

Diagnostic microbiologique et Métagénomique dans les infections ostéoarticulaires (IOA)



Paul-Louis WOERTHER

Unité de Bactériologie,
Département Prévention, Diagnostic et Traitement des Infections
CHU Henri Mondor, Créteil

Recommandations

Infectious diseases now 54 (2024) 104832



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Infectious Diseases Now

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/infectious-diseases-now



Guidelines

Clinical practice recommendations for infectious disease management of diabetic foot infection (DFI) – 2023 SPILF



Infectious Diseases Now 53 (2023) 104647



ELSEVIER

Available online at

ScienceDirect

www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte

www.em-consulte.com/en



Guidelines

2022 SPILF - Clinical Practice guidelines for the diagnosis and treatment of disco-vertebral infection in adults



M. Lacasse^{a,*}, S. Derolez^b, E. Bonnet^{c,*}, A. Amelot^d, B. Bouyer^e, R. Carlier^f, G. Coiffier^g, J.P. Cottier^h, A. Dinhⁱ, I. Maldonado^j, F. Paycha^k, J.M. Ziza^l, P. Bemer^m, L. Bernard^a, the Review group
Géraldine Bart^{aa}, Pascal Coquerelle^{ab}, Stéphane Corvec^{ac}, Anne Cotten^{ad}, Marion Couderc^{ae}, E. Denes^{af}, Arnaud Dupeyron^{ag}, Sophie Godot^{ah}, Marion Grare^{ai}, A. Homs^{aj}, Brigitte Lam^{ak}, Jean Philippe Lavigne^{al}, V. Lemoine^{am}, Edouard Pertuiset^{an}, P. Ribinik^{ao}, France Rohlot^{ap}, Eric Senneville^{aq}, Jean Philinne Talarmin^{ar}

Infectious Diseases Now 53 (2023) 104694



ELSEVIER

Available online at

ScienceDirect

www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte

www.em-consulte.com/en



Guidelines

SPILF update on bacterial arthritis in adults and children

J.P. Stahl^{a,*}, E. Canoui^b, P. Pavese^c, A. Bleibtreu^d, V. Dubée^e, T. Ferry^f, Y. Gillet^g, A. Lemaigen^h, M. Lorrotⁱ, J. Lourtet-Hascoët^j, R. Manquin^k, V. Meyssonier^{l,m}, T.-T. Pham^{f,n}, E. Varon^o, P. Lesprit^c, R. Gauzit^b, the reviewers¹



Recommandations de pratique clinique
Infections ostéo-articulaires sur matériel
(prothèse, implant, ostéosynthèse)

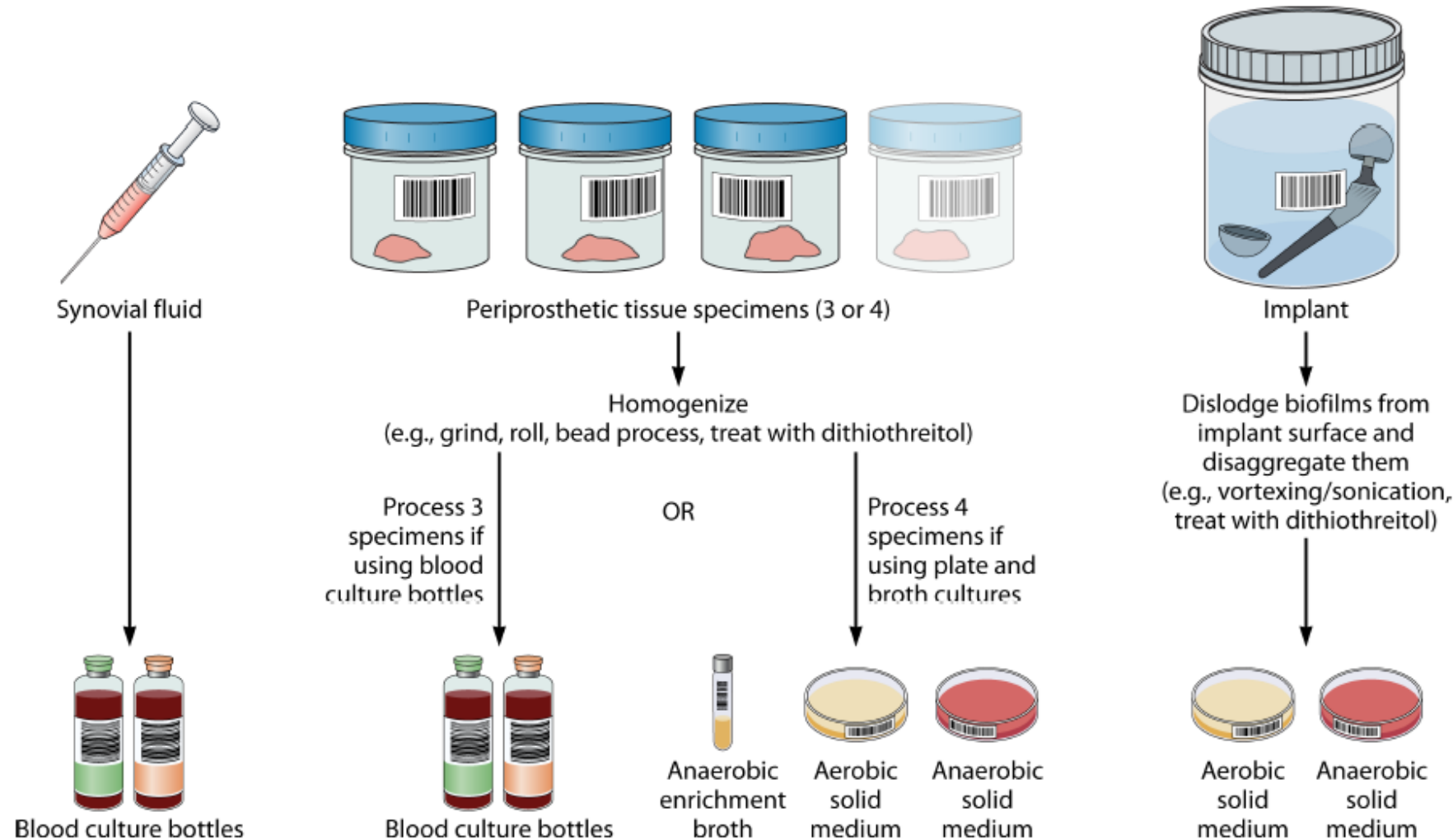
+ recommandations IDSA, MSIS, EBJIS, HAS...

Rémic

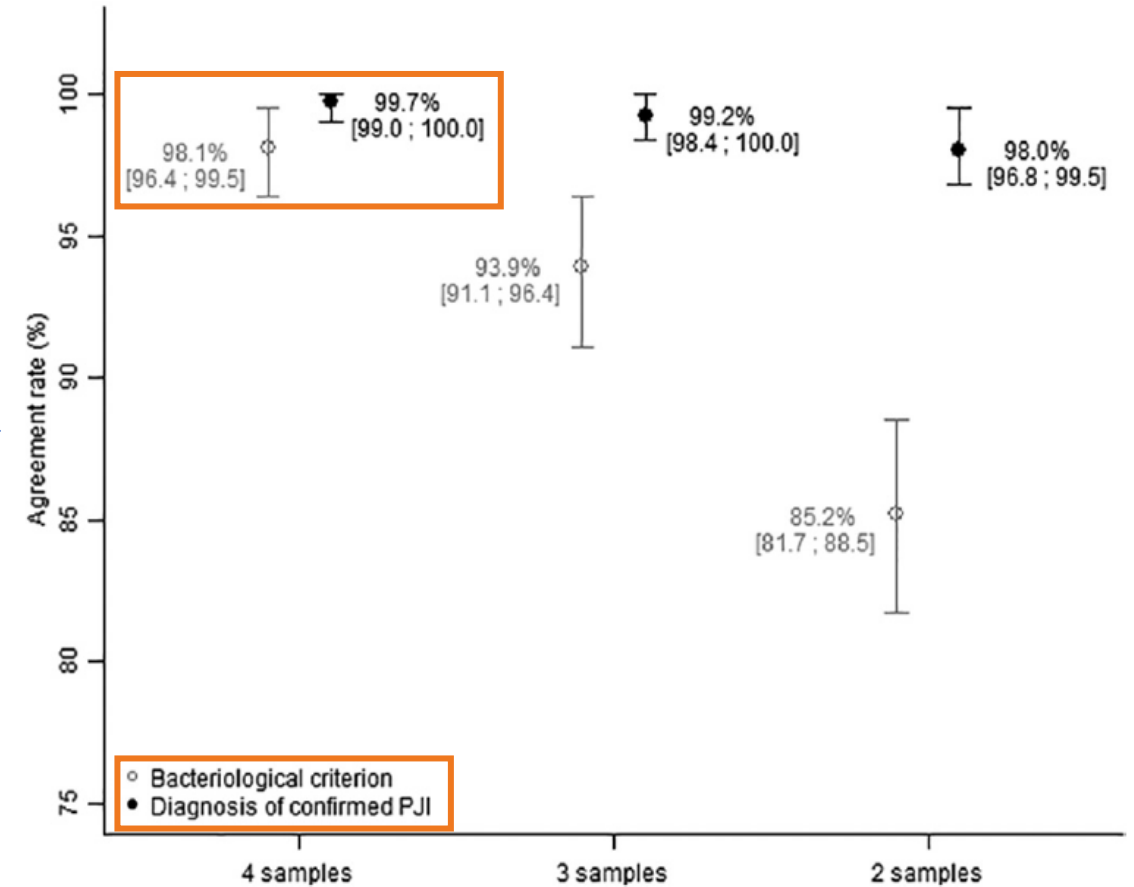
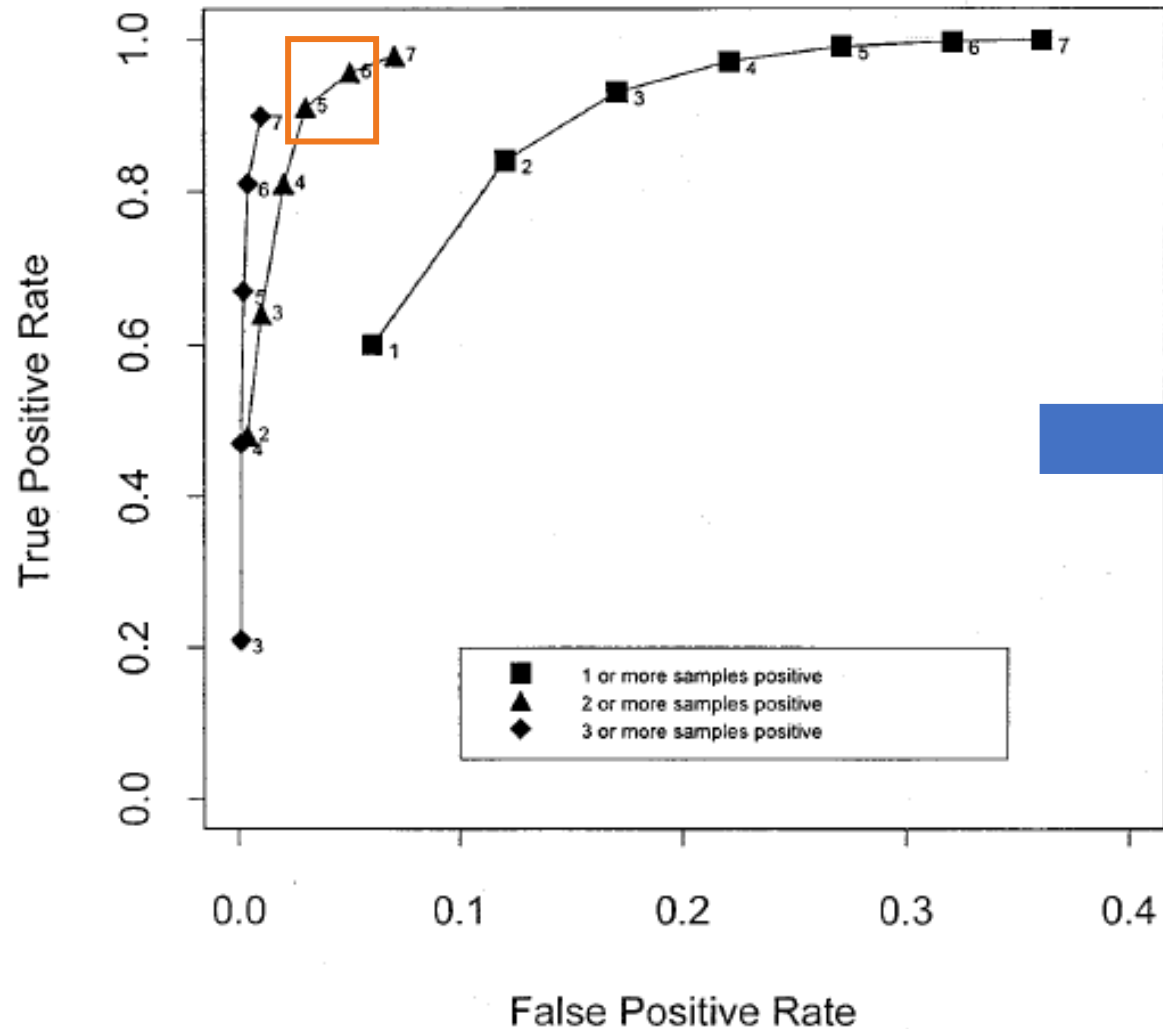
Référentiel
en microbiologie
médicale

7^{ème} édition 2022

Proposition de stratégie diagnostique pour les infections de matériel prothétique – Mayo Clinic



Infections de prothèses et échantillons



Apport du broyage

Diagnosis of prosthetic joint infection by beadmill processing of a periprosthetic specimen

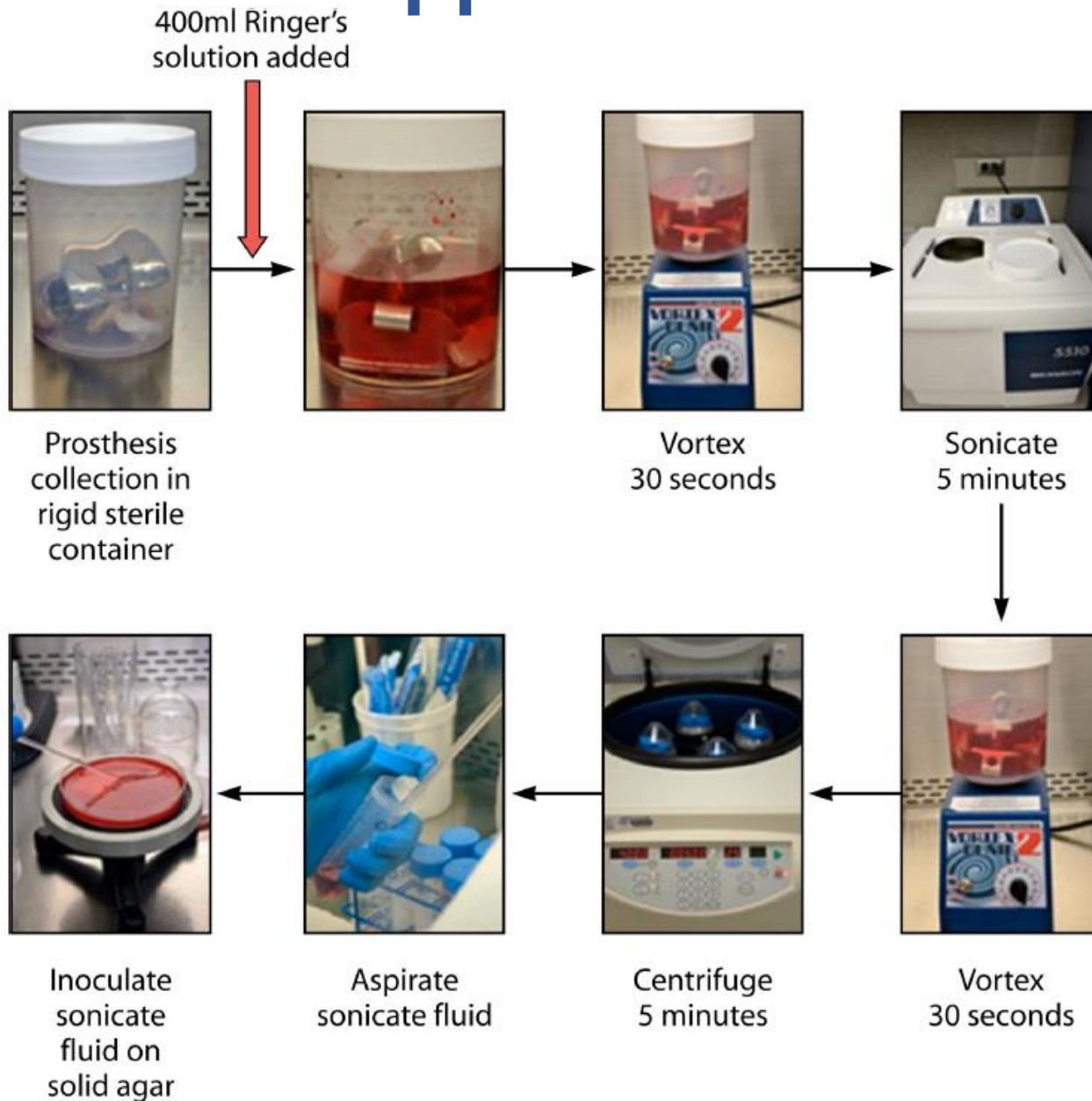
Clin Microbiol Infect 2011; 17: 447–450

A.-L. Roux^{1,2}, V. Sivadon-Tardy^{1,3}, T. Bauer^{4,5},
A. Lortat-Jacob^{4,5}, J.-L. Herrmann^{1,2}, J.-L. Gaillard^{1,3}
and M. Rottman^{1,2}

Sensibilité 83,7%

Global (n = 116)	Conventional		Bayesian		p-Value *
	Estimate	CI 95%	Estimate	CrI 95%	
Standard	Sensitivity	75.2%	66.8–83.7	66.7%	0.0005
	Specificity	100%	100–100	99.2%	
Ultra-Turrax®	Sensitivity	87.1%	80.6–93.7	77.1%	
	Specificity	100%	100–100	99.1%	

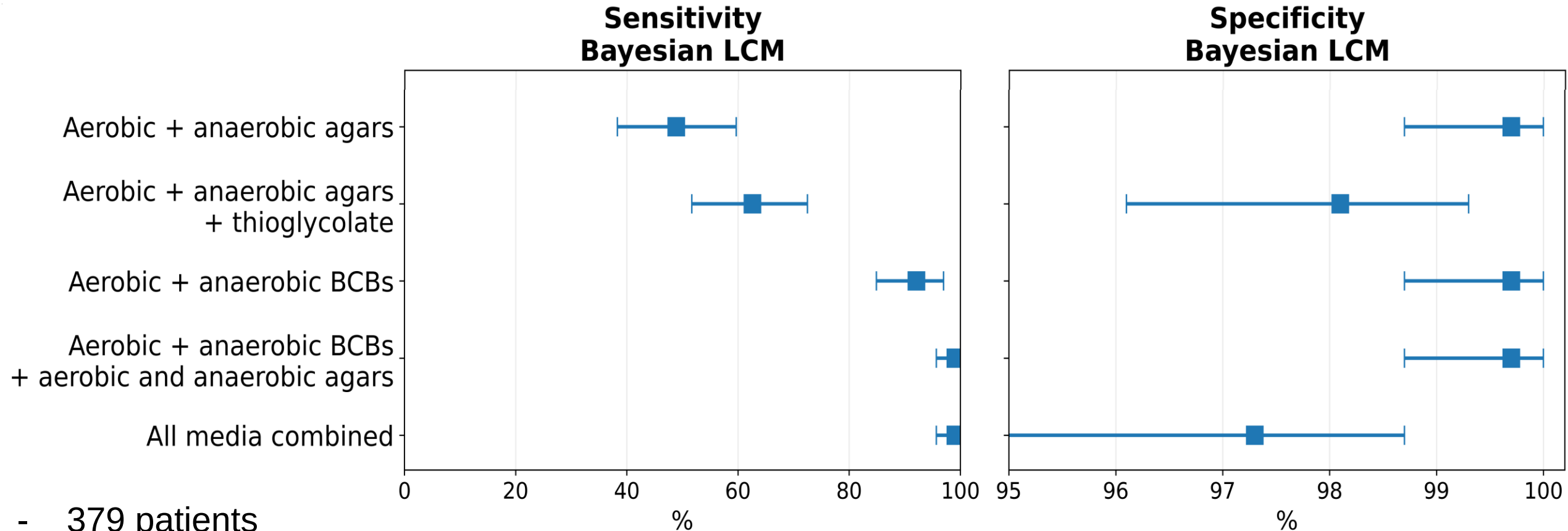
Apport de la sonication des prothèses



... un bénéfice de sensibilité/spécificité discutable si le process est optimisé dans la prise en charge des pièces opératoires...

Un processus contraignant...

Optimisation des milieux de culture

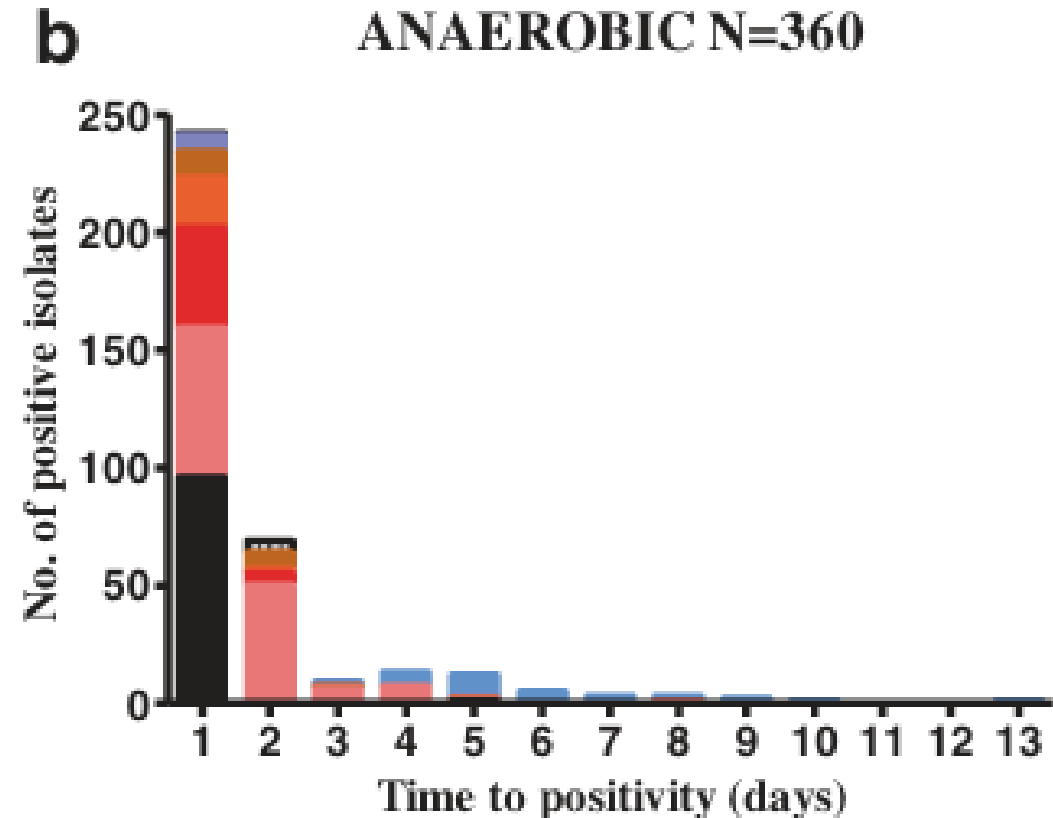
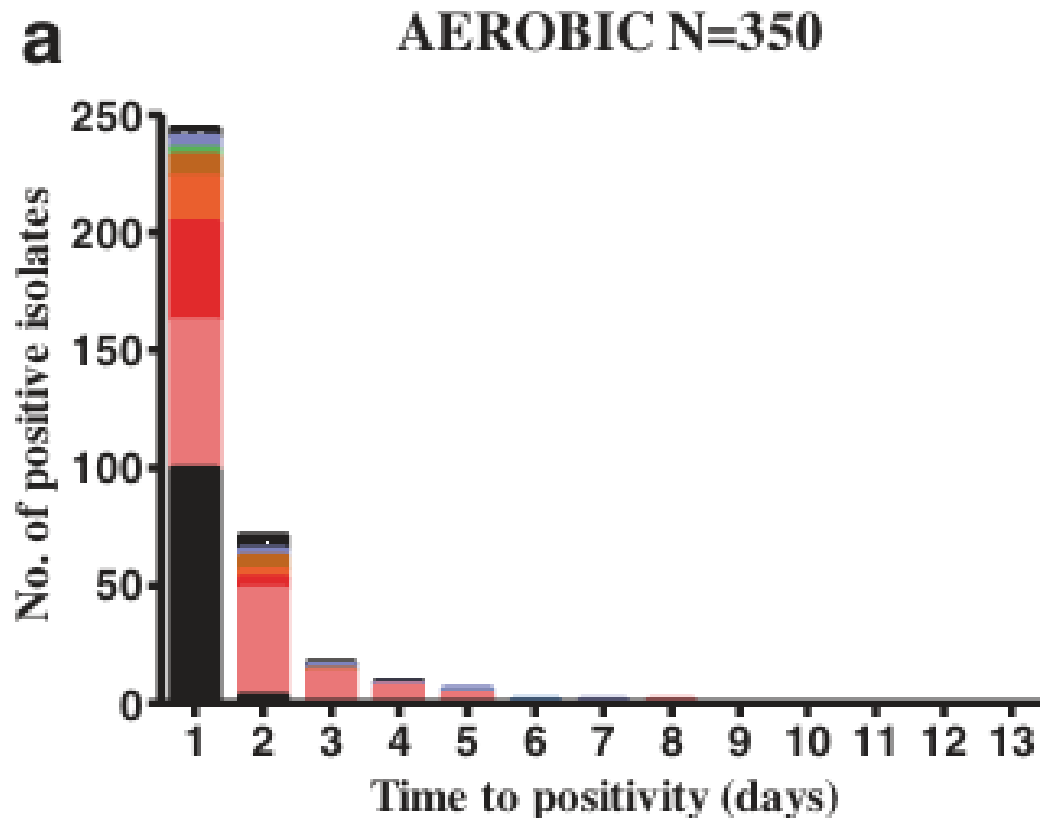


- 379 patients
- 117 infections prothétiques (critère IDSA)
- 82% d'infection chronique
- Médiane de 3 éch. par patient

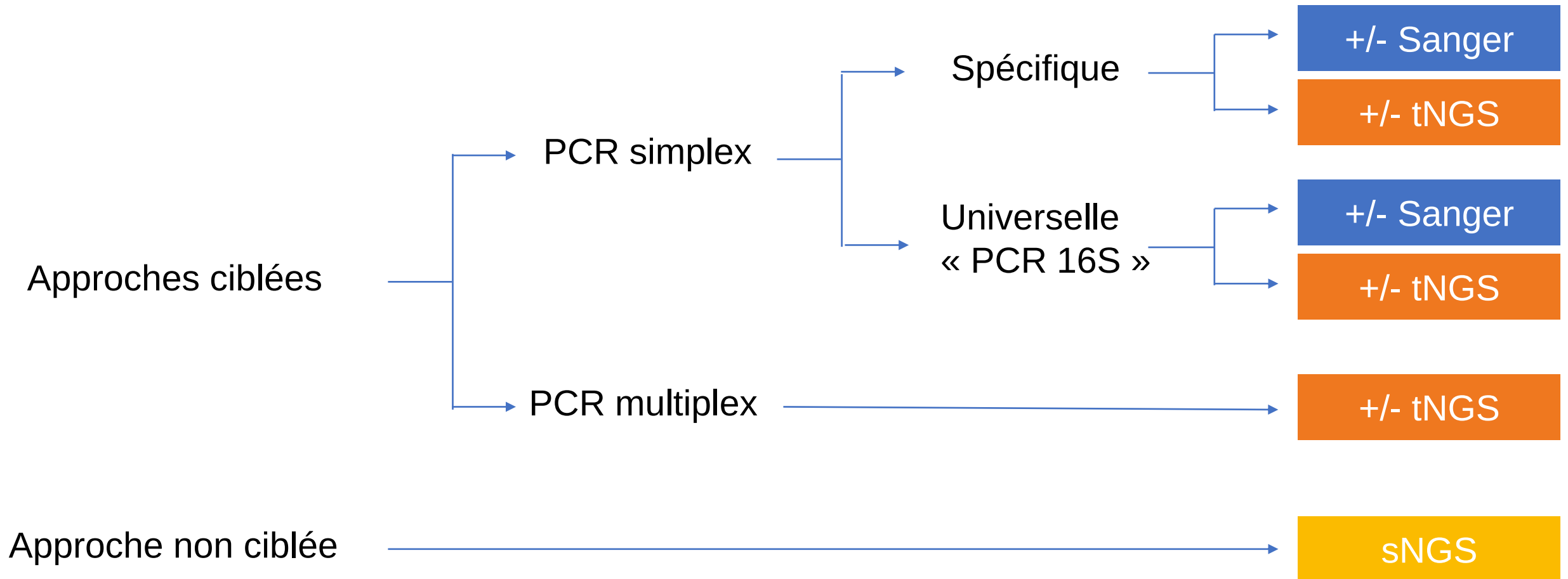
d'après Peel, mBio, 2016; Peel, JCM, 2017

Délais de positivité des flacons d'hémoculture

96% de positivité dans les 5 premiers jours



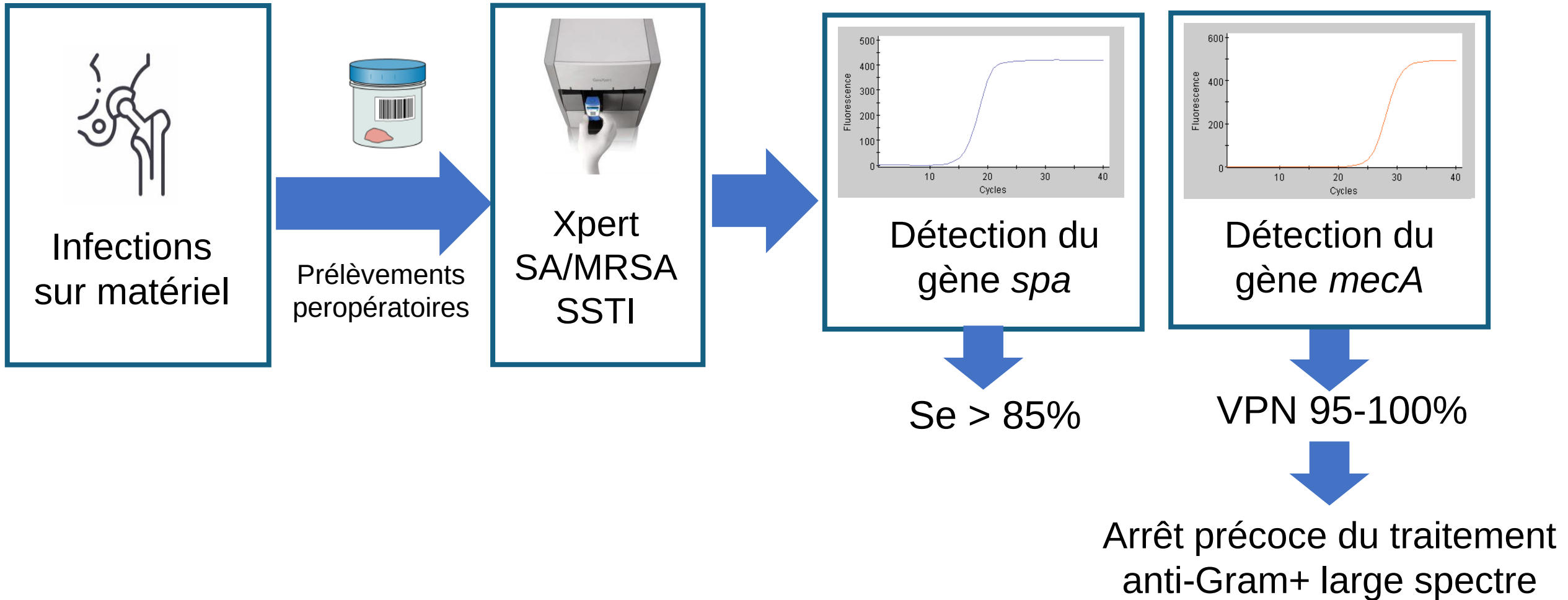
Principes des principales approches moléculaires



tNGS: targeted NGS, sNGS : shotgun NGS (« métagénomique »)

(Adapté du PILLY, 28^{ème} édition)

Apport de PCR spécifiques



Apport de PCR spécifiques

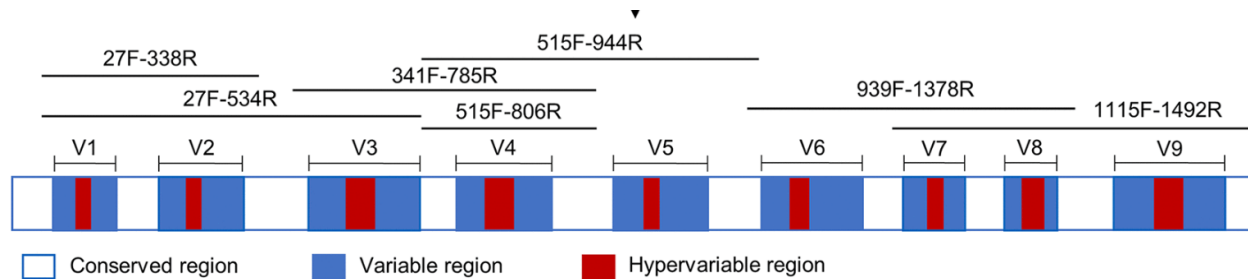
- Détection de pathogènes non cultivables ou de culture difficile dans des contextes cliniques particuliers : *K. kingae*, mycoplasmes, *Coxiella* spp., *Bartonella* spp...
- Bénéfice de la PCR spécifique associé à la culture dans cadre de suspicion de spondylodiscite tuberculeuse

Test	Sensitivity (%) ^a	Specificity (%) ^a	N ^b
Culture	50.0% (24.7%–75.3%)	100.0% (94.6%–100.0%)	83
PCR	68.8% (41.3%–89.0%)	100.0% (94.6%–100.0%)	83
Culture + PCR	87.5% (61.7%–98.4%)	100.0% (94.6%–100.0%)	83
P value ^c	.01	NA	

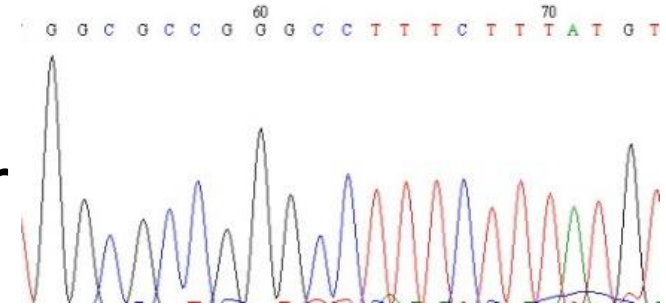
Apport de PCR multiplex

- Bénéfice d'approches commerciales : facilité de réalisation et délai de résultats
- Bonnes performances, mais couverture non exhaustive de pathogènes (Esteban *et al.*, JCM, 2023)
- Indications :
 - Arthrite septique sur articulation native communautaire chez l'adulte
 - IOA sur prothèse post-opératoire aigüe, hématogène (hanche et genou)
- Bénéfice clinique à définir dans des algorithmes décisionnels (« diagnostic stewardship »)

Principe de la PCR 16S



Sanger



NGS



Adapté aux diagnostics des infections polymicrobiennes

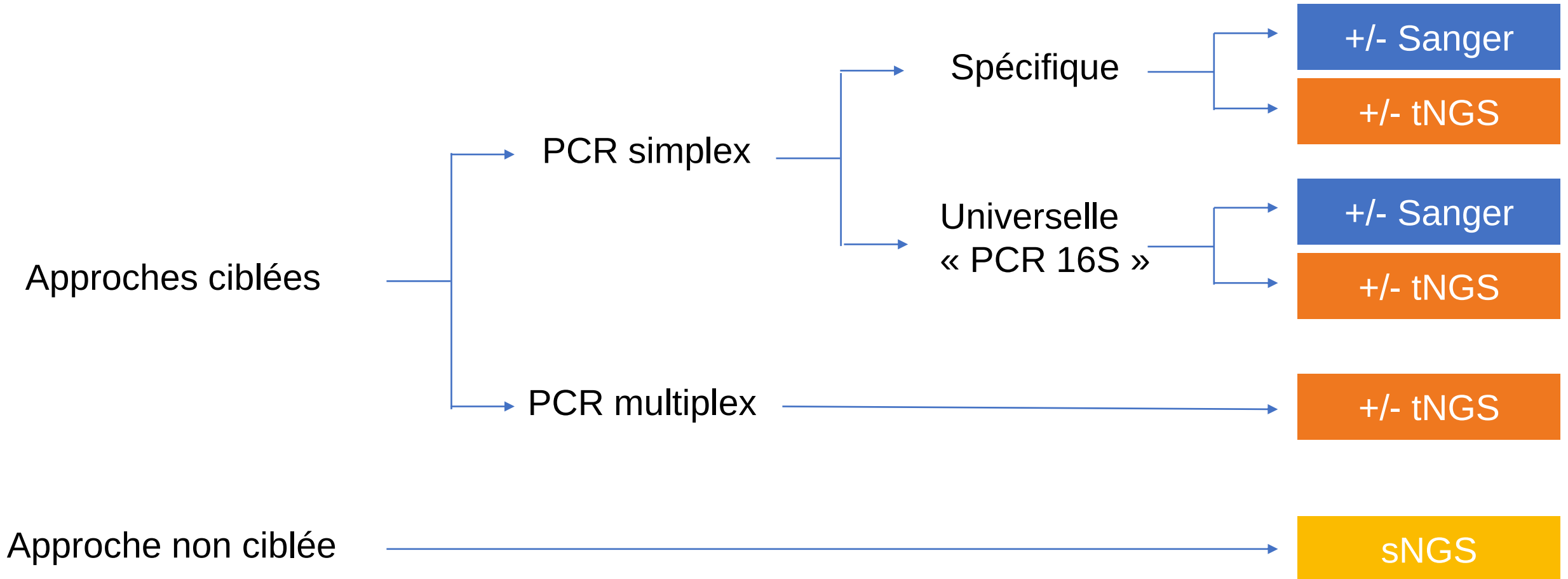
Variabilité de performances et de discrimination en fonction de la région amplifiée

Apport de la PCR 16S

- Intérêt en cas de forte suspicion clinique d'IOA :
 - Germes fragiles ou de croissance difficile (Levy *et al.*, 2013, Fenollar *et al.*, 2006, Rosey *et al.*, 2007)
 - Apport en cas d'infection décapitée (Levy *et al.*, 2013, Bémer, JCM, 2014)
 - Ne se substitue pas à la culture !

Test	Sensitivity (%) ^a	Specificity (%) ^a	n
Culture	81.8% (70.4%–93.2%)	93.3% (89.4%–97.1%)	207
16S-PCR	85.4% (74.5%–96.2%)	96.4% (93.5%–99.2%)	207
Culture + 16S-PCR	95.5% (89.3%–100.0%)	90.2% (85.6%–94.8%)	207
<i>P</i> value ^b	.01	.03	

Principes des principales approches moléculaires



tNGS: targeted NGS, sNGS : shotgun NGS (« métagénomique »)

(Adapté du PILLY, 28^{ème} édition)

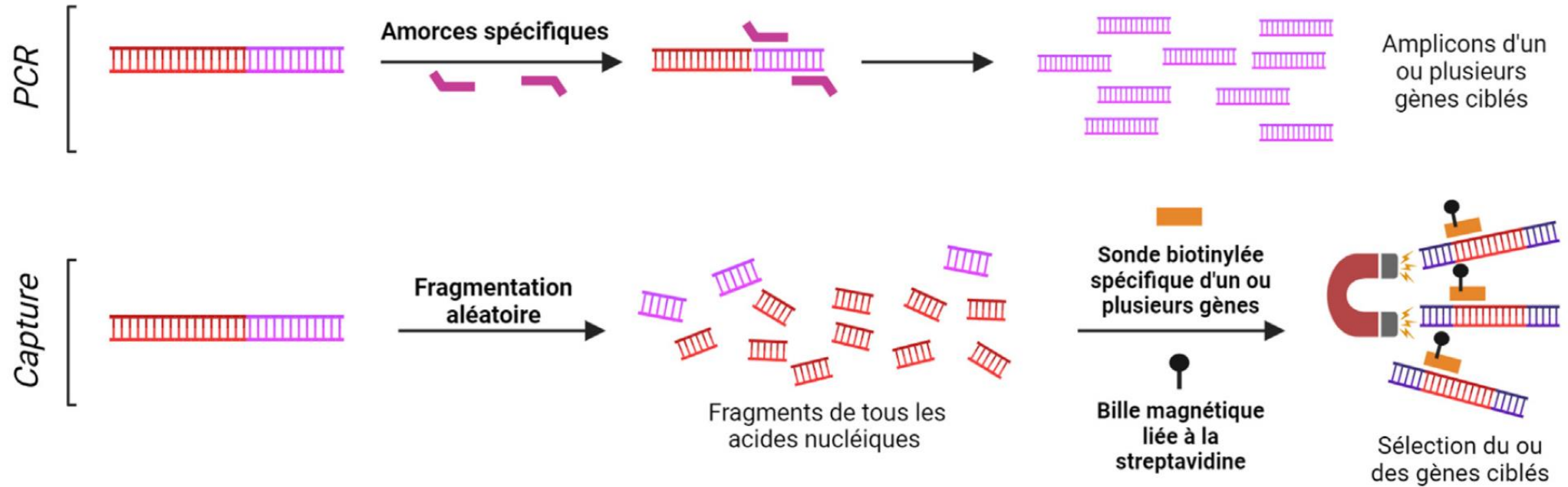
Diagnostic microbiologique

- Pourquoi la métagénomique est prometteuse

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

Méthodes basées sur le NGS : rappels

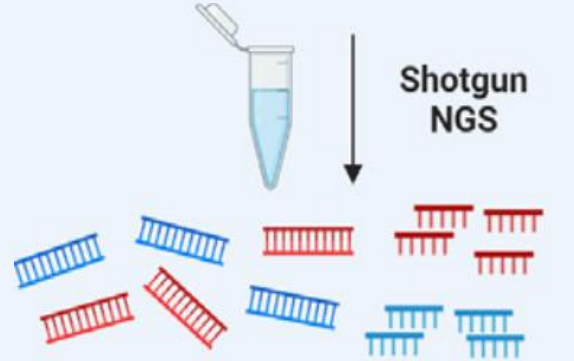
Target NGS



Shotgun NGS



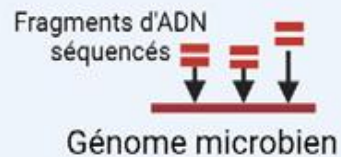
Séquençage sans a priori d'un échantillon clinique



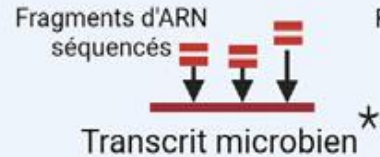
Séquençage des fragments générés aléatoirement



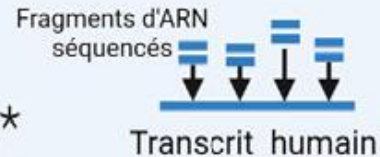
Métagénomique microbienne



Méatranscriptomique microbienne

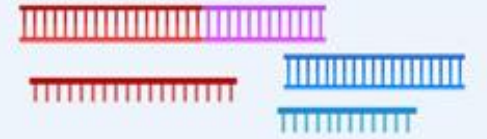


Transcriptomique



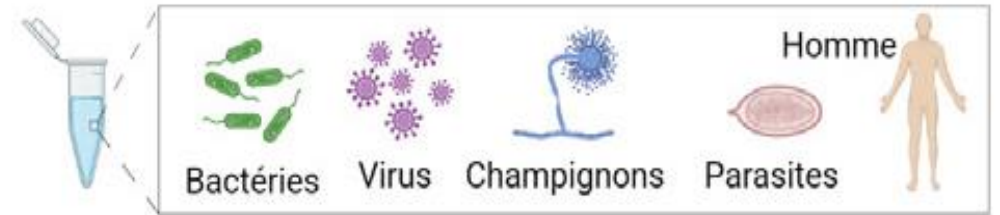
Métagénomique shotgun (SMg)

Tous les génomes de l'échantillon (micro-organismes + humain) sont séquencés



Shotgun NGS

Mélanges de différents génomes



Génomes

ADN

Pathogènes

Humain

ARN

Pathogènes

Humain



Plateforme GenoBioMICS



- **GHU Henri Mondor**
 - 2300 lits (médecine, chirurgie, psychiatrie, rééducation)
 - 115 000 séjours hospitaliers en 2024
- **Plateforme GenobioMICS**
 - 6 TL, 3 ingénieurs, 5 bioinformaticiens, 1 administrateur système
 - Analyses : 1500 échantillons biologiques, 20 000 souches
 - Missions :
 - Diagnostic (accréditation EN ISO 15189 and 17025)
 - LBMR métagénomique « clinique »
 - LBMR séquençage et comparaison d'isolats
 - Recherche clinique et translationnelle

SMg à l'hôpital Henri Mondor



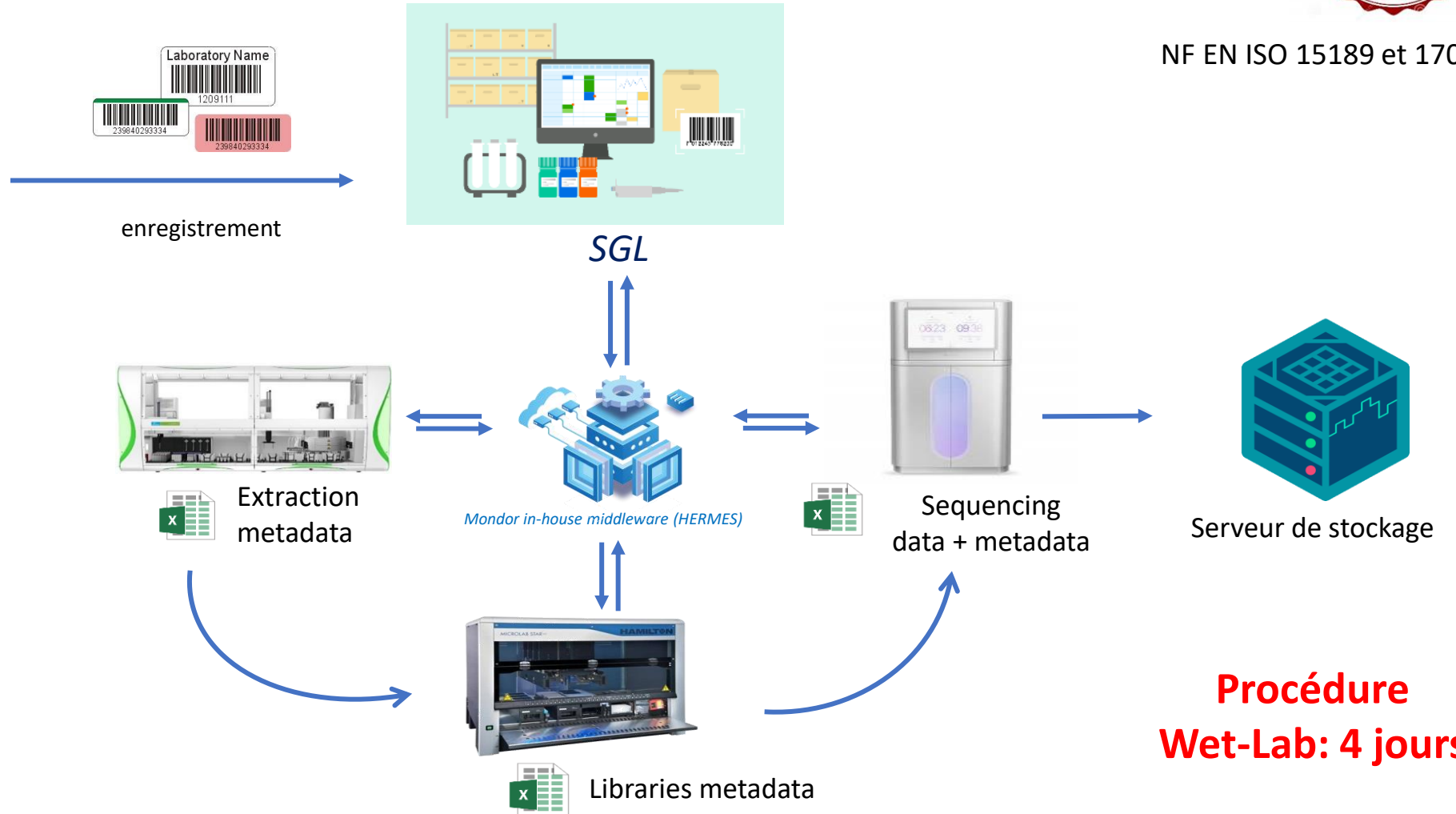
NF EN ISO 15189 et 17025



Contrôle
qualité



Jusqu'à 70 éch./sem.,
de > 20 hôpitaux ou
laboratoires



**Procédure
Wet-Lab: 4 jours**

SMg à l'hôpital Henri Mondor



NF EN ISO 15189 et 17025

HERMES



Serveurs de stockage



Serveurs Dragen



Serveurs de bioanalyse

MetaMIC®

Rapport automatisé

Rapport de
Métagenomique
avec
interprétation



Echantillon : 1201M10030
Logiciel : Metagenk, v2.1.1
Date : 24-07-2019

Nombre de séquences

Librairies	ADN	ARN
Total	18 076 202	12 768 610
Filtres qualité	22 480 564	1 458 594

Séquences soustraites

Humain	12 218 105	7 212 418
Taxons non pathogènes	5 613	29 894

Séquences analysées

Bactéries	507	110 797
Virus	0	417
Champignons	1	974
Parasites	0	1
Autres	34 604	90 004

Résultats

Bactéries

Non retrouvé

Virus

Quantité faible

Nombre nul/bas

Champignons



Interprétation microbiologique



SGL

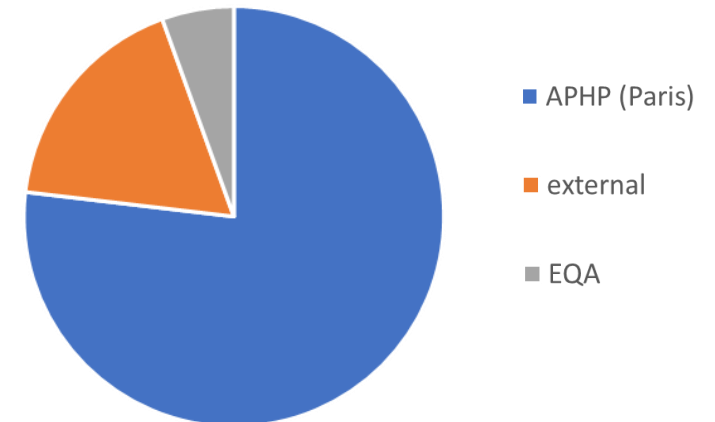
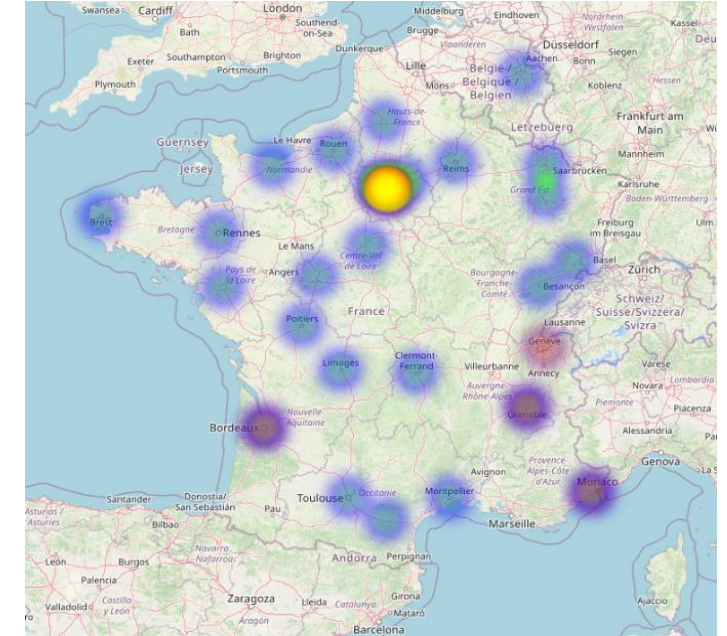
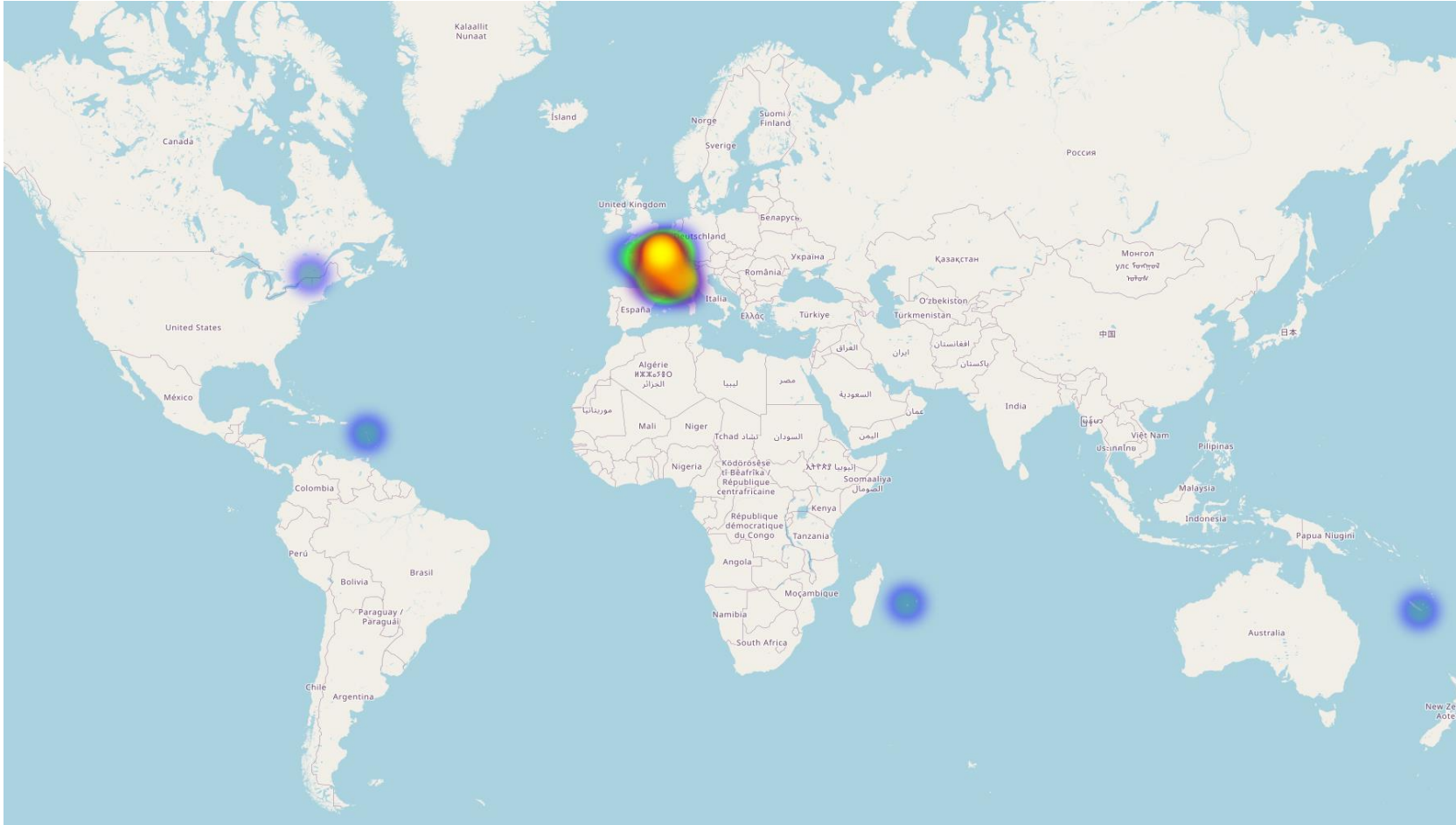
Logiciel médical



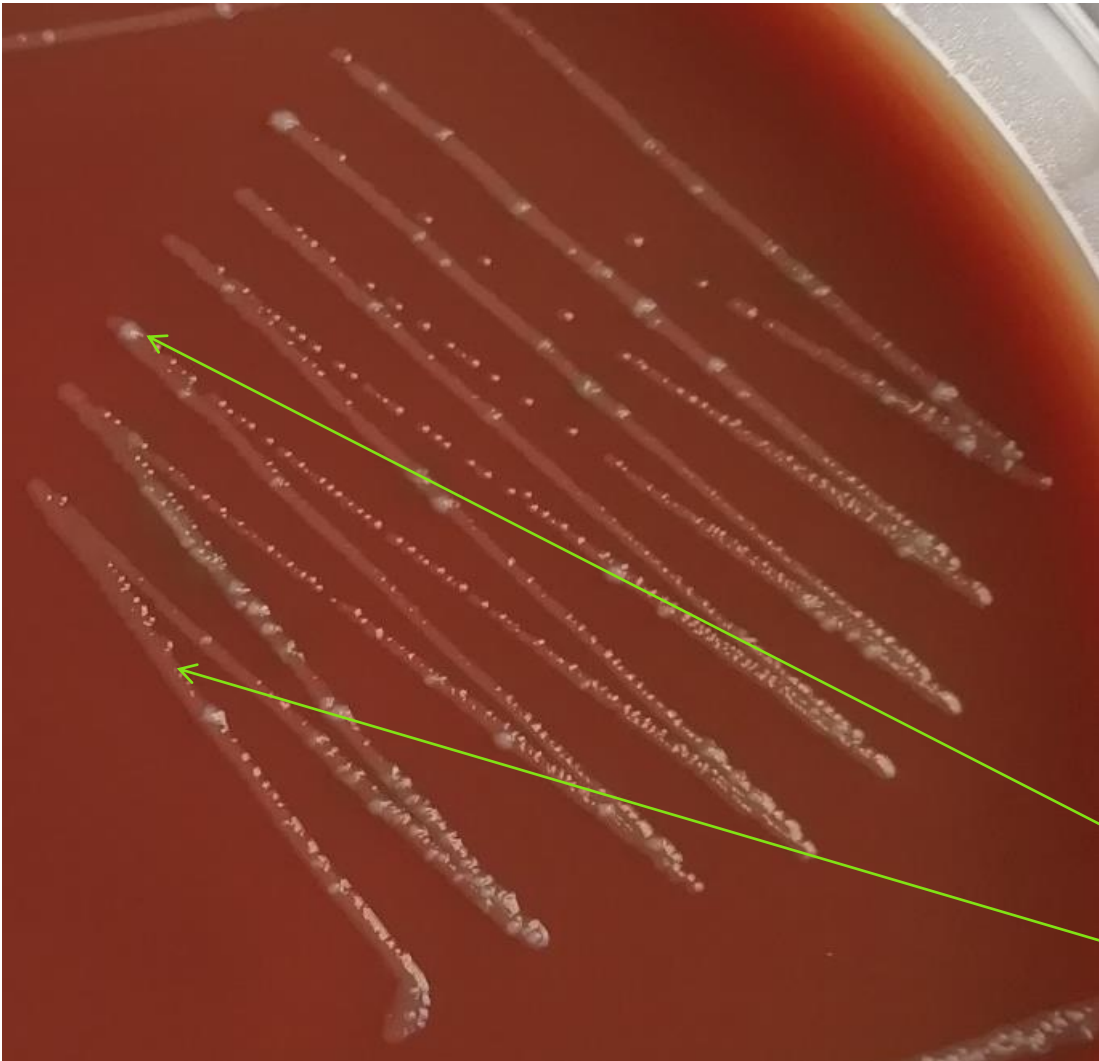
Prescripteur

Procédures Dry-Lab:
30h

SMg à l'hôpital Henri Mondor



SMg à l'hôpital Henri Mondor



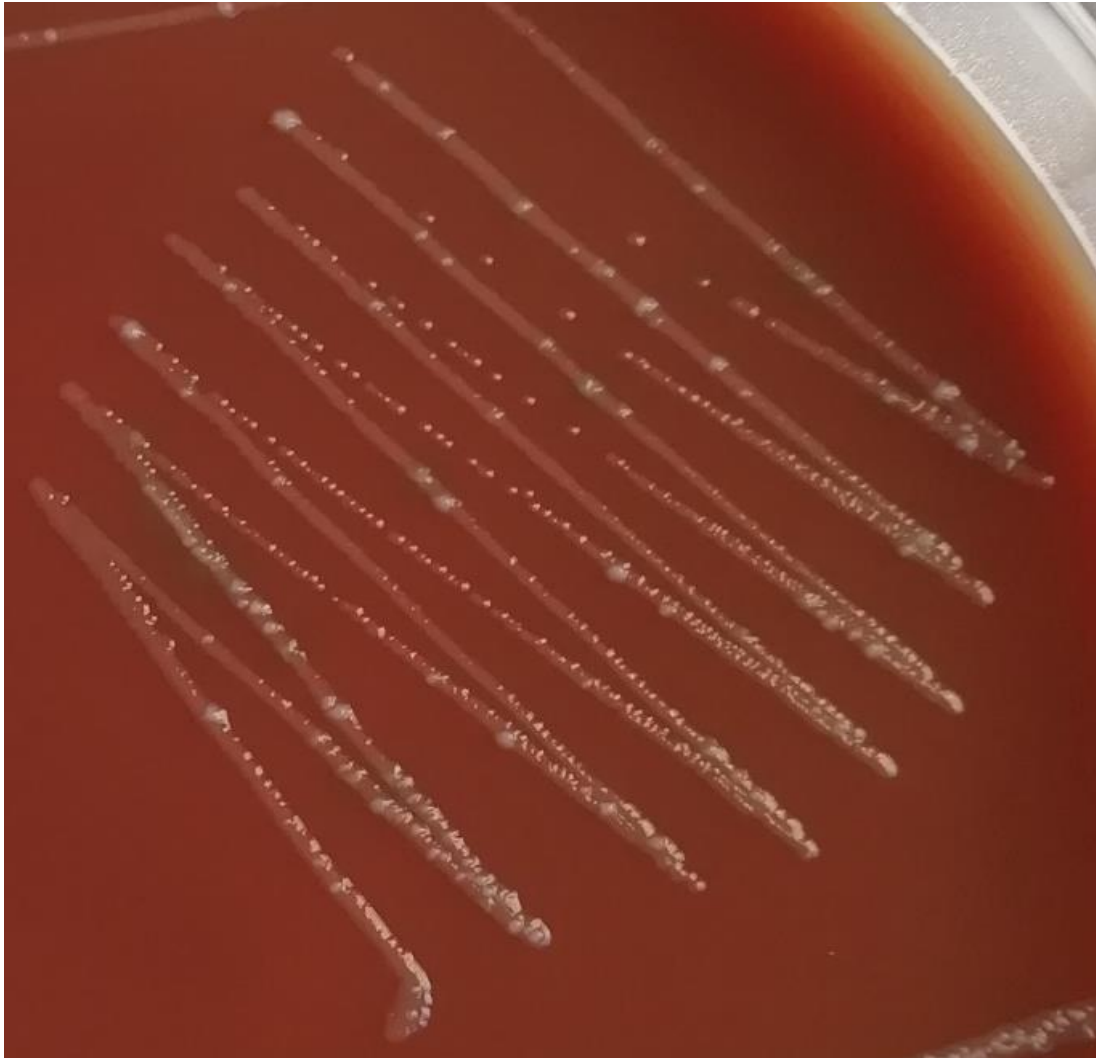
Résultats

Bactéries

Quantité faible

Streptococcus sp. oral taxon 431		0.00000354
Streptococcus sp. A12		0.00000461
Haemophilus sp. oral taxon 036		0.00000481
Veillonella parvula		0.00000493
Neisseria meningitidis		0.00000797
Prevotella melaninogenica		0.00000933
Streptococcus pseudopneumoniae		0.00000975
Quantité intermédiaire		
Neisseria mucosa		0.00001054
Haemophilus parainfluenzae		0.00001373
Neisseria sicca		0.00002096
Streptococcus pneumoniae		0.00002158
Streptococcus mitis		0.00002703
Prevotella jejuni		0.00002841
Staphylococcus aureus		0.00006137
Haemophilus influenzae		0.00261808

SMg à l'hôpital Henri Mondor



Résultats rendu :

Bactéries

Prédominance d'*Haemophilus influenzae* et présence de *S. aureus* au sein d'une flore ORL

Virus

Absence

Champignons

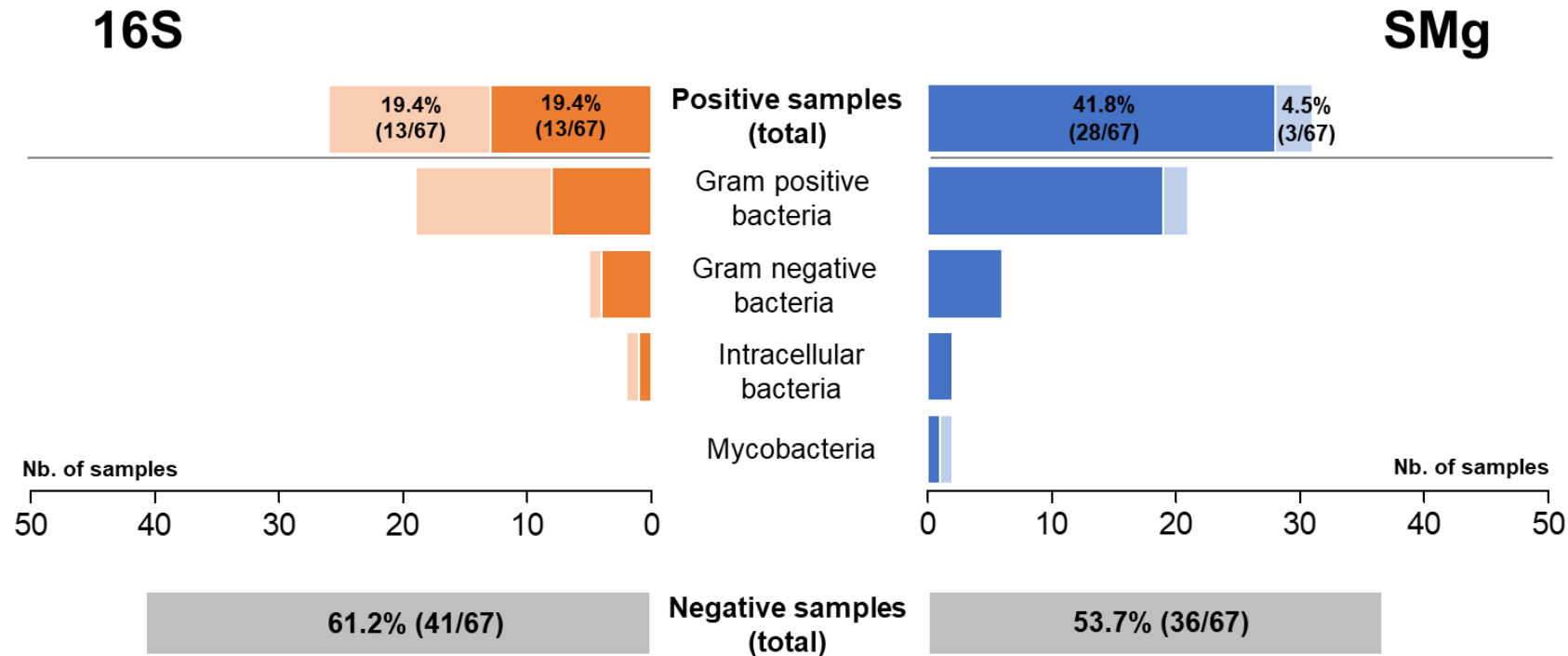
Absence

Parasites

Absence

Sensibilité de la SMg par rapport à la PCR

- Prospective study (n=67)



Bénéfices de la SMg

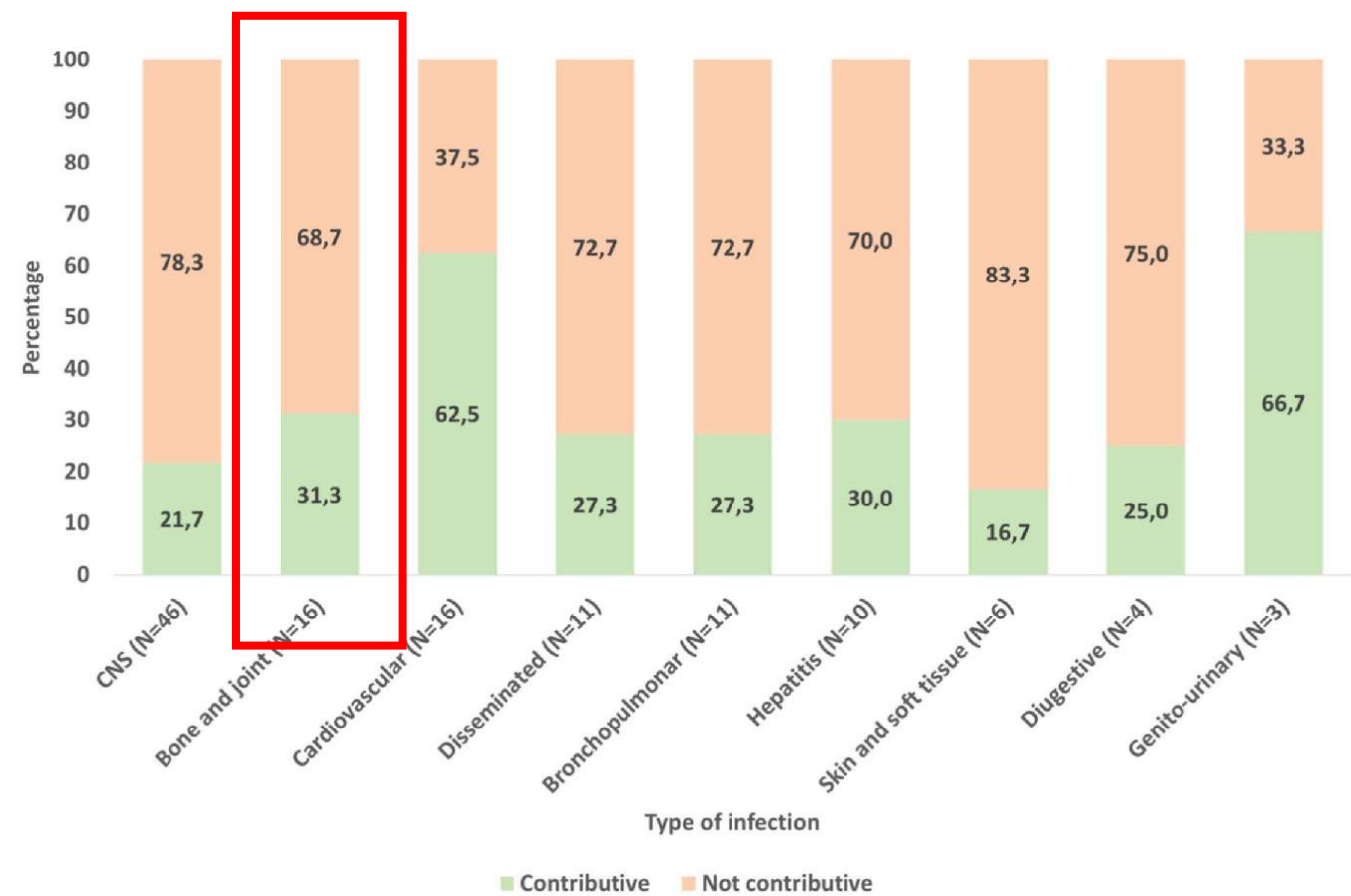
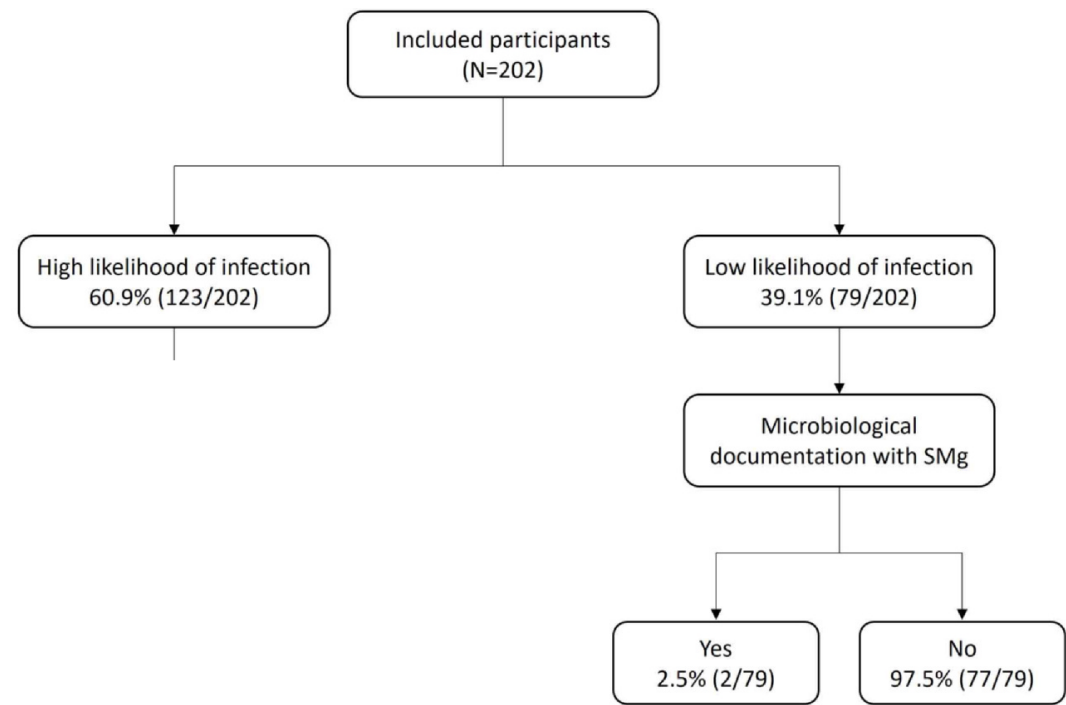
- Infections polymicrobiennes
- Mycobactérie non suspectée
- Spécificité de l'identification

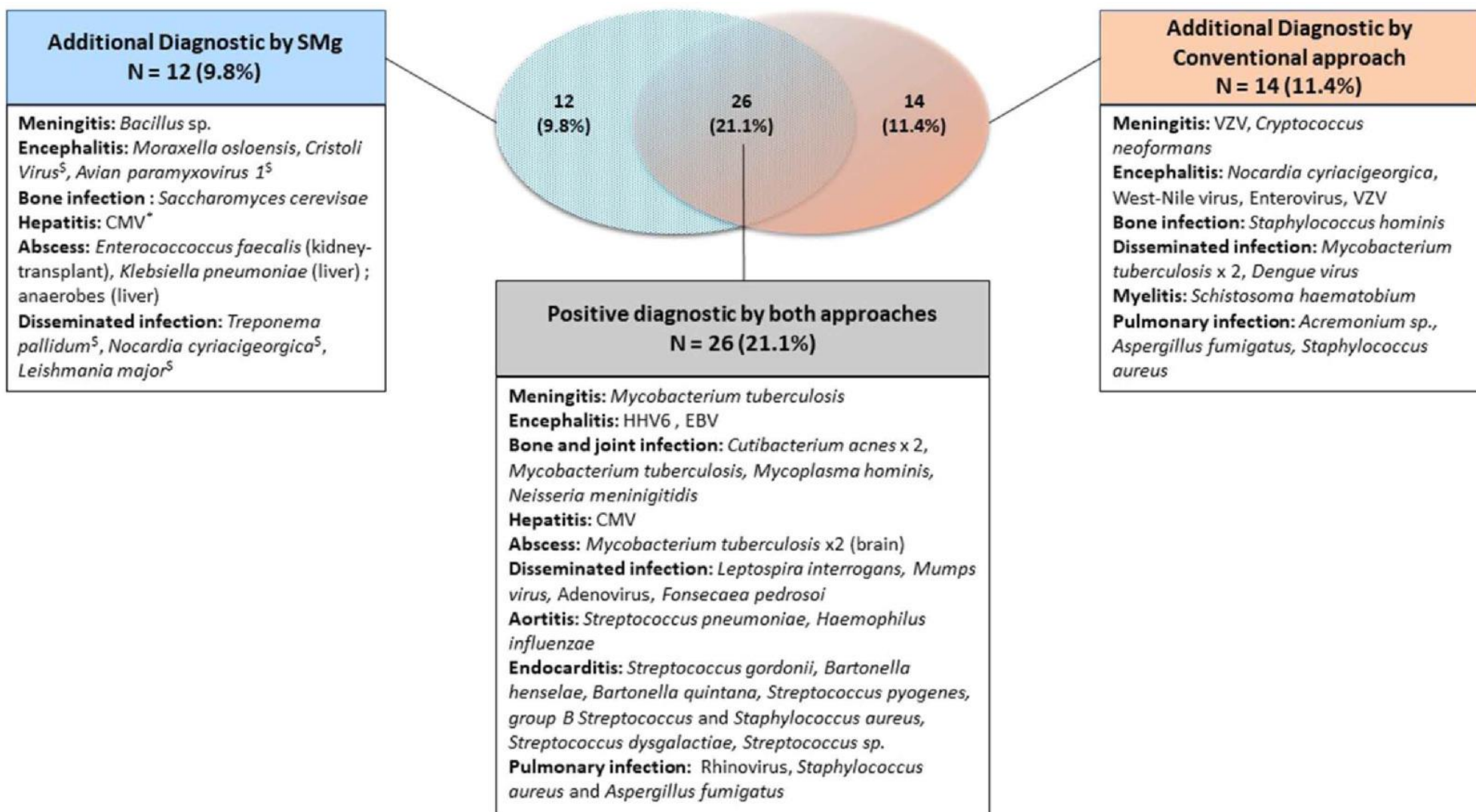
■ Identification at the species level
■ Identification at the genus level

■ Identification at the species level
■ Identification at the genus level

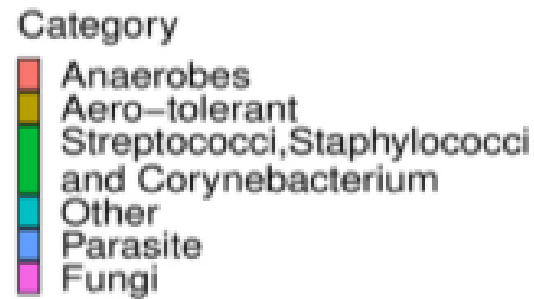
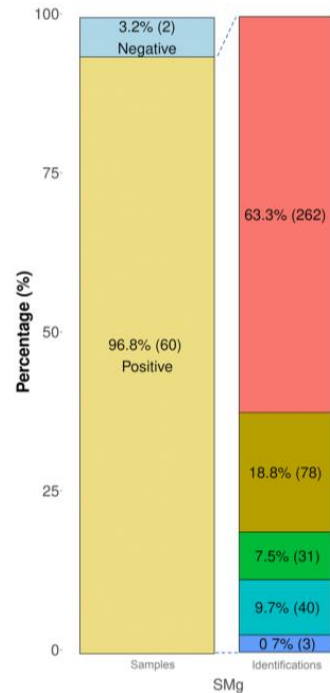
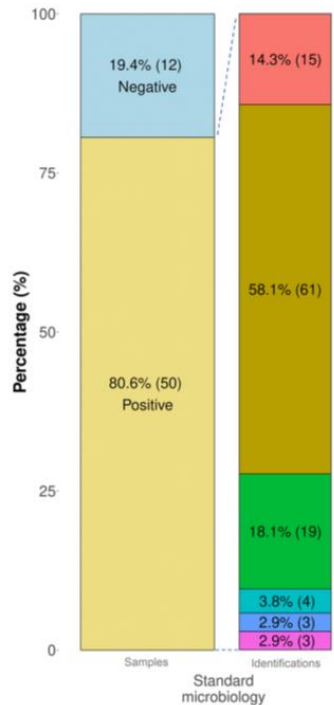
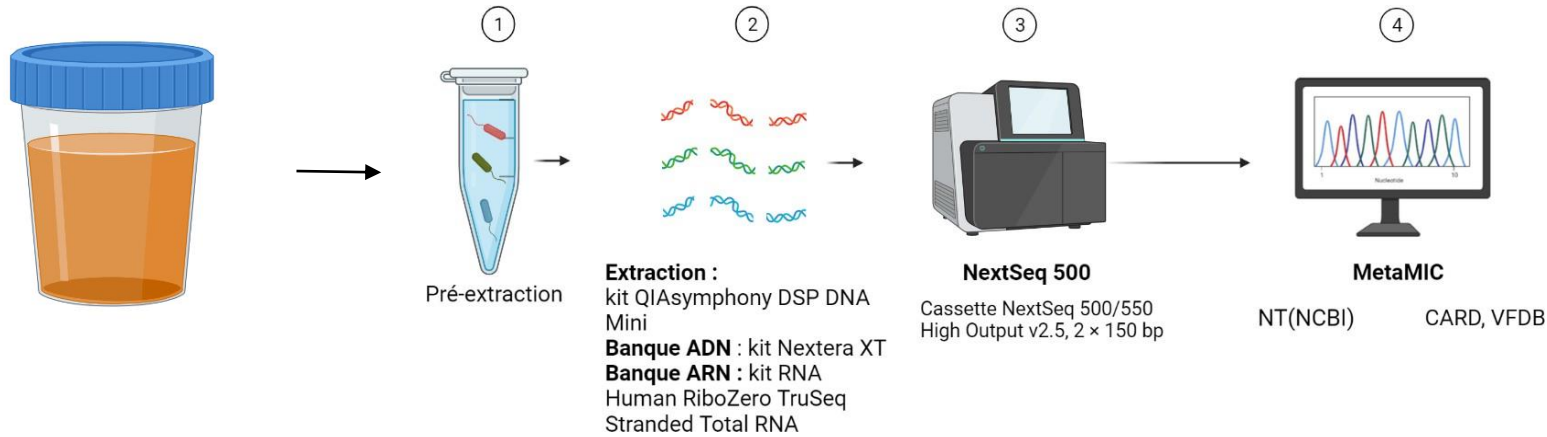
Shotgun metagenomics for the diagnosis of infections: A prospective study

Laure Surgers ^{a,b}, Charlotte Lafont ^{c,d}, Claudie Lamoureux ^e, Vanessa Demontant ^e,
Melissa N'Debi ^e, Justine Cheval ^e, Laure Boizeau ^e, Elisabeth Trawinski ^e,
Jean-Michel Pawlotsky ^{e,f,g}, Paul-Louis Woerther ^{e,f,h}, Christophe Rodriguez ^{e,f,g,*}, Clinical
Metagenomics Study Group [†]



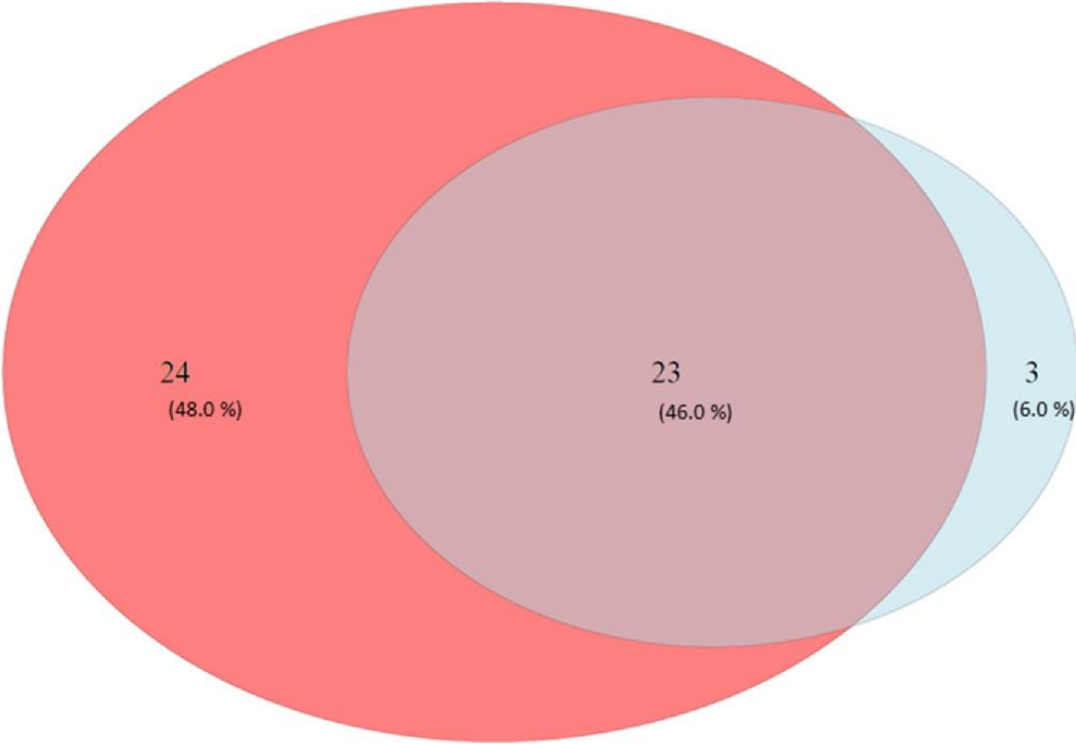


Analyse syndromique : abcès hépatiques



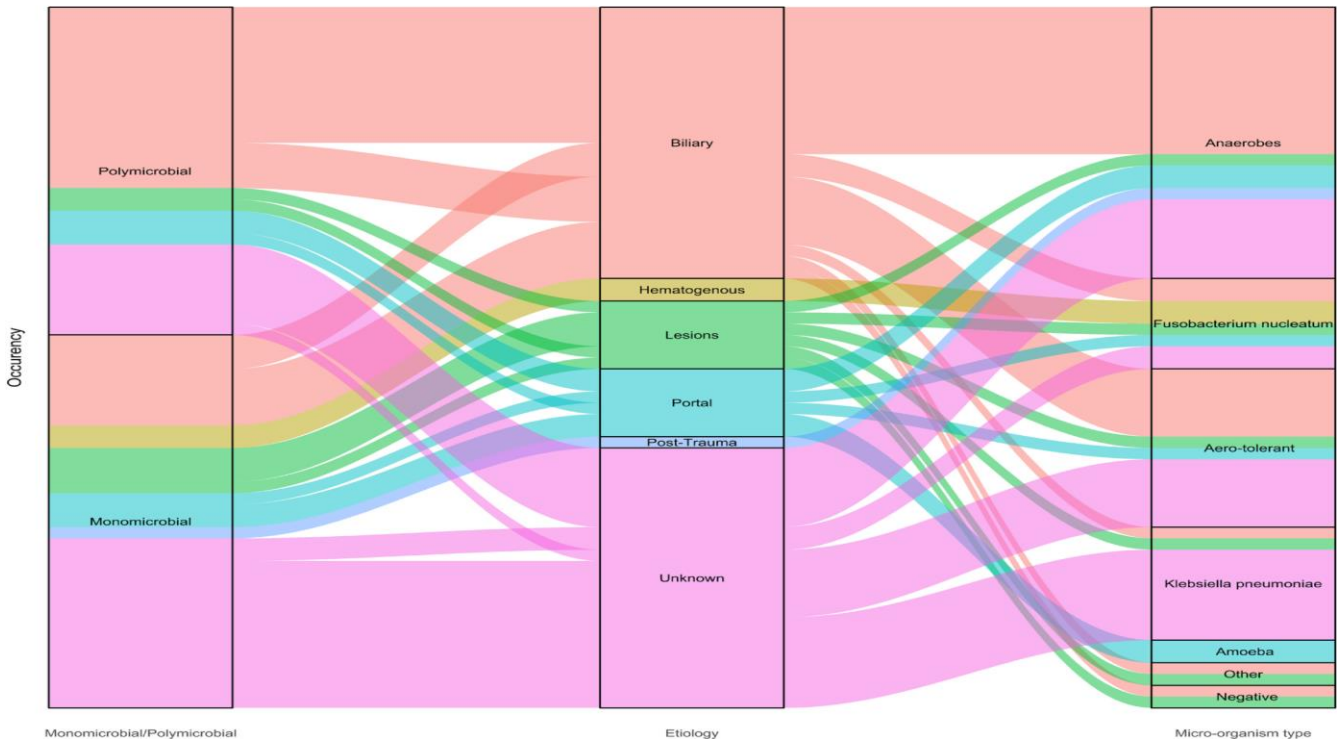
Analyse syndromique : abcès hépatiques

Positive samples description (n=50)

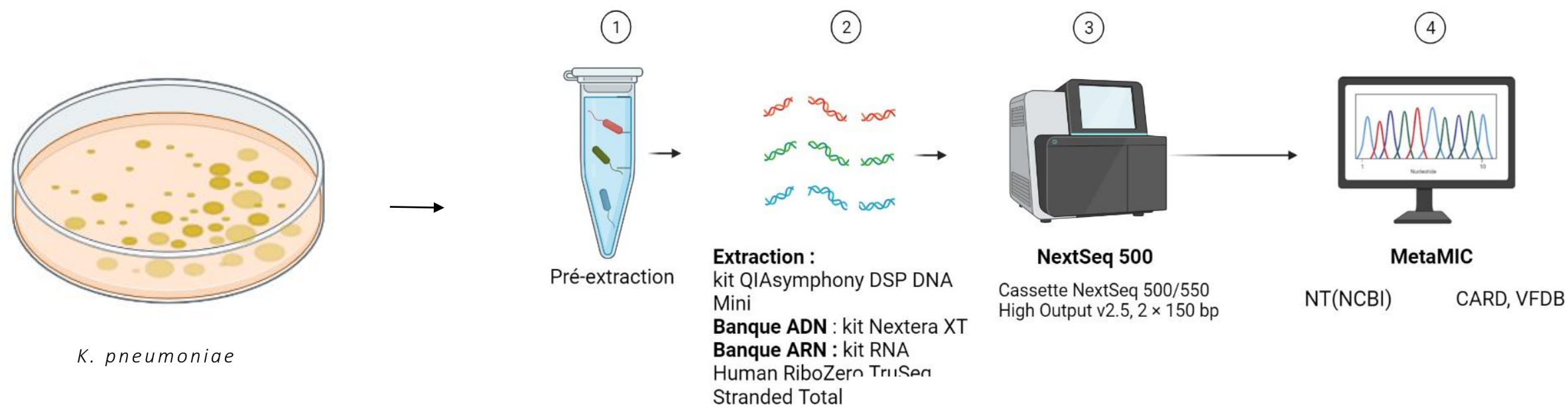


Additional identifications made by :

- SMg
- Standard microbiology
- Identical results



Analyse syndromique : abcès hépatiques



Resistance and virulence genes found by SMg on those found on strains.

Sample n°	Resistance genes	Virulence genes	DNA sequences <i>K. pneumoniae</i>	RNA sequences <i>K. pneumoniae</i>
02-027	0% (0/9)	0% (0/15)	5 109	3 570
01-002	0% (0/9)	0% (0/15)	5 339	4 259
01-033	22.2% (2/9)	6.7% (1/15)	4 080	4 942
02-033	22.2% (2/9)	0% (0/15)	4 095	18 769
01-008	33.3% (3/9)	33.3% (5/15)	19 111	19 069
02-035	66.7% (6/9)	40.0% (6/15)	105 891	19 688
02-013	28.6% (2/7)	40.0% (6/15)	2 641	20 599
01-021	66.7% (6/9)	80.0% (12/15)	50 931	61 412

Identification de pathogènes émergents : *Borrelia myamotoi*

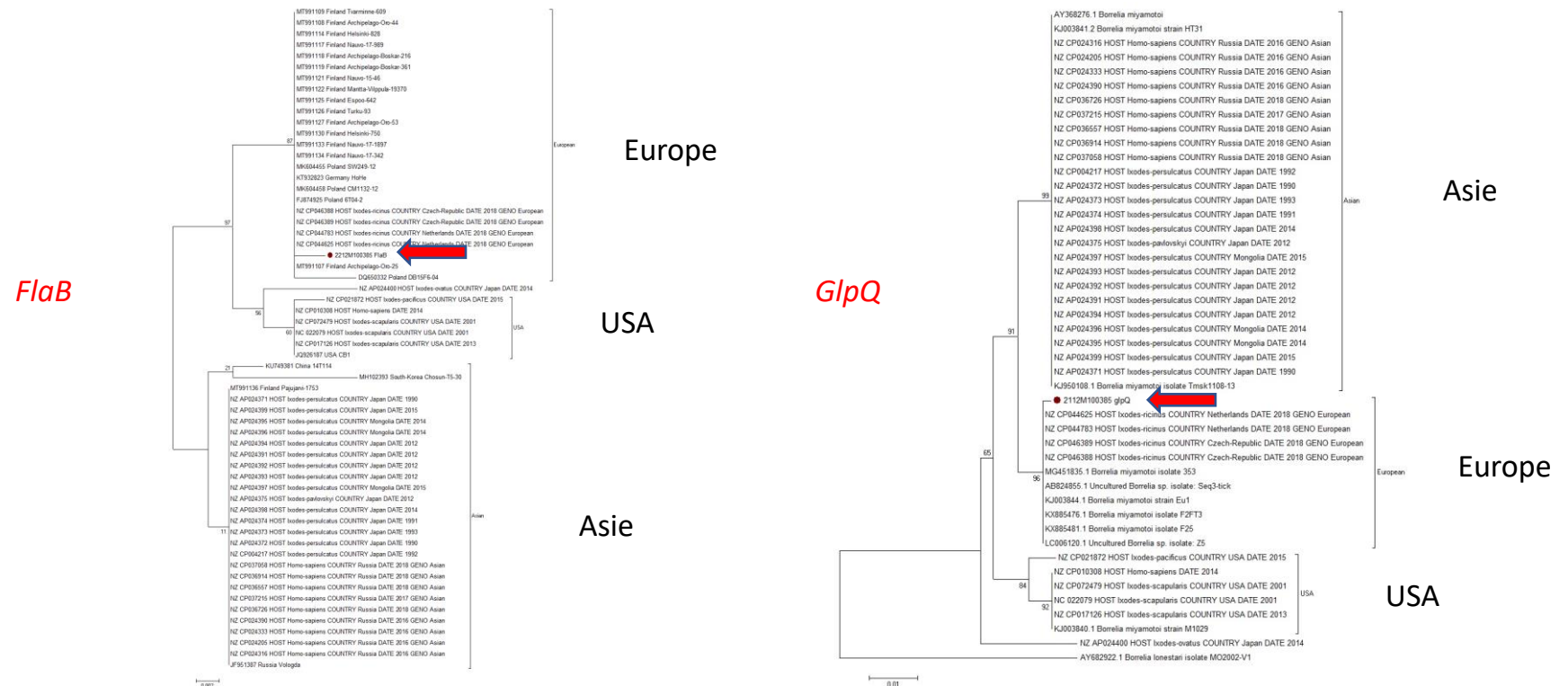
- 2017 : Patient de 72 ans, originaire et vit dans l'Essonne, promenades en forêt, pas de voyage à l'étranges (Allemagne il y a 12 ans). ATCD de HTA, Dyslipidémie, Hypertrophie bénigne de la prostate. Traitement corticoïdes, endoxan, relais Imurel
- Errance diagnostique depuis 5 ans face à un tableau associant douleurs inflammatoires des articulations prédominant aux ceintures et céphalées, évolution vers méningite chronique avec déficit neurologique. Diagnostics évoqués :
 - polyangéite à ANCA négatif/vascularite
 - granulomatose
 - PPR
 - syndrome dépressif/catatonique
 - méningite aseptique iatrogène
 - ...
- **En 2022**
 - Nette aggravation sur le plan neurologique après arrêt progressif des corticoïdes, avec syndrome frontal très marqué et patient stuporeux avant la biopsie neurochirurgicale.
 - EEG normal.
 - Amélioration progressive sur le plan clinique après introduction des corticoïdes.
 - Episodes fébriles occasionnels dans le service (pics fébriles entre 38-39°C)

PL envoyé pour SMg à Mondor : *Borrelia miyamotoi*

Envoi du sang et du LCR au CNR des borrélioses (B. Jaulhac)

- 2 PCR ciblant des fragments spécifiques de B miyamotoi sur 2 gènes différents (16S et glpQ) **positives**
- PCR Borrelia-Lyme est **négative**.
- LCR mis en culture : une souche de **spirochètes** qui a poussé au bout d'une semaine.
- Sur souche : PCR fièvres récurrentes est **positive**. Séquençage en cours.
- 1^{ère} souche isolée d'un prélèvement humain en France et la 3^è isolée de neuroborréliose en Europe.

Analyses dérivées de la métagénomique : reconstitution du génom complet et phylogénie

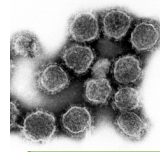


Identification de pathogènes émergents : autres exemples

NEW

Cristoli virus

Rodriguez et al, EID 2020



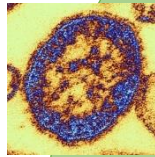
New Castle Disease Virus
Winter et al, Acta neuro 2021



NEW

Circovirus parisii

Rodriguez et al, EID 2023

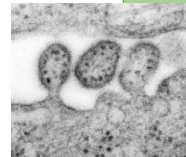


Virus

NEW

Lasli 2024

Baize et al; NEJM 2025

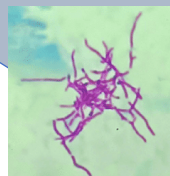


Bacteria

Borrelia miyamotoi
In redaction



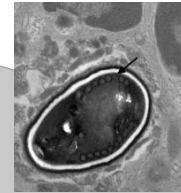
Nocardia cyriacigeorgica
Courbin et al; Front Microbiol 2022



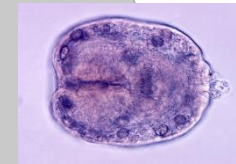
Parasites

Anncaliia algerae

Brincus et al, submitted



Echinococcus granulosus
Angebault et al, writing in progress



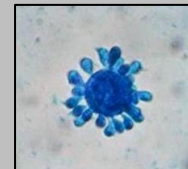
Fungi

Basidiobolus meristosporus

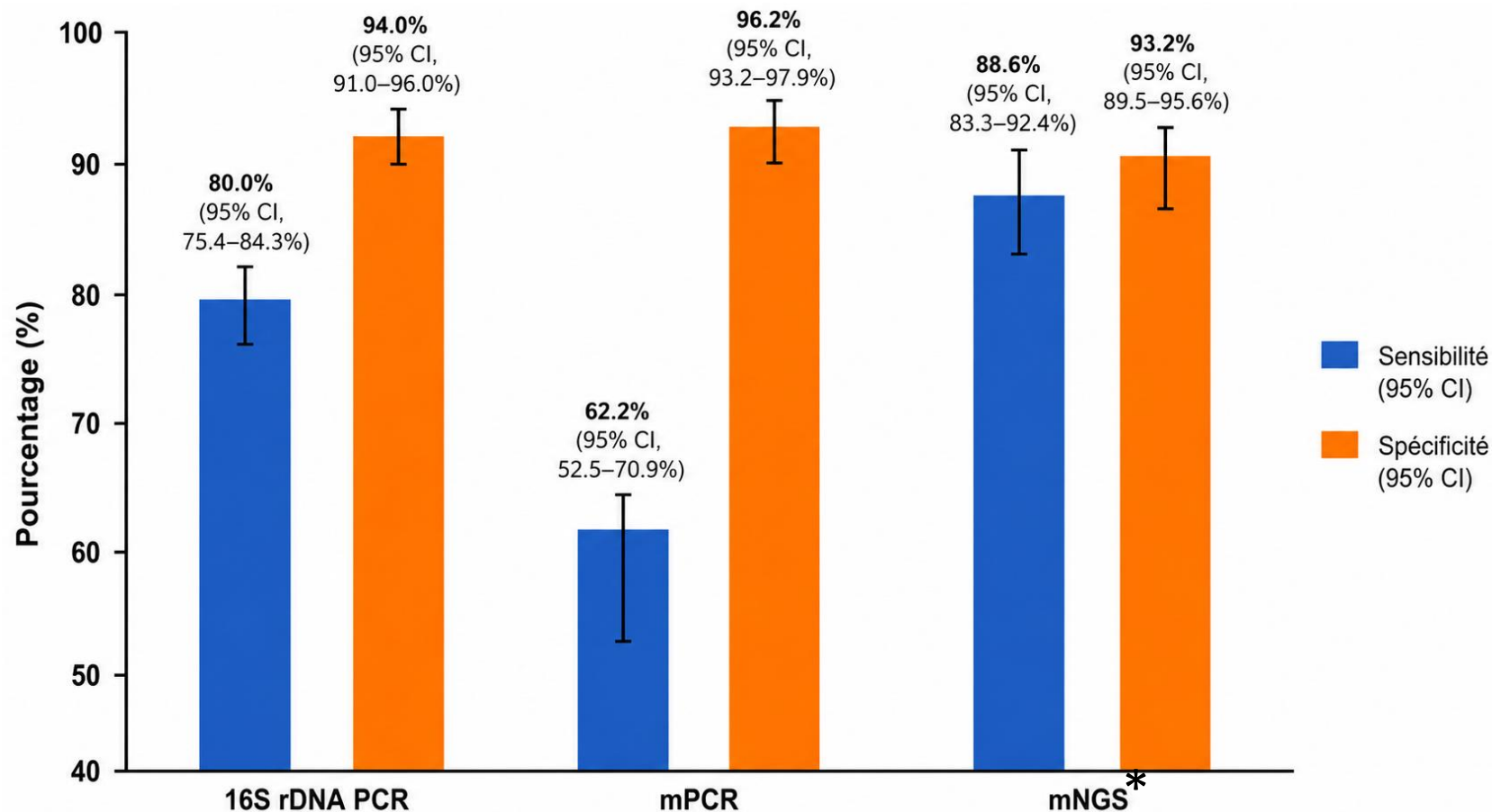
Sitterlé et al, Front microbiol 2018



Paracoccidioides brasiliensis
Monpierre et al, Journal of Travel
Medicine 2024



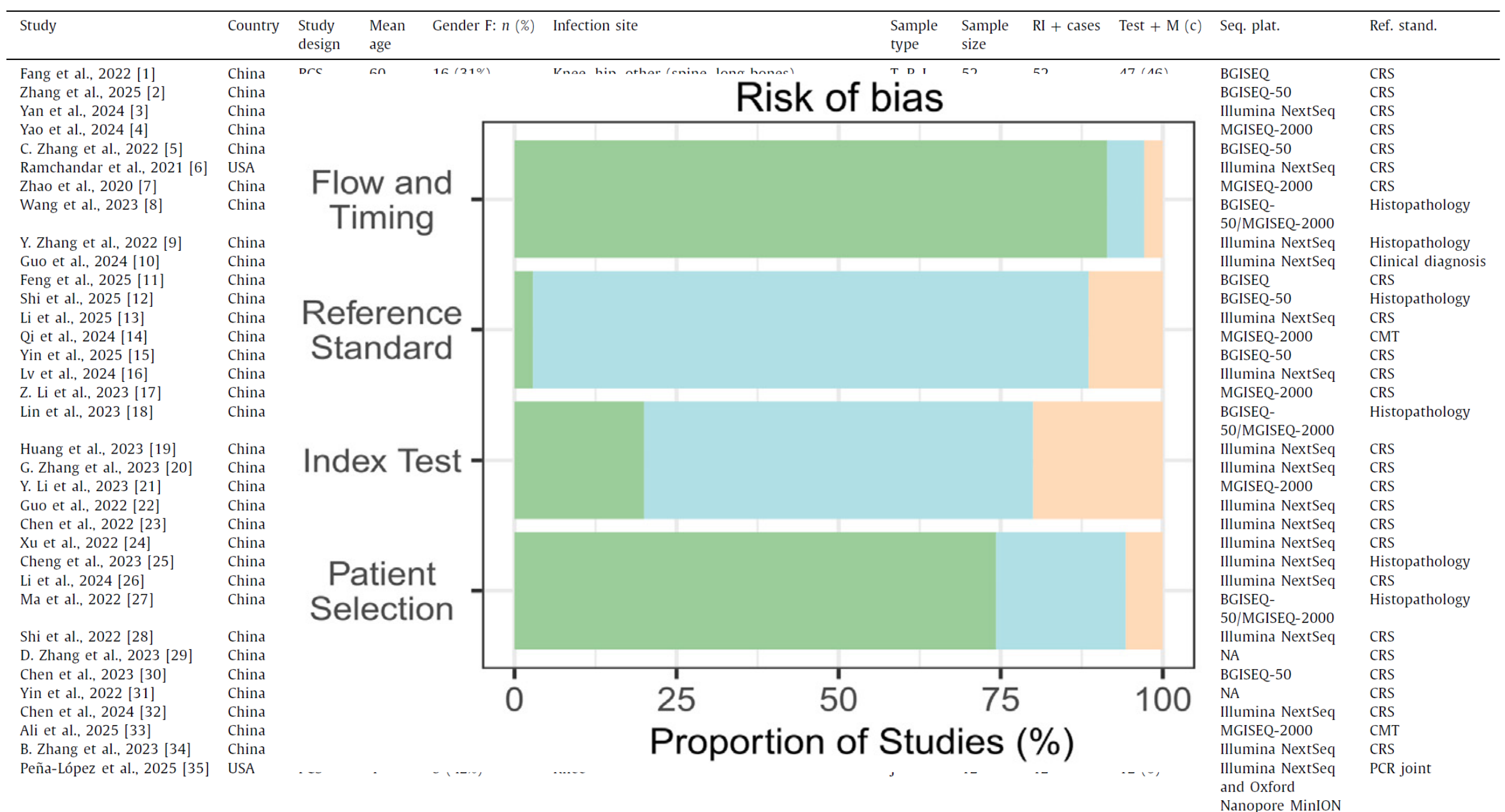
Performances des différentes approches



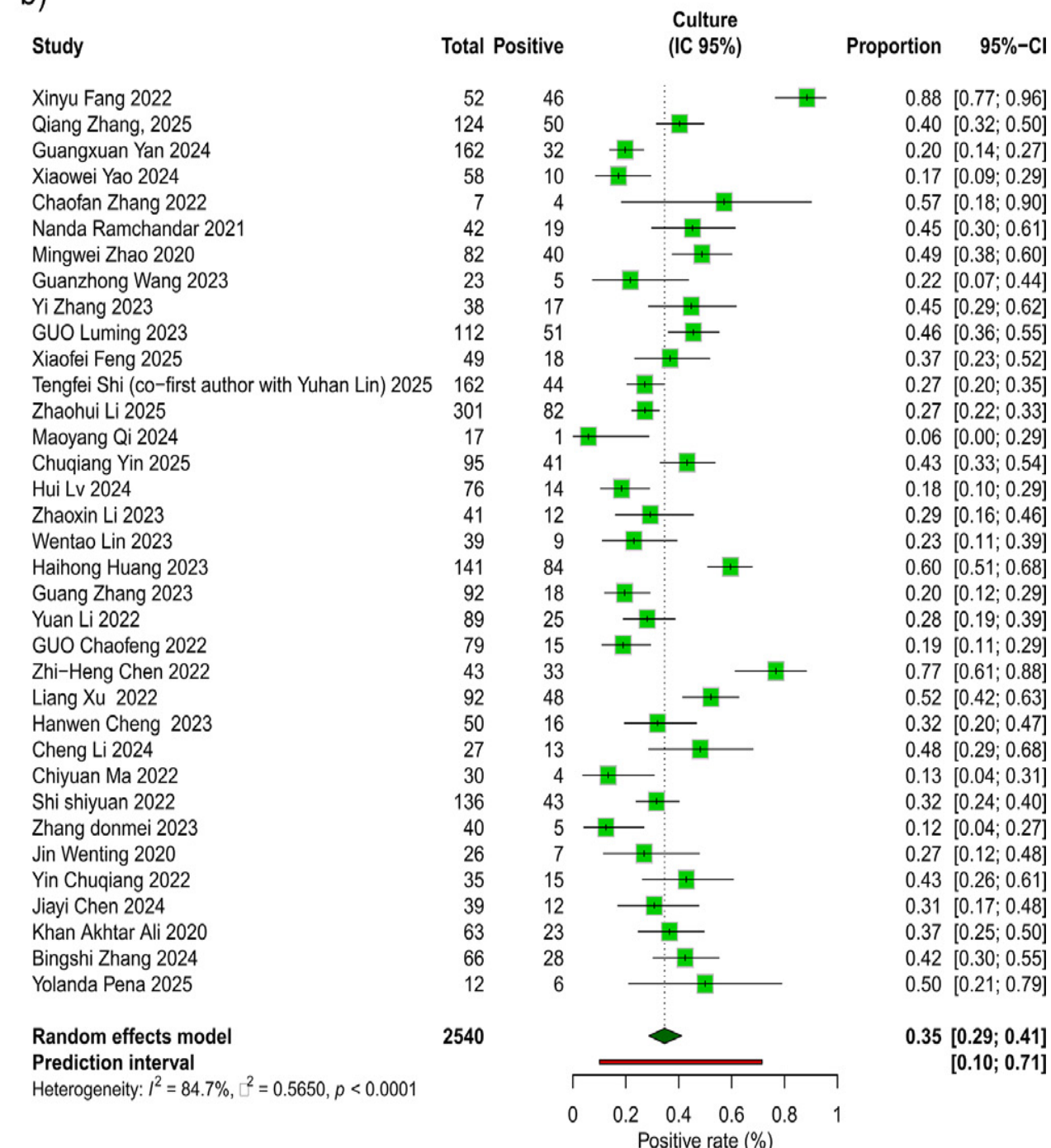
Méta-analyse 2000-2024
79 études
3940 PJI / 4700 contrôles
(selon reco sociétés savants)

*mNGS : inclus shogun
et targeted NGS

d'après Olearo, CMI, 2025



Culture Detection Method



Conclusion

Meilleur rendement diagnostique que la culture conventionnelle, avec une **sensibilité supérieure** dans l'ensemble des sites et types de prélèvements étudiés.

Atouts majeurs : détection de **microorganismes difficiles/lents** à cultiver et maintien des performances après **antibiothérapie** préalable.

Valeur ajoutée potentielle : identification plus rapide du pathogène → **antibiothérapie ciblée**

Intérêt particulier en pédiatrie :

Limite majeure : très forte sensibilité → détection de contaminants/commensaux et risque de faux positifs → **spécificité moindre**.

Interprétation indispensable dans le contexte clinique : imagerie, biologie, épidémiologie, antibiothérapie préalable et microbiologie conventionnelle.

Freins à l'utilisation en routine : **coût**, **infrastructure** spécialisée, **expertise bioinformatique** et **absence de standardisation** des protocoles.

Perspectives : le séquençage du **cfDNA microbien plasmatique** pourrait limiter le recours aux prélèvements invasifs, place de la transcriptomique?

Stratégies d'optimisation du diagnostic des IOA

