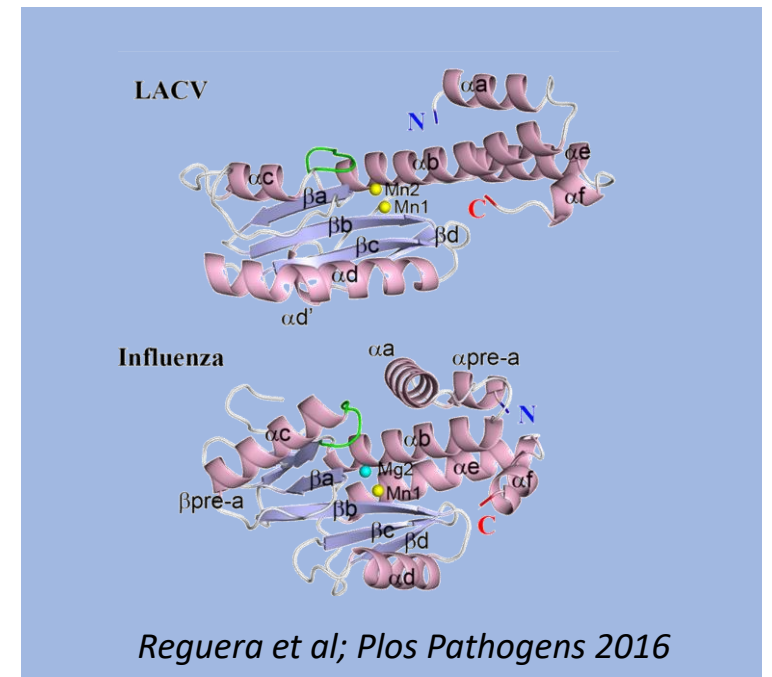
Communicated by Peter Palese, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, October 31, 2000 (received for review September 13, 2000)



La protéine L



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



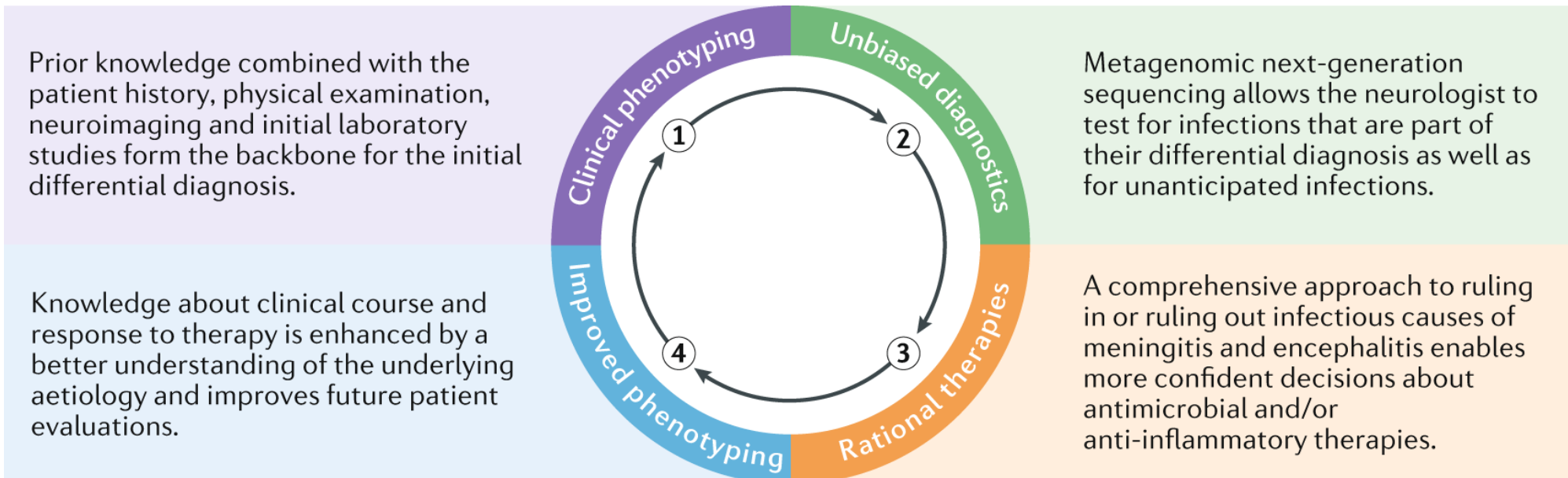
Recommendations ?

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](#)



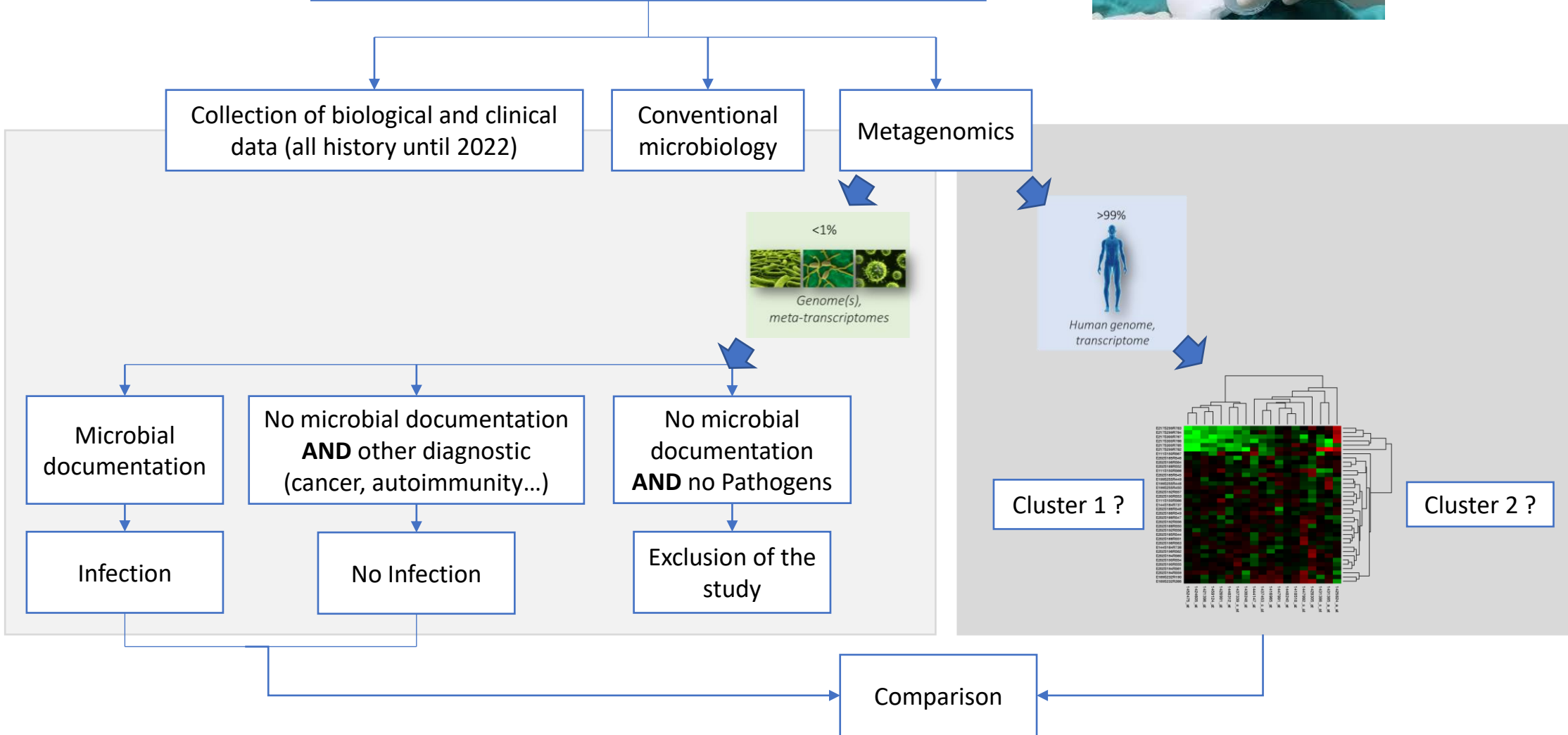
Perspectives

- Utilisation des données de Transcriptomique humaine produites par la métagénomique

=> Etude rétrospective monocentrique (ECCMID 2023)

Patients

All patients who had a CSF sample collected in 2016 at Henri Mondor Hospital and for whom more than 3 white blood cells were found



Microbial documentation

Infection

No microbial documentation AND other diagnostic (cancer, autoimmunity...)

No Infection

No microbial documentation AND no Pathogens

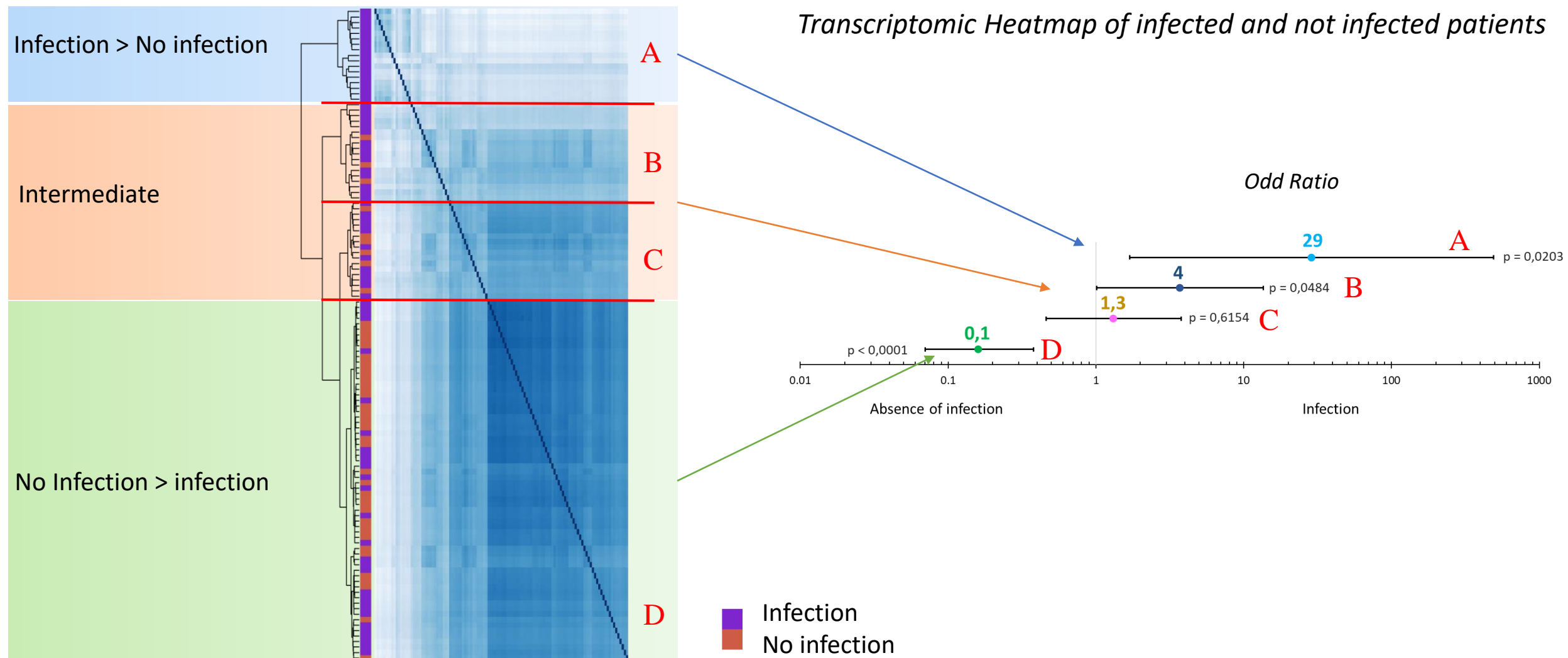
Exclusion of the study

Cluster 1 ?

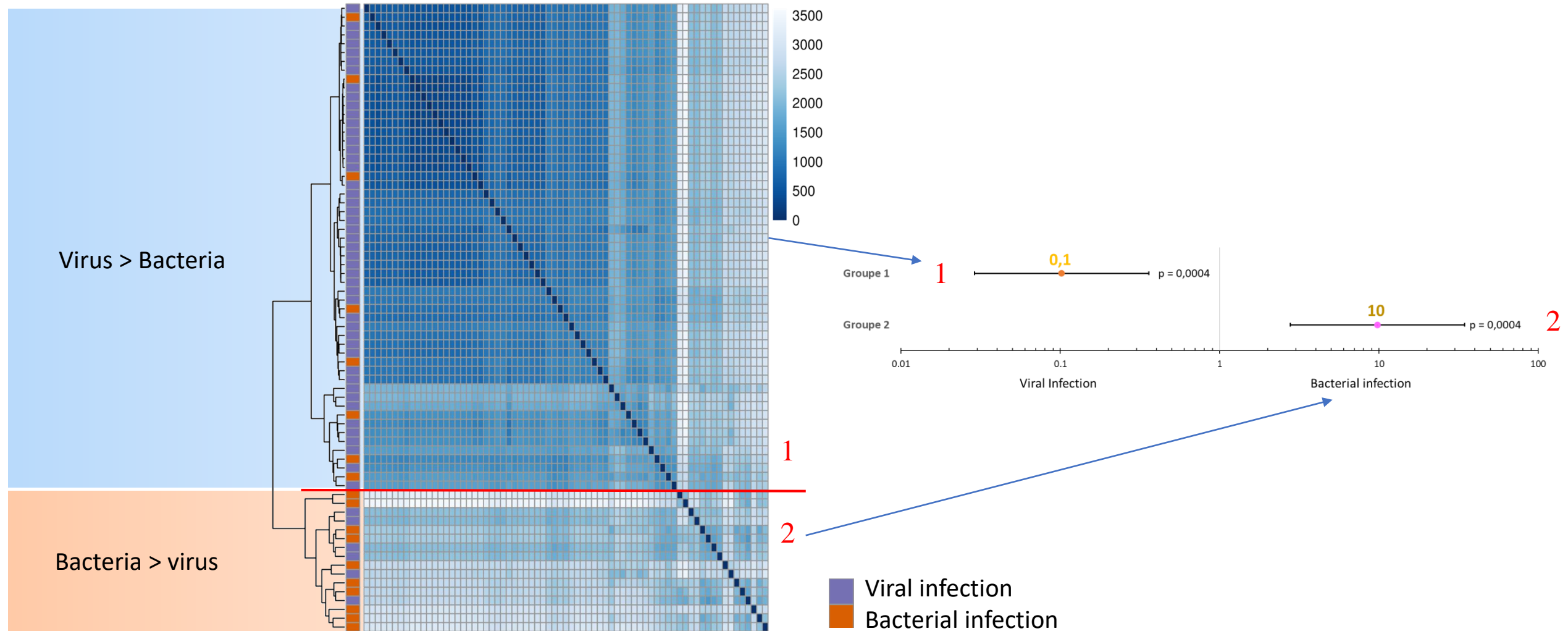
Cluster 2 ?

Comparison

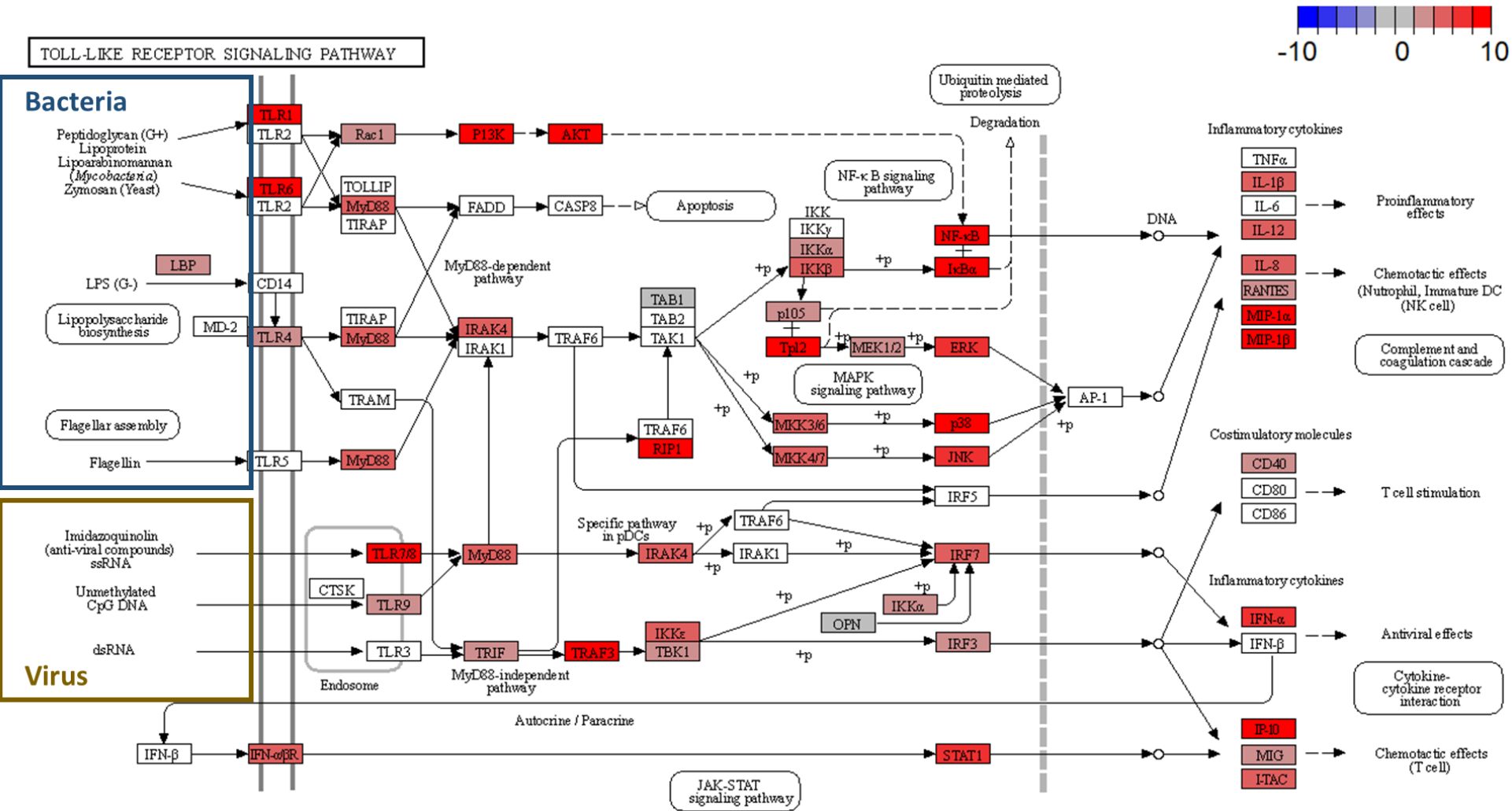
Infection (N=73) vs no infections (N=48) ?



Viral Infection (N=53) vs bacterial infections (N=18) ?



Most involved pathway



Conclusion

- Les techniques de biologie moléculaire peuvent surpasser les techniques de culture 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 mais tend vers une utilisation plus fréquente pour les encéphalites à minima
- 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)

Remerciements

MetaMIC Project

Technique

Vanessa Demontant,
Anais Nguyen

Bioinformatique

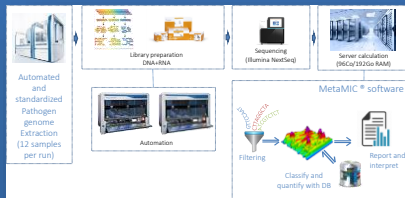
Guillaume Gricourt,
Melissa Ndebi

Experts microbio

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

Responsables projets

Christophe Rodriguez,
Jean-Michel Pawlotsky



Contributors

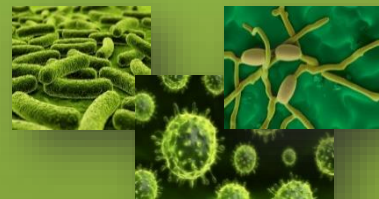
Inserm U955 Team 18

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

