

Diagnostic microbiologique des Infections Ostéo-Articulaires : gestion des prélèvements et techniques

Pr Frédéric LAURENT

Dr Céline DUPIEUX-CHABERT

Laboratoire de Bactériologie – Institut des Agents Infectieux - Hôpital de la Croix Rouse

Centre de Référence des Infections Ostéo-Articulaires Complexes Rhône-Alpes

CNR des Staphylocoques

Centre International de Recherche en Infectiologie – Equipe "Pathogénie des Staphylocoques"

Diagnostic bactériologique des IOA

- **Indispensable** pour
 - affirmer l'infection
 - traiter correctement ces infections : adaptation de l'ATBthérapie sur l'ATBgramme
- Avant antibiothérapie ou après arrêt prolongé (variable en fonction des ATB)
- Prélèvements **multiples** +++
- Souvent difficile
 - isolement souvent laborieux des bactéries
 - infections polymicrobiennes
 - plusieurs antibiogrammes
 - interprétation parfois délicate
- Résultats dépendent
 - qualité des prélèvements
 - rapidité du transport
 - techniques utilisées au laboratoire



Points critiques pour le laboratoire

Objectif : cultiver et identifier les bactéries responsables

- Gestion des prélèvements → avant, pendant, après
- Conditions / Délais de cultures
- Détection et identification de variants ou de souches différentes
- Interprétation, rendu clair et cohérent de résultats qui puissent aider à la décision thérapeutique

Erreur majeure : ne pas se donner le maximum de chance de limiter les contaminations



Epidemiologie des IOA chez l'adulte

Staphylococcus aureus

Coagulase-negative staphylococci

Enterococcus species

Streptococcus species

Enterobacteriaceae

Coryneform bacteria^a

Propionibacterium species

Peptostreptococcus species



Colonisation cutanée

+ IOA sur prothèse = souvent inoculum faible

Difficultés rencontrées par le bactériologiste avec les IOA

- Bactéries IOA = +/- bactéries de la flore cutanée
- Infections plurimicrobiennes
- Bactéries fragiles pour certaines
- Bactéries physiologiquement peu actives
- Antibiothérapie préalable au prélèvement
- Bactéries cachées
 - intracellulaires
 - biofilm
- Bactéries normale (IOA aigüe)
vs bactéries stressées (IOA chronique)

Contamination
ou pas ?

Gestion des prélèvements +++

Cultures longues
Milieux riches
Multiplicité des milieux

Traitement adéquat des prélèvements

Expression phénotypique variée

Gestion des prélèvements

■ Eviter toute contamination

Bactéries IOA = +/- bactéries de la flore cutanée

• Nature du prélèvement

- Fistule, biopsies tissulaires, pus, tissus per-op, liquide articulaire, synoviale, ... +++
- Matériel : prothèse, vis, plaques, fiches, ... ça dépend comment cela est manipulé
- Hémocultures : insister sur l'asepsie car problème récurrent des contaminations à SCN

• Post-prélèvement

- Contenants de transport
- Manipulations au laboratoire

Gestion des prélèvements

■ Eviter toute contamination

Bactéries IOA = +/- bactéries de la flore cutanée

• Nature du prélèvement

- Fistule, biopsies tissulaires, pus, tissus per-op, liquide articulaire, synoviale, ... +++
- Matériel : prothèse, vis, plaques, fiches, ... ça dépend comment cela est manipulé
- Hémocultures : insister sur l'asepsie car problème récurrent des contaminations à SCN

• Post-prélèvement

- Contenants de transport
- Manipulations au laboratoire

■ Ensemencer dans les meilleurs délais

- Transport / Ensemencement au bloc ?
- Gestion au sein du laboratoire

Transport

- Etape pré-analytique capitale
- **Transport rapide (<4 heures)**
 - mais : - finalement peu de bactéries fragiles sauf arthrite pure
 - pas de données de viabilité bactérienne sur prélèvement dans la littérature
- **Température ambiante**
- **Liquide : ensemencement au bloc en flacons d'hémocultures ++**
 - mais ne remplace pas l'envoi du liquide en parallèle!
- Prévenir si arrivée tardive au laboratoire ! Pour s'organiser ...
- Traçabilité : tout retard d'acheminement doit être mentionné par le laboratoire sur le CR (obligation dans le cadre de l'accréditation)
 - « Prélèvement reçu et traité au laboratoire dans un délai supérieur aux recommandations. Résultat rendu sous réserve »**
- Ensemencer dans les meilleurs délais : **Si impossible ensemencer au moins le liquide articulaire**

Culture microbiologique

- Prélèvements ostéo-articulaires
 - prélèvements précieux avec conséquences cliniques thérapeutiques voire médico-légales
 - non renouvelables
 - impératif = éviter la contamination

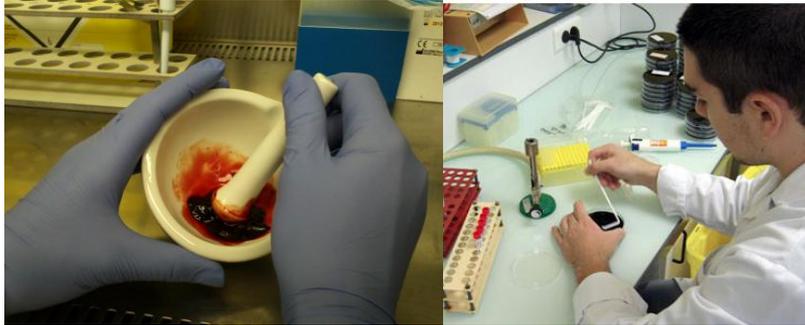
Erreur majeure : ne pas se donner le maximum de chance de limiter les contaminations

- Pendant le prélèvement



Informer/former

- Pendant l'ensemencement



Broyeur mécanique



Tube Ultra-Turrax

- Pendant la lecture



Manipulation sous PSM



Culture microbiologique

- Prélèvements ostéo-articulaires
 - prélèvements précieux avec conséquences cliniques thérapeutiques voire médico-légales
 - non renouvelables
 - impératif = éviter la contamination
- Manipulés sous hotte à flux laminaire type PSM 2
 - par un technicien portant (une casaque à usage unique et) des gants stériles
 - matériel stérile

La lecture des cultures doit aussi se faire dans les mêmes conditions.

Préparation des prélèvements au laboratoire

- Prélèvements liquides : homogénéiser
- Prélèvements solides (fragments d'os ou de tissus)
 - impérativement **broyés** dans un mortier stérile
 - ou
 - par toute autre méthode de broyage

Erreur majeure : ne pas se donner le maximum de chance de limiter les contaminations



Erreur majeure : ne pas se donner le maximum de chance de limiter les contaminations



Préparation des prélèvements au laboratoire

- Prélèvements liquides : homogénéiser

 - Prélèvements solides (fragments d'os ou de tissus)
 - impérativement **broyés** dans un mortier stérile
ou
 - par toute autre méthode de broyage
 - ex : poudrier à billes Ultra-Turrax™ (prêt à l'emploi, usage unique)
 - transport, broyage et conservation des prélèvements
 - limite les manipulations donc les risques de contaminations
 - libération des bactéries de matrice osseuse/biofilm
- + privilégier comme diluant de l'**eau de « qualité biologie moléculaire »**
plutôt que des bouillons de culture pour ne pas hypothéquer une éventuelle analyse par biologie moléculaire (notamment par PCR universelle) du prélèvement

Préparation des prélèvements au laboratoire

- Pour les très petites biopsies :
éviter les poudriers à billes
utiliser un poudrier stérile classique

- Système de « broyage » au laboratoire :



Conservation des prélèvements

- A température ambiante avant arrivée au laboratoire
- A température ambiante / au frigo (?) si prise en charge au laboratoire impossible immédiatement
- Après ensemencement, congélation (à -80° C ou à défaut à -20° C) des surplus de prélèvements jusqu'au rendu définitif pour
 - des colorations spécifiques
 - d'éventuelles recherches complémentaires : mycobactéries, champignons,...
 - des techniques moléculaires

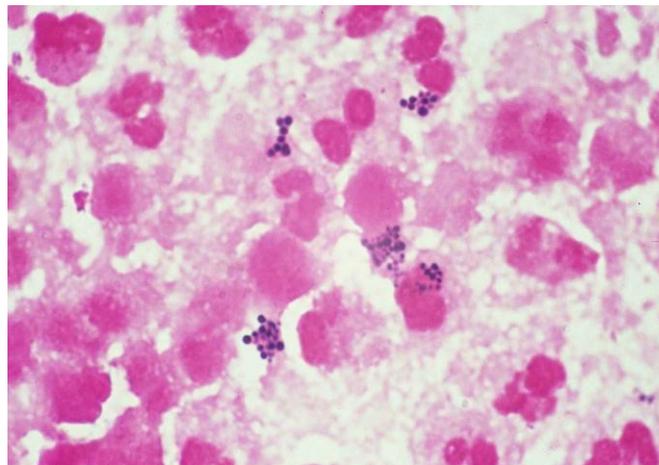
Examen direct

Permettre éventuellement une orientation diagnostique rapide

Présence d'une réaction cellulaire? Présence de bactéries ?

Doit comporter :

- Coloration de Gram : bactéries / morphologie
 - sensibilité faible (6 %)
 - spécificité élevée (99 %)
- Coloration adaptée pour l'appréciation semi-quantitative des leucocytes et de la formule leucocytaire



Analyse cytologique du liquide articulaire

- Prélèvement recueilli avec citrate ou héparine
- Quantification des leucocytes
- Formule leucocytaire
- Recherche de microcristaux (pour faire le diagnostic différentiel de chondrocalcinose et de goutte articulaire aiguë) : sur liquide frais

Analyse cytologique du liquide articulaire

En l'absence de prothèse

< 1 000 GB/mm ³	5 000 - 60 000 GB/mm ³			100 000 GB/mm ³
< 20% PNN	50% PNN	60-80% PNN		> 90%PNN
Arthrose	P R	Cristaux	Réactionnelle	Cristaux
Trauma	Lupus		Chlamydia, Yersinia, Salmonella, Shigella, Campylo, Neisseria, Lyme → PCR	Infection
Algodystrophie	Psoriasis			
Mécanique		Inflammatoire +/- septique		
				Septique

Mathews *et al.* Ann Rheum Dis 2007

En présence d'une prothèse

	Sensibilité	Spécificité
GB > 1700 / mm³	94%	88%
PNN > 65%	97%	98%

Trampuz *et al.* Am J Med 2004

Mise en culture

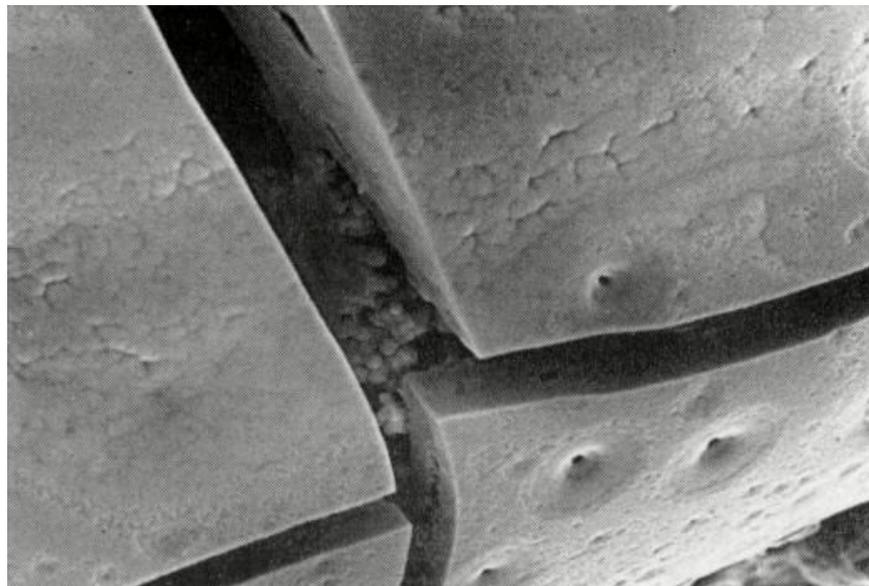
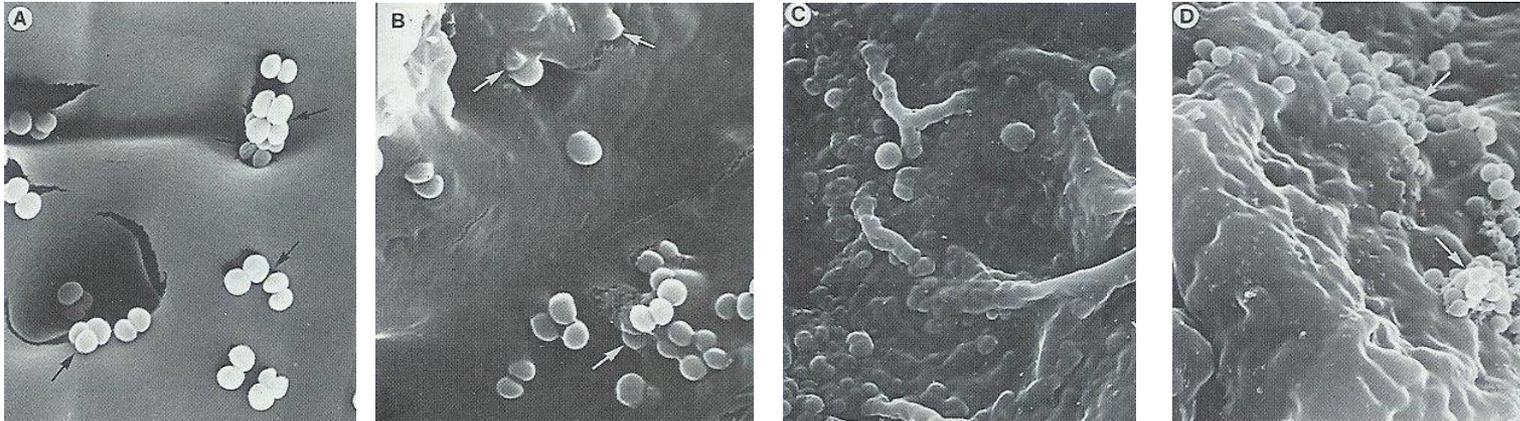
Présence de bactéries ? Lesquelles ? Quels sont les antibiotiques actifs ?

Mise en culture

Présence de bactéries ? Lesquelles ? Quels sont les antibiotiques actifs ?

Bactéries IOA aiguë : généralement pousse = ++

Bactéries IOA si chronique ou matériel : +/- **biofilm** et intracellulaire

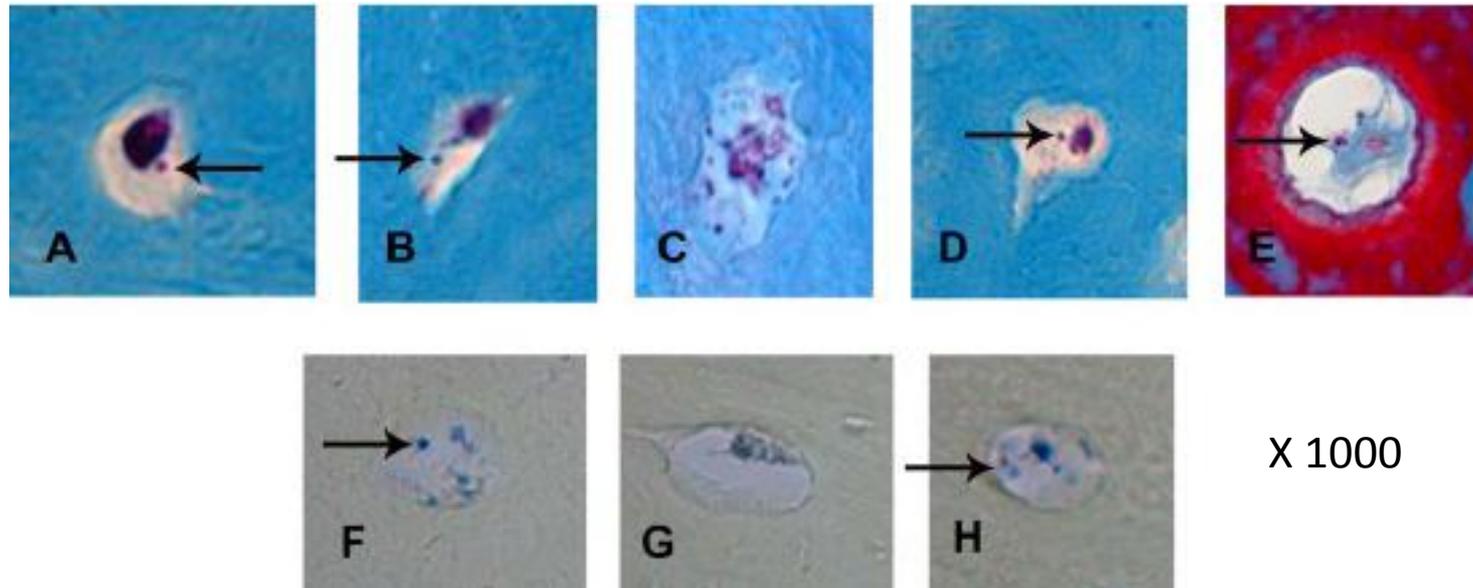


Mise en culture

Présence de bactéries ? Lesquelles ? Quels sont les antibiotiques actifs ?

Bactéries IOA aiguë : généralement pousse = ++

Bactéries IOA si chronique ou matériel : +/- biofilm et **intracellulaire**



Bactéries (points noirs) internalisées dans les ostéocytes entourés par des lamelles osseuses.

(Internalization of *S. aureus* by osteoblasts in a patient with long term recurrent osteomyelitis. JBJS 2005)

Mise en culture

- **Bactéries IOA = biofilm / intracellulaire**

donc des bactéries cachées, engluées et adhérentes
des bactéries stressées
des bactéries physiologiquement peu actives

- **Bactéries IOA = très diverses**

donc des bactéries aérobies
des bactéries anaérobies
des bactéries à croissance rapide / lente
des bactéries classiques / des bactéries exigeantes / non cultivables

Donc : - milieux riches variés, nombreux
- incubation longue

Prolonged Bacterial Culture to Identify Late Periprosthetic Joint Infection: A Promising Strategy

Peter Schäfer,¹ Bernd Fink,² Dieter Sandow,¹ Andreas Margull,¹ Irina Berger,³ and Lars Frommelt⁴

¹Ambulatory Healthcare Center, Labor Ludwigsburg, Ludwigsburg, ²Clinic of Joint Replacement, General and Rheumatic Orthopaedics, Orthopaedic Clinic Markgröningen, Markgröningen, ³Institute of Pathology, Klinikum Kassel, Kassel, and ⁴ENDO-Klinik, Hamburg, Germany

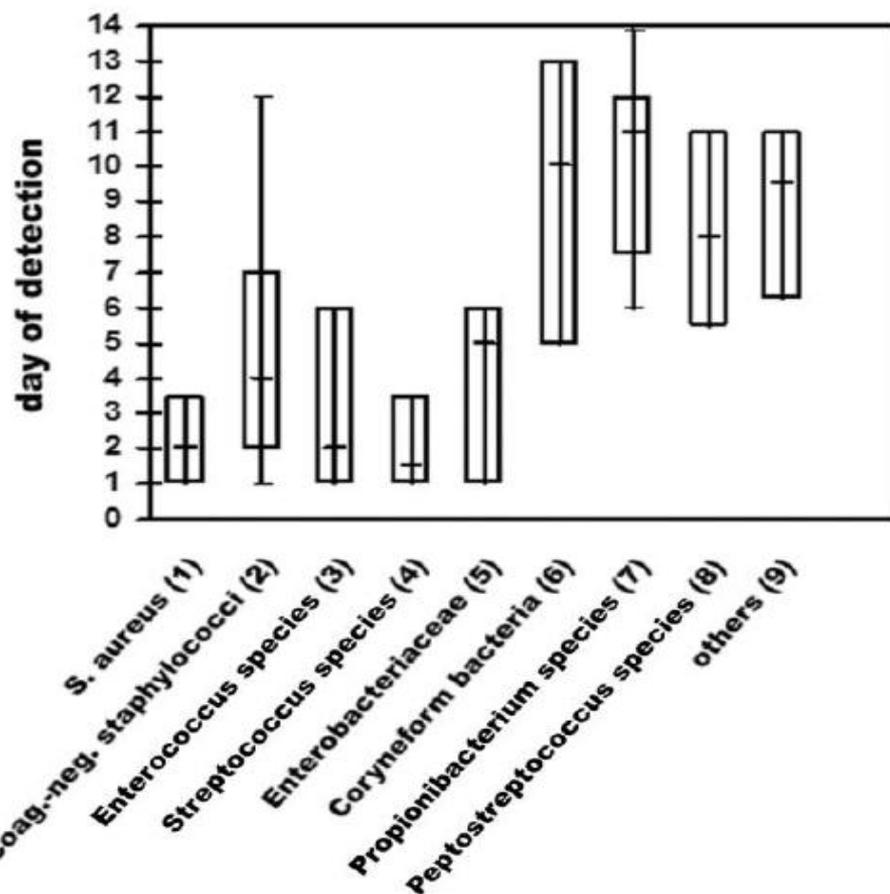
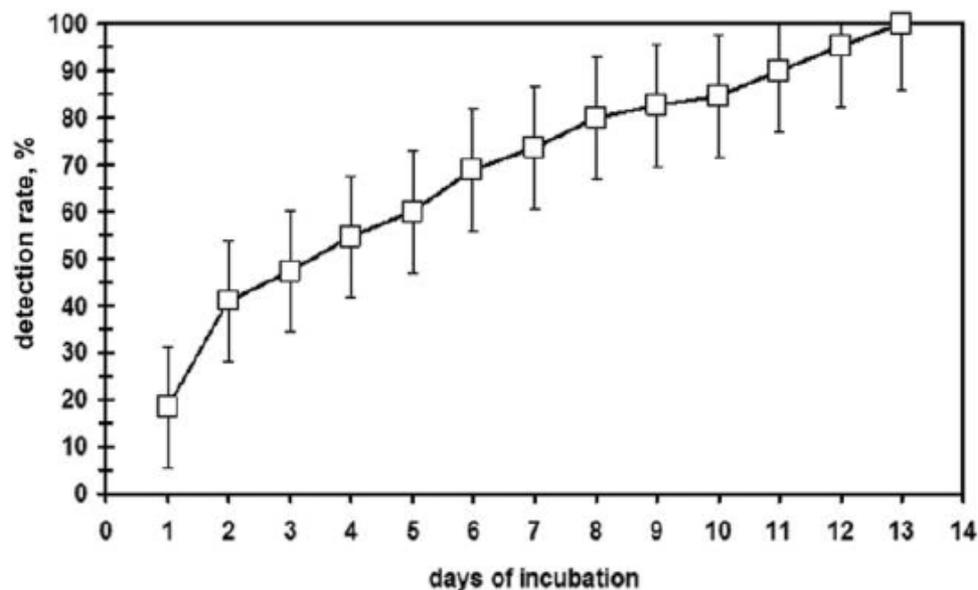


Figure 1. Time to diagnosis of infection by culture. Whisker lines span the 95% Hall-Wellner CI.

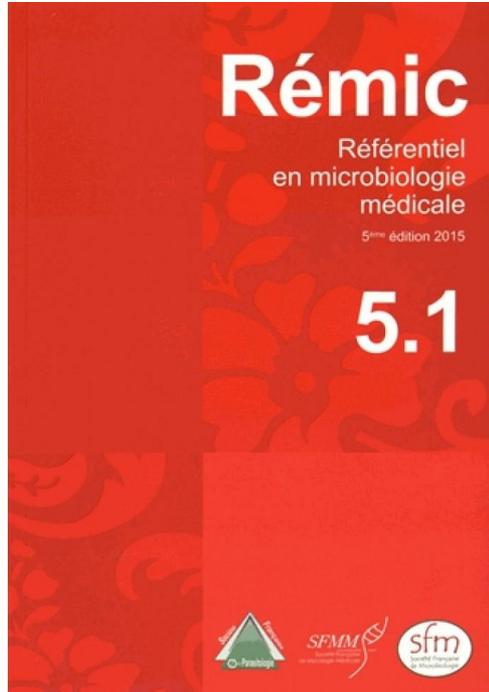
Recommandations de pratique clinique

Infections ostéo-articulaires sur matériel

(prothèse, implant, ostéo-synthèse)

Mai 2009

Il est recommandé de poursuivre l'incubation des milieux de culture solides (pendant 5 jours en aérobiose et pendant 8 jours en anaérobiose) et liquides (pendant 14 jours) pour permettre l'isolement de microcolonies de bactéries de croissance lente appelées « small colony variants » [102, 103], de *Propionibacterium acnes* et de bactéries d'espèces différentes qui apparaissent sur les géloses de façon décalée dans le temps (prélèvements pluri-microbiens).



Il est recommandé d'ensemencer les liquides ou broyats obtenus sur des milieux riches incubés à environ 35° C environ dans des atmosphères variées et de prolonger l'incubation au minimum 14 jours.

Mise en culture

Recommandation Référentiel de Microbiologie REMIC 2015

- GS aérobie : lecture J1, J2, J10 et/ou J14
- PVX CO₂ : lecture J1, J2, J10 et/ou J14
- GS ou Gélose Schaedler anaérobie : lecture J2, J3, J10 et/ou J14
- Milieu liquide Bouillon Schaedler et/ou BCC :
 - lecture régulière jusqu'à J14
 - Gram systématique à J14 avant de déclarer négatif (voire repiquage systématique ?)
- Utilisation possible des **flacons d'hémocultures** avec une incubation prolongée jusqu'à J14 dans un automate :
 - pour liquide articulaire :
 - directement au bloc ou au lit du malade
 - enfant +++
 - pour broyat en remplacement du milieu liquide
 - plus simple à suivre mais coût
 - milieu optimisé
 - repiquage systématique en fin d'incubation ?

Mise en culture

Recommandation Référentiel de Microbiologie REMIC 2015

- Autres milieux peuvent être ajoutés en fonction de contextes cliniques particuliers et/ou de recherches spécifiques (notamment mycobactéries)
- **Limitation FP** par contamination au cours des lectures :
 - doubler l'ensemencement des géloses anaérobies et au sang cuit
 - seconde boîte ouverte que pour la lecture tardive
- Lecture attentive :
 - recherche des **différents aspects** de colonies
 - recherche **micro-colonies/SCV** : présence de variants métaboliques
- Recherche de *Mycobacterium* spp. sur demande spécifique initiale ou secondairement en cas de culture négative avec cytologie et contexte clinique évocateur

Mise en culture

Recommandation Référentiel de Microbiologie REMIC 2015

- **Culture positive précoce en milieu solide** ne dispense pas
 - des lectures suivantes
 - d'une incubation complète jusqu'à au moins 14 J

.... à la recherche de bactéries à croissance plus lente, les infections polymicrobiennes représentant 10 à 15 % des IOA, notamment sur prothèse

- **Positivité du milieu liquide** doit faire stopper l'incubation qui ne permettra plus la croissance d'autres bactéries

- Rendu progressif des résultats entre J0 et J14

Interprétation des cultures

Infection polymicrobienne (>15% des cas)



- Rare (1 colonie) *S. aureus* culture positive en 24h
- Quelques colonies de Staphylocoque à coagulase négative à J4
- Nombreuses petites colonies de *P. acnes* à J10

D'après Desplaces *et al.*

Diagnostic microbiologique des IOA

Proposition ?

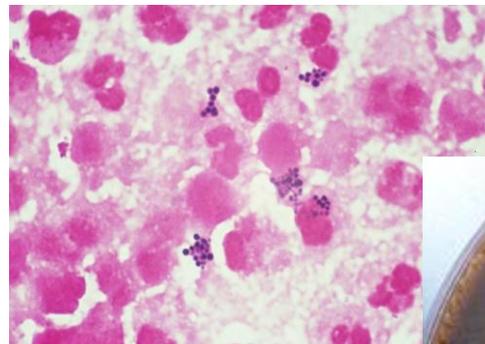
Gélose sang aérobie	J1 J2 (J3)
Gélose chocolat CO ₂	J1 J2 (J3)
Gélose sang anaérobie	(J2) J3
Gélose chocolat CO ₂	J10 ou J14
Gélose sang anaérobie	J10 ou J14
Bouillon (Schaedler)/Hémoc	jusqu'à J14 + Gram systématique(?)

Diagnostic bactériologique

■ Infections aiguës à espèces classiques

Bactéries "normales"

- facile
- ED +
- réaction cellulaire ++
- culture rapide



S. aureus



■ Infections chroniques

Bactéries "stressées"

- ED –
- peu de PNN
- culture lente >> 48 heures
- aspects polymorphes des cultures
- perturbation de l'activité des ATB
- antibiogrammes différents

J10



Staphylocoques à coagulase négative

Interprétation des cultures



J2



J10



Piège : ne pas examiner avec attention les cultures

Polymicrobisme et SCV

Dicton « *ce qui est petit est mignon* » ... en fait dans les IOA avec les SCV le dicton serait plutôt « ce qui est petit est difficile à voir ! » (Pr F. Laurent)

Interprétation des cultures



J2



J10

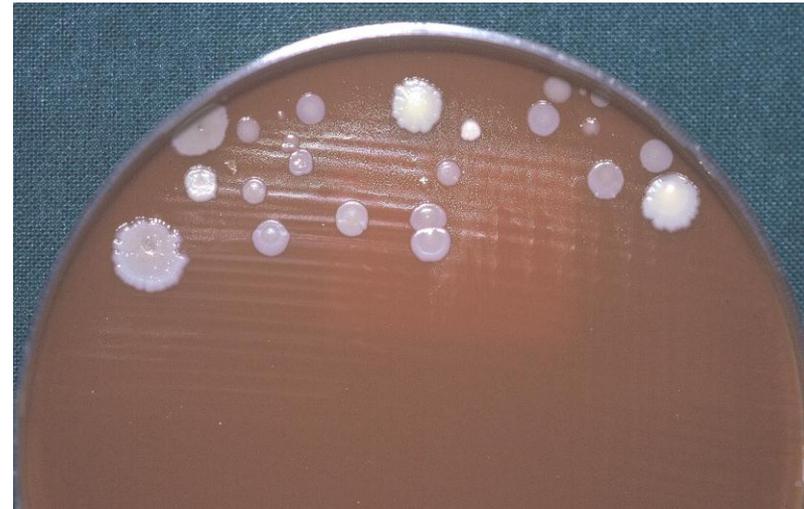


**ou culture uniquement en bouillon liquide
(sachant qu'un seul cocci ou un seul bacille suffit à positiver)**

Interprétation des cultures



Polymorphisme
Polymicrobisme
Contamination
????



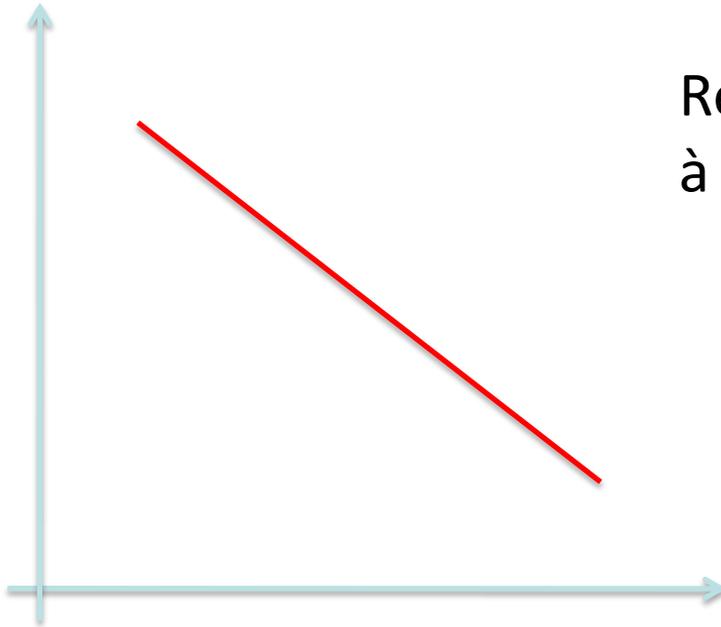
Aide : caractères biochimiques (galerie), Maldi-Tof, génétique éventuellement

Piège : ne pas examiner avec attention les cultures

Polymicrobisme et SCV

Dicton « *ce qui est petit est mignon* » ... en fait dans les IOA avec les SCV le dicton serait plutôt « *ce qui est petit est difficile à voir !* » (Pr F. Laurent)

% de préls
détectés avec des
SCV



Age de la technicienne ou niveau de presbytie

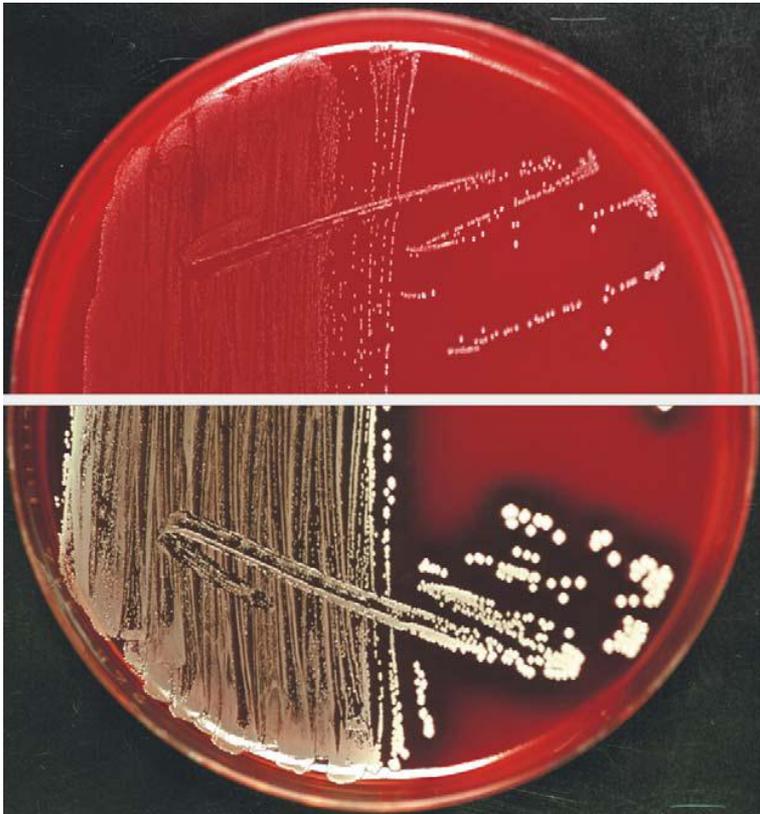
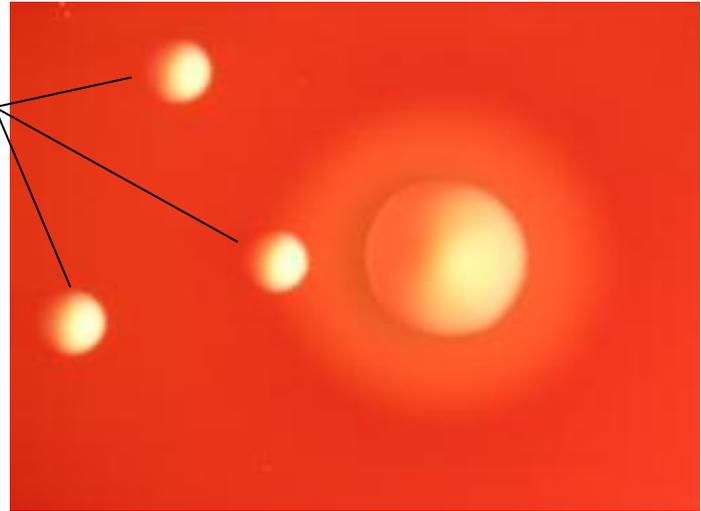
Retraite
à 45 ans ou



Personnel formé

Variants microcolonies ou SCV

SCV



- Particularités des micro-colonies *in vitro* :
 - temps de génération (doublement) x 10
 - perte de l'activité bactéricide de certains ATB
- Persistance des bactéries dans des niches cellulaires protectrices (cellules endothéliales, ostéoblastes, ...)
Peu de réaction inflammatoire locale
→ à l'origine d'échecs thérapeutiques
- Décrits - pour de nombreuses espèces bactériennes :
E. coli, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, ...
 - dans de nombreux contextes cliniques (IOA, mucoviscidose, IU, ...)

Variants microcolonies ou SCV

Exemple culture de biopsies osseuses

J10



Résultats Culture de liquide articulaire et biopsies osseuses

Staphylococcus epidermidis n° 1 : à J2, 30 colonies

6/6

sensible à

Rifampicine, Vancomycine, Teicoplanine, Fosfomycine, Linézolide, Daptomycine, Cotrimoxazole

résistant à

Pénicilline G, Oxacilline, Kanamycine, Tobramycine, Gentamicine, Erythromycine, Lincomycine, Pristinamycine, Ofloxacine, Acide fusidique

Staphylococcus epidermidis n° 2 : à J10, 20 colonies de type **SCV**

5/6

sensible à

Rifampicine, Vancomycine, Teicoplanine, Fosfomycine, Linézolide, Daptomycine

intermédiaire à

Lincomycine, Cotrimoxazole

résistant à

Pénicilline G, Oxacilline, Kanamycine, Tobramycine, Gentamicine, Erythromycine, Pristinamycine, Ofloxacine, Acide fusidique

Staphylococcus epidermidis n° 3 : à J10, 8 colonies de type **SCV**

2/6

sensible à

Rifampicine, Vancomycine, Fosfomycine, Linézolide, Daptomycine

intermédiaire

Lincomycine, Cotrimoxazole

résistant à

Pénicilline G, Oxacilline, Kanamycine, Tobramycine, Gentamicine, Erythromycine, Pristinamycine, Ofloxacine, Teicoplanine, Acide fusidique

Culture et identification

- **Isoler tous les aspects** avec au moins :
 - **Identification et antibiogramme** sur les colonies différentes
 - Attention aux identifications obtenues par galerie biochimique
 - *S. aureus* et SCN : galerie « pas top »
 - Streptocoques : galerie « pas top »
 - Anaérobie : galerie « pas top »
- Maldi-TOF +++
- Sur au moins deux prélèvements différents (si possible)

Culture et identification

■ Interprétation des résultats

Fonction de :

- contexte clinique (infection aiguë vs chronique, ostéomyélite vs arthrite primitive vs infection sur prothèse, antibiothérapie préalable)
- la ou les **espèces** identifiées
- la nature et le **nombre** des **prélèvements positifs** et éventuellement pour ces derniers le **nombre de milieux positifs et de colonies** observées

Mais : pas de consensus définitif

La probabilité d'infection augmente avec le nombre de prélèvements positifs en culture avec la même bactérie :

	Sensibilité (sur prothèse)	Spécificité	
1+ / 5 à 7 préls	10%	26%	
2+ / 5 à 7 préls	20%	53%	
3+ / 5 à 7 préls	95%	85%	Altweg. JSJB 2003

Culture et identification

■ Interprétation des résultats

Retenir le diagnostic d'IOA quand

1. ≥ 3 prélèvements per-opératoires

ou 2 prélèvements espacés dans le temps (1 per-op + 1 LAR ou 1 Hémoc)

positifs à la même bactérie (**même espèce et même antibiogramme**) appartenant à la **flore cutanée** (SCN, *P. acnes*, corynébactéries, ...)

2. ≥ 2 prélèvements positifs

à une bactérie n'appartenant pas à la flore cutanée et pour laquelle la question d'une contamination ne se pose pas (*Staphylococcus aureus*, Entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Campylobacter* spp., *Pasteurella*, ...)

Certains auteurs proposent des critères moins stricts, **un seul prélèvement positif** pouvant suffire pour retenir le diagnostic d'IOA pour des **espèces classiquement pathogènes** (*S. aureus*, Entérobactéries, pyo, ...)

Culture et identification

■ Interprétation des résultats

Arthrites sans prothèse : pb car 1 seul prélèvement (liquide articulaire)

Diagnostic = combinaison

- cytologie
- nature de l'espèce bactérienne isolée
- nombre de milieux positifs
- nombre de colonies en milieu solide +/- positivité bouillon

Antibiogrammes

- Méthodes classiques
- Pour *Staphylococcus* spp :
 - Recherche *mecA* ou PLP2a en systématique ? (si phénotypiquement S)
 - CMI Vanco/Teico en systématique ?
- Pour streptocoques non groupables :
 - Vérification CMI bêta-lactamines comme pour les endocardites
- Pour *Pseudomonas* spp :
 - Vérification CMI des bêta-lactamines utilisées pour traitement
- Pour SCV : faire ATBgramme en boite

Diagnostic microbiologique des IOA

Compte rendu de synthèse et interprétation

→ étape ultime mais importante

- positivité oui/non
- délai positivité
- nombre prélèvements +/- et localisation
- nombre de milieux + et nature
- nombre de colonies/milieu
- synthèse type anatomo-pathologie ?

Conservation

- Conservation des prélèvements :
 - congélation -80°C ou -20°C
 - au moins jusqu'à la fin des incubations
 - le mieux : 1-2 mois, le temps que les cliniciens réagissent s'ils veulent plus (PCR)
- Conservation des souches :
 - congélation -80°C ou -20°C
 - pas de tubes de conservation, sur billes
 - minimum 1 an
 - le mieux : le plus longtemps possible (étude rechutes, récurrences, ...)

Que faire des prélèvements restés stériles ?

➡ 10 à 25% des IOA selon les séries et les contextes épidémiocliniques

- patient sous antibiotique (arrêt minimum 15 j)
- prélèvement mal fait
- transport trop long
- culture inadéquate
- bactérie trop fragile
- espèce particulière et/ou méconnue ou non cultivable
- mycobactérie

Comment améliorer le diagnostic ?

Nouveaux outils

➡ Travail pour l'optimisation de **conditions de culture** (flacons d'hémocultures, outils anti-biofilm) et délais de mise en culture

➡ **Biologie moléculaire**

- rapidité, sensibilité potentielle à optimiser +
- pas de miracle mais prometteur
- nécessité de coordonner des **études prospectives d'évaluation**
 - de la PCR universelle
 - des PCR spécifiques
 - des schémas diagnostiques optimisés stratifiés par groupe patients

➡ Sérologies, **biomarqueurs** dans le liquide synovial

Nouveaux outils

➡ Travail pour l'optimisation de **conditions de culture** (flacons d'hémocultures, outils anti-biofilm) et délais de mise en culture

➡ **Biologie moléculaire**

- rapidité, sensibilité potentielle à optimiser +
- pas de miracle mais prometteur
- nécessité de coordonner des études prospectives d'évaluation
 - de la PCR universelle
 - des PCR spécifiques
 - des schémas diagnostiques optimisés stratifiés par groupe patients

➡ Sérologies, **biomarqueurs** dans le liquide synovial

Un exemple : ostéo-arthrite de l'enfant

PHRC PIRLA, Lyon-Saint-Etienne

190 prélèvements

Culture

Positive : 86

Négative : 104

89 des 104 prélèvements culture négative

<4 ans

>4 ans

PCR spécifique
K. kingae

PCR Universelle
16SrDNA

29 +

60 -

29 *K. kingae*

8 +

52 -

N. meningitidis W13 (1)
S. pyogenes (1)
S. constellatus (1)
S. aureus (1)
Streptococcus spp. (1)
Enterobacteriaceae (2)
Pseudomonas spp. (1)

<i>S. aureus</i>	38
<i>K. kingae</i>	25
<i>S. pyogenes</i>	4
<i>S. agalactiae</i>	3
<i>S. pneumoniae</i>	6
<i>H. influenzae</i>	2
Autres	8

1+ Gélose sang
12+ Flacon Hémoc ana
24+ Flacon Hémoc aéro

Bilan *Kingella kingae*

Culture gélose

1/190

Culture gélose + flacon hémoculture

25/190

Culture gélose + flacon hémoculture + PCR

54/190

Nouveaux outils vs. le biofilm

- Impact sur la sensibilité de la culture
 - Problème : bactéries "collées" sur le matériel, engluées dans la matrice du biofilm, métaboliquement peu actives
- Solution possible : sonication des prothèses et matériels dans 400 mL de soluté de Ringer puis ensemencement de 0,5 mL
(Trampuz *et al.* N Engl J Med 2007)



Sonicate considéré positif si ≥ 5 UFC / 0,5 mL

↗ sensibilité de la culture ; VPN $\geq 90\%$

ORIGINAL ARTICLE

Sonication of Removed Hip and Knee Prostheses for Diagnosis of Infection

Andrej Trampuz, M.D., Kerryl E. Piper, M.S., Melissa J. Jacobson, A.S., Arlen D. Hanssen, M.D., Krishnan K. Unni, M.D., Douglas R. Osmon, M.D., Jayawant N. Mandrekar, Ph.D., Franklin R. Cockerill, M.D., James M. Steckelberg, M.D., James F. Greenleaf, Ph.D., and Robin Patel, M.D.



Difficile à mettre en œuvre !!

Table 1. Comparison of Microbiologic Tests for the Diagnosis of Prosthetic-Joint Infection.

Test	Patients with Prosthetic-joint Infection (N=79)	Patients with Aseptic Failure (N=252)	Sensitivity	Specificity	Positive Predictive Value	Negative Predictive Value
	<i>no. of patients with positive specimens*</i>		<i>% (95% confidence interval)</i>			
Synovial-fluid culture	18/32	2/108	56.3 (37.7–73.6)	98.1 (93.5–99.8)	90.0 (68.3–98.8)	88.3 (81.2–93.5)
Periprosthetic-tissue culture†						
≥1 positive culture	58	23	73.4 (62.3–82.7)	90.9 (86.6–94.1)	71.6 (60.5–81.1)	91.6 (87.4–94.7)
≥2 positive cultures	48	2	60.8 (49.1–71.6)	99.2 (97.2–99.9)	96.0 (86.3–99.5)	89.0 (84.7–92.4)
Sonicate-fluid culture†‡						
≥1 CFU	64	28	79.0 (68.5–87.3)	88.5 (83.9–92.2)	68.8 (58.4–78.0)	93.9 (88.9–95.8)
≥2 CFU	63	8	79.7 (69.2–88.0)	96.8 (93.8–98.6)	88.7 (79.0–95.0)	93.8 (90.2–96.4)
≥3 CFU	63	5	79.7 (69.2–88.0)	98.0 (95.4–99.4)	92.6 (83.7–97.6)	93.9 (90.3–96.5)
≥4 CFU	62	5	78.5 (67.8–86.9)	98.0 (95.4–99.4)	92.5 (83.4–97.5)	93.6 (89.9–96.2)
≥5 CFU	62	3	78.5 (67.8–86.9)	98.8 (96.6–99.8)	95.4 (87.1–99.0)	93.6 (90.0–96.2)
≥6 CFU	62	3	78.5 (67.8–86.9)	98.8 (96.6–99.8)	95.4 (87.1–99.0)	93.6 (90.0–96.2)
≥7 CFU	60	3	75.9 (65.0–84.9)	98.8 (96.6–99.8)	95.2 (86.7–99.0)	92.6 (89.2–95.7)
≥8 CFU	59	3	74.7 (63.6–83.8)	98.8 (96.6–99.8)	95.2 (86.5–99.0)	92.6 (88.8–95.4)
≥9 CFU	58	3	73.4 (62.3–82.7)	98.8 (96.6–99.8)	95.1 (86.3–99.0)	92.2 (88.4–95.1)
≥10 CFU	57	3	72.2 (60.9–81.7)	98.8 (96.6–99.8)	95.0 (86.1–99.0)	91.9 (88.0–94.8)
≥25 CFU	55	2	69.6 (58.2–79.5)	99.2 (97.2–99.9)	96.5 (87.9–99.6)	91.2 (87.2–94.3)
≥50 CFU	54	1	68.4 (56.9–78.4)	99.6 (97.8–100.0)	98.2 (90.3–100.0)	90.9 (86.9–94.1)
Gram's staining of sonicate fluid	34/76	0/250	44.7 (33.3–56.6)	100.0 (98.5–100.0)	100.0 (89.7–100.0)	85.6 (81.1–89.4)

Nouveaux outils vs. le biofilm

- Solution possible : sonication des prothèses et matériels dans du soluté de Ringer puis ensemencement (Trampuz *et al.* N Engl J Med 2007)

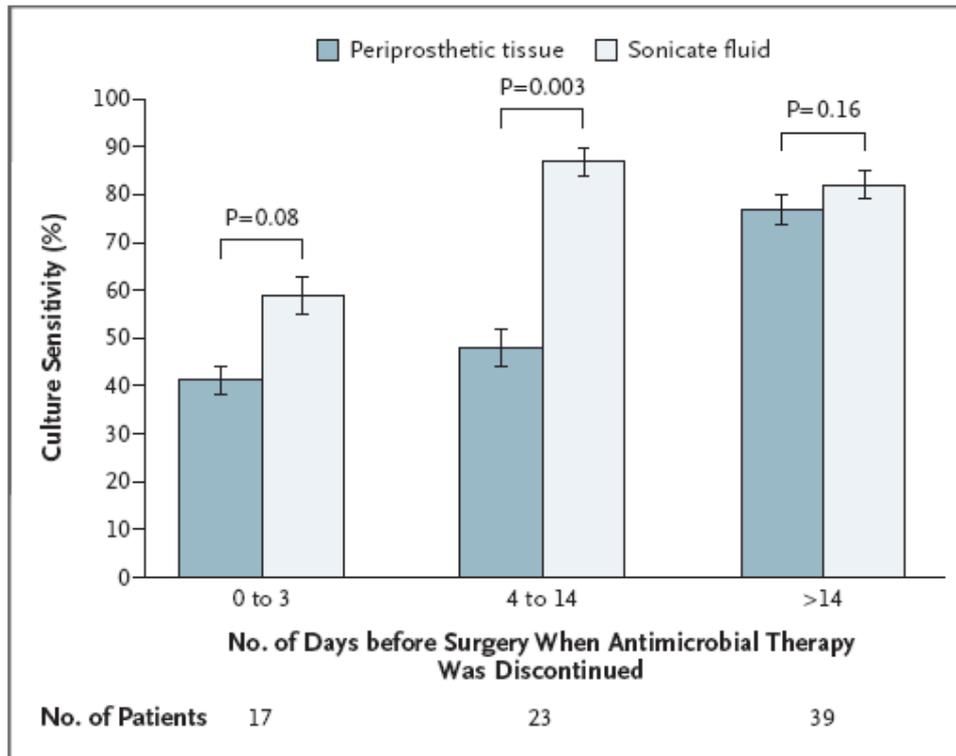


Figure 2. Effect of Preoperative Antimicrobial Therapy on Culture Sensitivity in Patients with Prosthetic-Joint Infection.

Periprosthetic-tissue culture was defined as positive if the same organism was grown from two or more specimens. Sonicate-fluid culture was defined as positive if more than 5 colony-forming units of the same organism grew on the aerobic or the anaerobic plate. I bars indicate 95% confidence intervals.

→ Intérêt quand fenêtre antibiotique trop courte ou inexistante avant la dépose de prothèse et les prélèvements

→ Pas d'étude comparative par rapport au broyage

Nouveaux outils

➡ Travail pour l'optimisation de **conditions de culture** (flacons d'hémocultures, outils anti-biofilm) et délais de mise en culture

➡ **Biologie moléculaire**

- rapidité, sensibilité potentielle à optimiser +
- pas de miracle mais prometteur
- nécessité de coordonner des **études prospectives d'évaluation**
 - de la PCR universelle
 - des PCR spécifiques
 - des schémas diagnostiques optimisés stratifiés par groupe patients

➡ Sérologies, **biomarqueurs** dans le liquide synovial

Approches moléculaires

■ PCR universelle 16S

Avantage : pas d'a priori

Problèmes : manque de sensibilité (< à la culture)

extraction / inhibiteurs

pb pour les infections plurimicrobiennes

délais et coûts

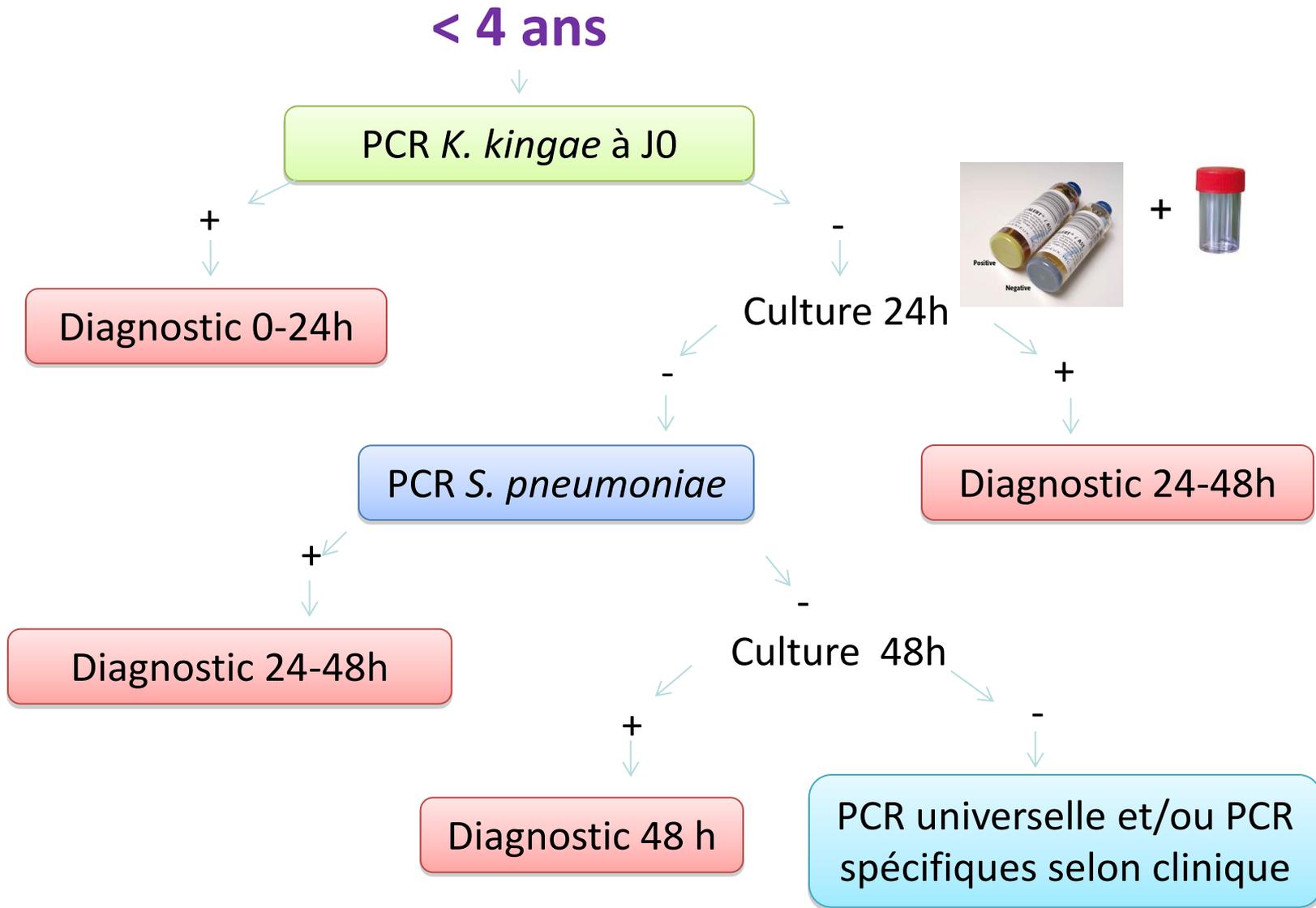
■ PCR ciblées : + sensibles que PCR 16S

- *Kingella*
- *Staphylococcus spp* et *S. aureus*
- *Streptococcus spp* et *S. pneumoniae*
- *Propionibacterium acnes*
- *Borrelia burgdorferi*

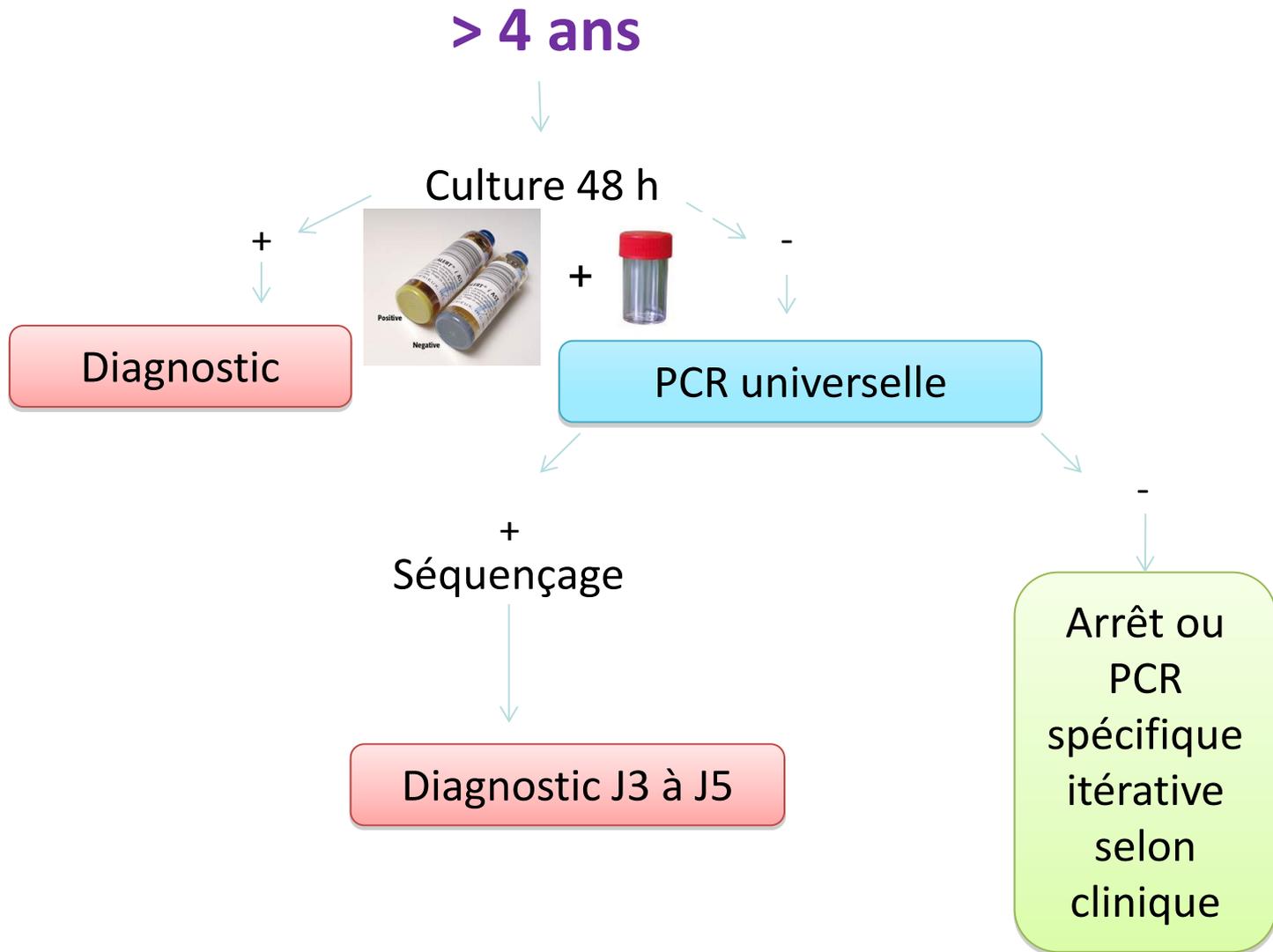
→ PHRC PIRLA sur les liquides articulaires (Lyon, Saint-Etienne) : place des techniques moléculaires

■ GeneXpert et MSSA/MRSA ; tests syndromiques

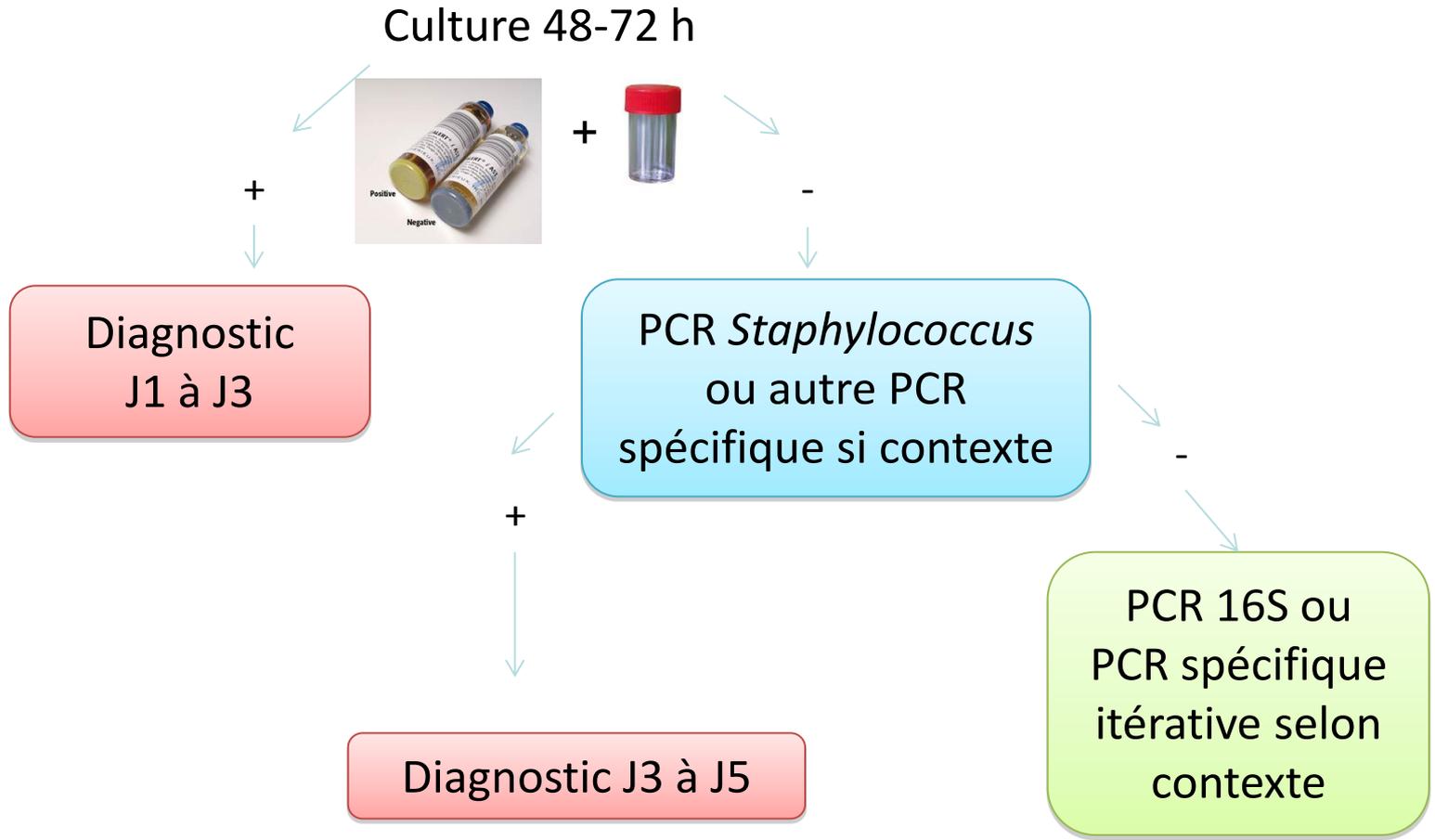
Algorithme décisionnel pour le diagnostic de l'IOA de l'enfant



Algorithme décisionnel pour le diagnostic de l'IOA de l'enfant

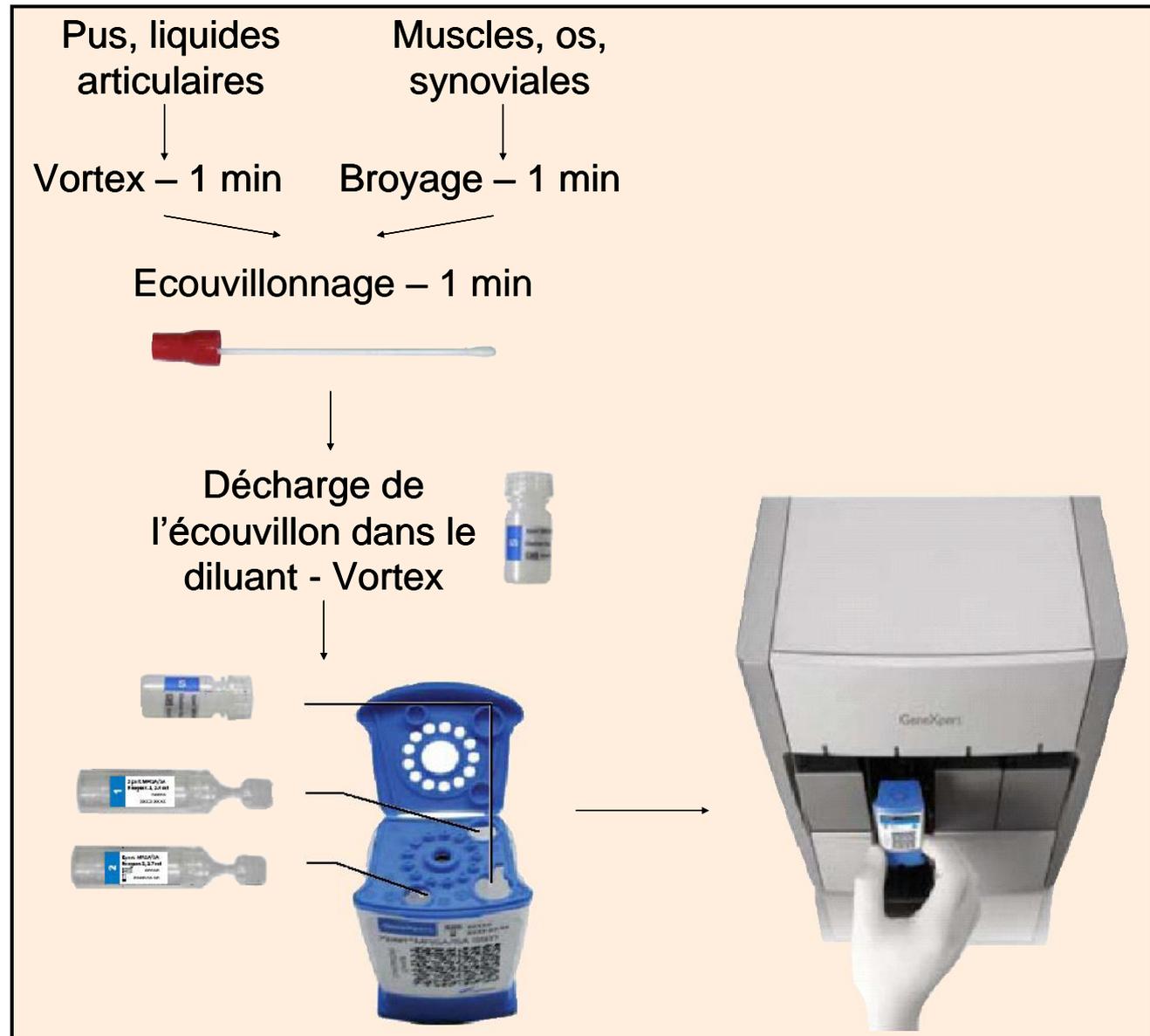


Proposition d'un algorithme pour le diagnostic microbiologique de l'IOA de l'adulte



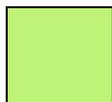
Tests moléculaires rapides

GeneXpert
MRSA-SA
≈ 1h

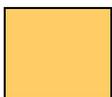


Tests moléculaires rapides

	SA positif en culture	Culture stérile ou autres germes	Total
SA positif en GeneXpert	68 dont 59 SASM + 9 SARM	3	71
SA négatif en GeneXpert	4	16	20
Total	72	19	91



Résultats concordants GeneXpert / culture = 84 prélèvements



Prélèvements négatifs pour SA en culture, détectés positifs par le GeneXpert mais . autres prélèvements osseux + à SA pour ces trois patients
 . sensibilité > de GeneXpert
 . exclus du calcul de Se



Prélèvements positifs à SASM en culture, **non détectés par le GeneXpert** mais étude rétrospective sur prélèvements avec congélation/décongélation

Tests moléculaires rapides

- **Diagnostic en < 1H des IOA à SASM et SARM** par le test GeneXpert MRSA-SA SSTI, directement à partir des prélèvements ostéo-articulaires
- **Sensibilité et spécificité excellentes** → Adaptation précoce du traitement probabiliste ?
 - **Sensibilité** = $68/72 = 94,4\%$
 - **Spécificité** = $16/16 = 100\%$
- Nécessité d'études complémentaires prospectives
 - VPP, VPN
 - Impacts clinique et économique (coût ++) dans le cadre des IOA
- **Tests PCR multiplex (« syndromiques ») en cours de développement** mais problème des espèces ciblées : Unyvero ITI, Biofire FilmArray BJI...

Place et avenir des tests moléculaires

- **Pour l'instant : indications plutôt limitées**
 - à réserver quand culture – et suspicion d'IOA ++
 - PCR universelle +/- PCR spécifiques selon le contexte
- Avenir : diagnostic bactériologique « extemporané » ?
 - adaptation + rapide de l'antibiothérapie
 - modification de la prise en charge chirurgicale des IOA

Nouveaux outils

➡ Travail pour l'optimisation de **conditions de culture** (flacons d'hémocultures, outils anti-biofilm) et délais de mise en culture

➡ **Biologie moléculaire**

- rapidité, sensibilité potentielle à optimiser +
- pas de miracle mais prometteur
- nécessité de coordonner des études prospectives d'évaluation
 - de la PCR universelle
 - des PCR spécifiques
 - des schémas diagnostiques optimisés stratifiés par groupe patients

➡ Sérologies, **biomarqueurs** dans le liquide synovial

Nouveaux biomarqueurs non invasifs des IOA ?



SANG : Marqueurs de l'inflammation
(GB, VS, CRP, PCT, IL-6)

Rapides, peu couteux mais interprétation difficile...



SANG : Marqueurs sérologiques de l'agent
pathogène responsable

Approche sérologique dans les IOA ?

Multiplex Antibody Detection for Noninvasive Genus-Level Diagnosis of Prosthetic Joint Infection

BJI InoPlex®

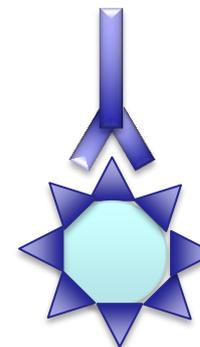
Simon Marmor,^a Thomas Bauer,^b Nicole Desplaces,^c Beate Heym,^{d,e} Anne-Laure Roux,^{d,e} Olivier Sol,^f Julie Rogé,^f Florence Mahé,^f Laurent Désiré,^f Philippe Aegerter,^g Idir Ghout,^g Jacques Ropers,^g Jean-Louis Gaillard,^{d,e}  Martin Rottman^{e,h}

Antigènes coâtés sur des billes pour détecter IgG anti- :

S. aureus, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*,

S. agalactiae (strepto B) et *P. acnes*

455 patients dont 176 infections de prothèse



All cases

Organism(s)	Sensitivity	Specificity
Staphylococci targeted	68/94 (72.3) [62.7–80.7]	213/264 (80.7) [75.6–85.1]
<i>S. aureus</i>	36/54 (66.7) [53.4–78.2]	
<i>S. epidermidis</i>	26/35 (74.3) [58–86.7]	
<i>S. lugdunensis</i>	9/9 (100) [71.7–100]	
<i>S. agalactiae</i>	6/8 (75) [38.8–95.6]	250/270 (92.6) [89–95.3]
<i>P. acnes</i>	5/13 (38.5) [15.7–65.9]	235/277 (84.8) [80.2–88.7]

- 40 % des patients de cette étude infectés par des germes non ciblés par ce test
- Sensibilité et spécificité insuffisantes

Nouveaux biomarqueurs des IOA ?



LIQUIDE ARTICULAIRE : marqueurs de l'inflammation

GB, CRP, cytokines (IL-6), enzymes et peptides antimicrobiens

Leucocyte estérase

Alpha-défensine (peptide anti-microbien)

Leucocyte estérase

COPYRIGHT © 2011 BY THE JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY, INCORPORATED



Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: The Utility of a Simple Yet Unappreciated Enzyme

Javad Parvizi, MD, FRCS, Christina Jacovides, BS, Valentin Antoci, MD, PhD, and Elie Ghanem, MD

Investigation performed at the Rothman Institute of Orthopedics at Thomas Jefferson University Hospital, Philadelphia, Pennsylvania

Rapide, faible coût, bonne reproductibilité



Fig. 1

108 patients, dont 30 IPOA

	Knees Undergoing Arthroplasty (N = 108)	
	Positive = ++	Positive = + or ++
Sensitivity	80.6 (61.9-91.9)	93.5 (77.2-98.8)
Specificity	100 (94.5-100)	86.7 (77.1-92.9)
Positive predictive value	100 (83.4-100)	72.5 (55.9-84.9)
Negative predictive value	93.3 (85.4-97.2)	97.3 (89.7-99.5)

*Values are given as percentages, with the 95% confidence interval in parentheses.

Prix du test : 0,2 € !!!

- -/traces : infection très peu probable ; ++ : infection très probable
- Mais **non utilisable si liquide hémorragique**, subjectivité de l'interprétation

Leucocyte estérase

J. Parvizi,
T. Gehrke,
A. F. Chen

■ SPECIALTY UPDATE: ARTHROPLASTY Proceedings of the International Consensus on Periprosthetic Joint Infection

*From The Rothman
Institute,
Philadelphia,
Pennsylvania, United
States*



Bone Joint J 2013



Vers une indication en
routine de ce marqueur ?

International Consensus Group (ICG) on PJI * (2)

One of the following **major criteria** must be met for diagnosis of PJI:

1. Two positive periprosthetic cultures with phenotypically identical organisms, or
 2. A sinus tract communicating with the joint, or
- Three** of the following **five minor criteria** must be met for the diagnosis of PJI:

1. Elevated serum C-reactive protein (CRP) AND erythrocyte sedimentation rate (ESR)
2. Elevated synovial fluid white blood cell (WBC) count
OR ++ change on leukocyte esterase test strip
3. Elevated synovial fluid polymorphonuclear neutrophil percentage (PMN%)
4. Positive histological analysis of periprosthetic tissue
5. A single positive culture

Alpha-défensine

α -Defensin Accuracy to Diagnose Periprosthetic Joint Infection—Best Available Test?

Salvatore J. Frangiamore, MD, MS^a, Nicholas D. Gajewski, BS^b, Anas Saleh, MD^a, Mario Farias-Kovac, MD^a, Wael K. Barsoum, MD^a, Carlos A. Higuera, MD^a *The Journal of Arthroplasty* 31 (2016) 456–460

78 prélèvements dont 24 infections de prothèse
Sensibilité : 100%, Spécificité : 98%

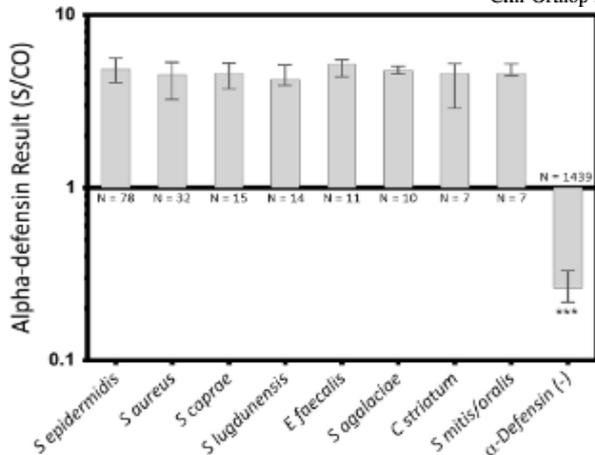
The Alpha Defensin-1 Biomarker Assay can be Used to Evaluate the Potentially Infected Total Joint Arthroplasty

Joshua Bingham MD, Henry Clarke MD, Mark Spangehl MD, Adam Schwartz MD, Christopher Beauchamp MD, Brynn Goldberg RN
Clin Orthop Relat Res (2014)

61 prélèvements dont 19 infections de prothèse
Sensibilité : 100%, Spécificité : 95%

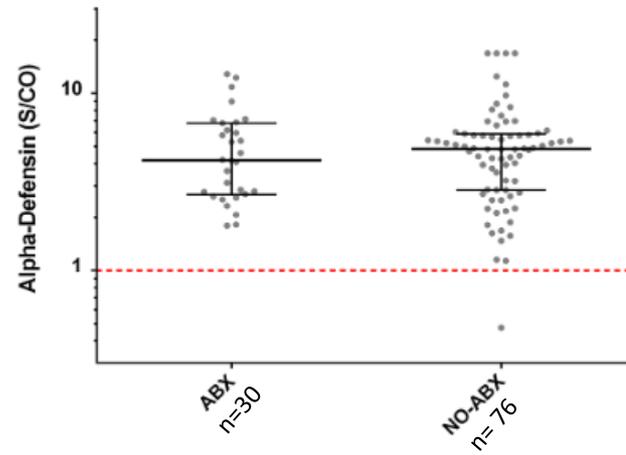
The Alpha-defensin Test for Periprosthetic Joint Infection Responds to a Wide Spectrum of Organisms

Carl Deirmengian MD, Keith Kardos PhD, Patrick Kilmartin MS, Simmi Gulati MS, Patrick Citrano BS, Robert E. Booth Jr MD
Clin Orthop Relat Res (2015)



The Alpha-defensin Test for Periprosthetic Joint Infections Is Not Affected by Prior Antibiotic Administration

Alisina Shahi MD, Javad Parvizi MD, FRCS, Gregory S. Kazarian AB, Carlos Higuera MD, Salvatore Frangiamore MD, Joshua Bingham MD, Christopher Beauchamp MD, Craig Della Valle MD, Carl Deirmengian MD
Clin Orthop Relat Res (2016)



Alpha-défensine – test qualitatif



Test rapide, utilisable au bloc ?



Pb coût du test : 300 €

→ Pour quels patients le proposer ?

■ ARTHROPLASTY

Qualitative α -defensin test (Synovasure) for the diagnosis of periprosthetic infection in revision total joint arthroplasty

Sigmund IK *et al.* Bone Joint J 2017

49 patients (dont 13 IPOA)

Sensibilité : 69%, Spécificité : 94%

Title: Diagnostic Accuracy of the Alpha Defensin Lateral Flow Device (Synovasure™) for Periprosthetic Infections in Microbiologically Complex Situations: A Study of 42 Cases in a French Referral Centre

De Saint Vincent *et al.* Orthop Traumatol Surg Res 2018

42 prélèvements (dont 9 IPOA, critères MSIS)
Cas avec diagnostic difficile

Sensibilité 89%, Spécificité 91%

VPN 97%, VPP 73%

Place des biomarqueurs synoviaux

- Pb **coût** (bandelette "urinaire" : 0.2€, CRP : 2.4€, IL-6 : 38€, alpha-défensine : 300€)
- Quand ? Quel délai pour le résultat ?
 - Préopératoire ?
 - Peropératoire : test directement au bloc ?
 - Postopératoire : conservation de l'échantillon, stabilité du biomarqueur
- Pas chez tous les patients !

Conclusion

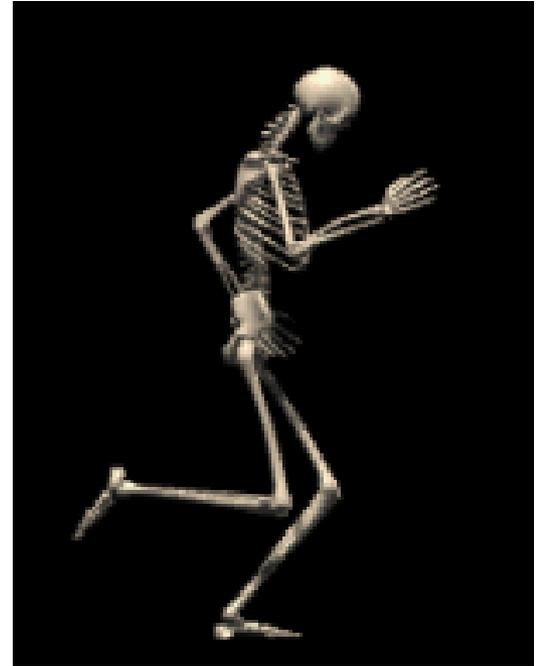
- **Points clés du diagnostic microbiologique**
 - gestion des prélèvements
 - conditions de cultures
 - travail délicat et difficultés rencontrées
 - résultats échelonnés parfois longs à obtenir
 - collaboration avec chirurgiens et infectiologues
- **Nouveaux outils** : doivent trouver leur place
 - amélioration des cultures
 - outils moléculaires
 - biomarqueurs

CULTURE!!!

“nobody is perfect” ...

mais on doit tout faire
pour l’être ... pour nos
patients ...

Merci de votre attention



celine.dupieux@chu-lyon.fr
frederic.laurent@univ-lyon1.fr