



Infections ostéo-articulaires: Les prélèvements et leur devenir

Dr Carole LEMARIE

Dr Marie KEMPF

Laboratoire de bactériologie-hygiène

CHU ANGERS

Soirée CRIOGO - CHU Angers

15-10-2013

Les prélèvements



- Nombre de prélèvements recommandés : **5** (SPILF); IDSA: ≥ 3 (5-6)
- Pots stériles
- Acheminés rapidement au laboratoire
- Au-moins 15j d'arrêt des antibiotiques
- Avant antibioprophylaxie

Au laboratoire de bactériologie

ETAPE 1

Broyage des prélèvements solides (SPILF)

CRIOGO mécanisé - depuis 2010

10 ml eau PPI + 10 billes en inox (5 mm)



ETAPE 2

Ensemencement et incubation des prélèvements (SPILF)

Milieux solides

- 1 gélose au sang aérobie
 - 1 gélose au sang cuit (sous CO₂)
 - 1 gélose au sang anaérobie = 8 jours
- } = 5 jours



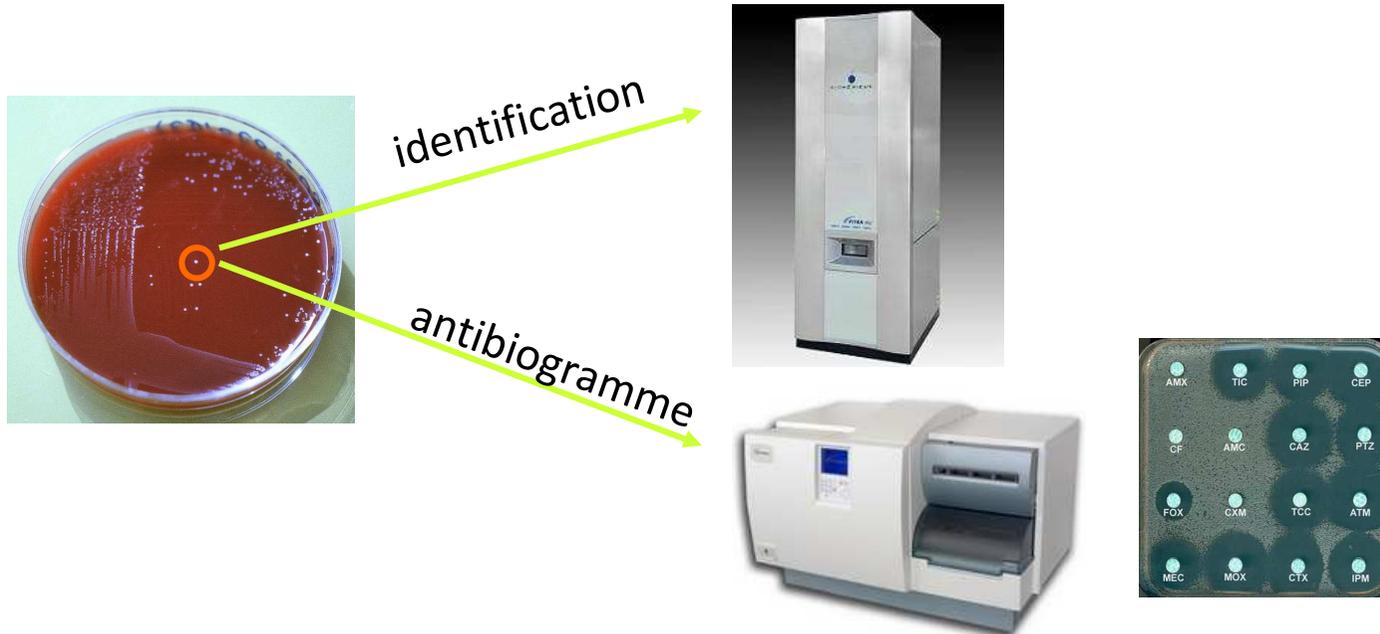
Milieux liquides

- 2 bouillons d'enrichissement (pour germes aérobies et anaérobies) = 14 jours

ETAPE 3

Identification des bactéries + antibiogramme

→ Réalisés sur toutes les colonies d'aspect différent

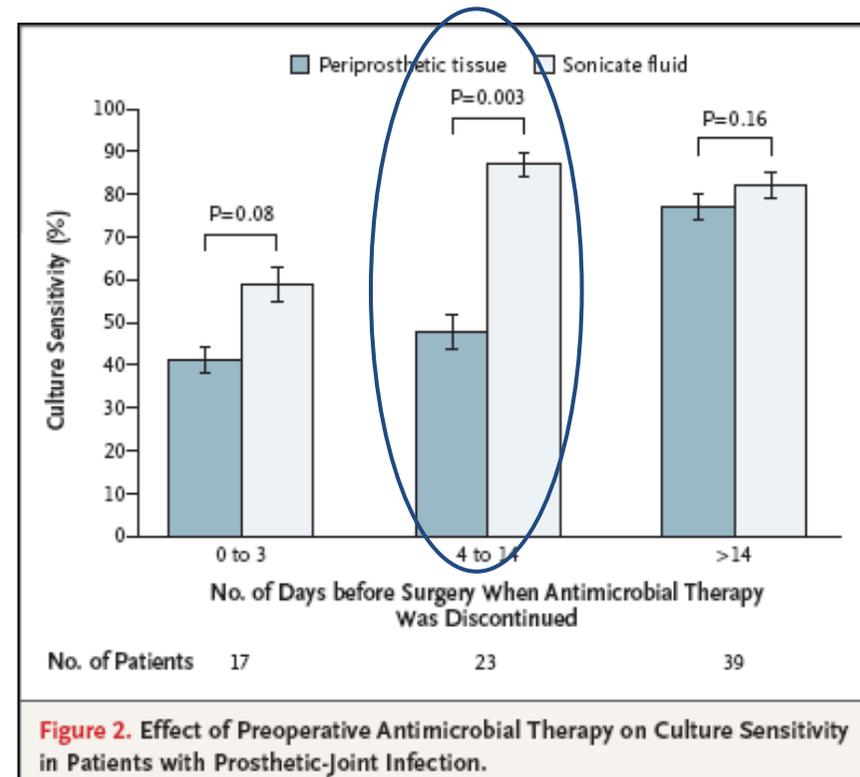


2 techniques non utilisées en routine :

a) La sonication du matériel

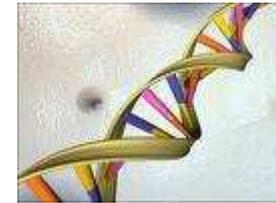
Etude prospective princeps

- ❑ 331 patients inclus pour
 - descellement aseptique (DA) 252
 - IPOA 79
- ❑ Sensibilité/spécificité
 - 61%/99% cult tissulaires (sans broyage)
 - 79%/99% cult de sonicats
- ❑ Sensibilité cult tissulaires
 - 50% si 2 prélèvs réalisés
 - 73% si 5 prélèvs réalisés
- ❑ Prélèvs positifs uniques
 - DA 8%
 - IP 13%



Trampuz, NEJM 2007

b) PCR « universelle » : ADNr16s



→ Détection/identification d'ADN bactérien dans les prélèvements

Étape 1: amplification du gène codant l'ARN ribosomique 16S

Étape 2: séquençage du gène amplifié

Étape 3: comparaison de la séquence avec les banques de données

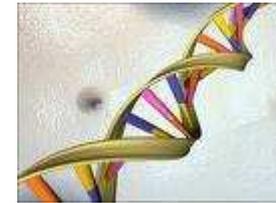
Avantages

- ✓ approche large, sans a priori du germe en cause (mise en évidence des bactéries ne cultivant pas)
- ✓ simplicité: une PCR pour toutes les bactéries

Limites

- ✓ contaminations possibles à toutes les étapes: prélèvements, réactifs, manipulateur...
- ✓ sensibilité < PCR spécifique
- ✓ Sur prélèvements monomicrobiens (si polymicrobiens: faire un clonage → lourd+++)
- ✓ méthode non discriminante pour des bactéries proches génétiquement (ex: pneumocoque et autres streptocoques)
- ✓ délai de rendu (7 jours)

PCR « universelle » dans les IOAP



- **Résultats disparates dans la littérature**
Sensibilité 50 à 92%, spécificité 65 à 94%
 - ❑ Variabilité des traitements pré-analytiques
 - ❑ Variabilité des amorces choisies
 - ❑ Pas d'homogénéité dans les techniques de cultures prises comme comparateur

- **Evaluation difficiles**
 - ❑ Etudes souvent monocentriques avec de petits effectifs
 - ❑ Grande difficulté de standardisation de la technique

Fenollar 2012 (Clin Microb Infect)- Vandercam 2008 (J MolDiagn) – Panousis 2005 (ACTA Orthop) – Fihman 2007 (J Infect)

MICROBIOS

Évaluation de l'apport des
techniques de biologie moléculaire
dans le diagnostic des infections
sur prothèses ostéo-articulaires

PHRC interrégional 2011, Ref : PROG/11/44

Type d'étude : Etude multicentrique observationnelle

Diapositives: DrPascale Bémer

PHRC MICROBIOS Schéma d'étude et objectifs

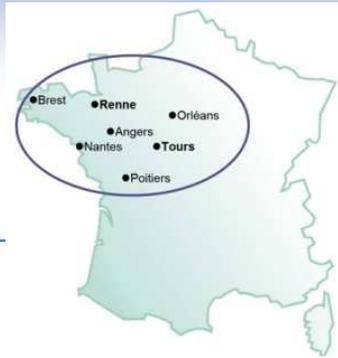


Schéma d'étude

- ❑ Etude multicentrique
- ❑ Inclusion consécutive des patients repris pour suspicion d'infection (critères présumés d'IOAP, SPILF 2009)
- ❑ Témoins négatifs inclus :
Patients opérés pour pose de prothèse de 1ère intention

Objectifs

- ❑ Apport de la PCR 16S dans le diagnostic des IOAP notamment chroniques, à germes à croissance lente ou en cas de culture négative
- ❑ Apport de l'histologie
- ❑ Apport du flacon d'hémoculture
- ❑ Délai de positivité des cultures
- ❑ Epidémiologie
 - ❑ Sensibilité aux antibiotiques

Critères d'inclusion des patients

➤ Critères diagnostiques présumés d'infection

(SPILF 2009)

- Fistule à proximité de la prothèse
- En faveur d'une infection aiguë (<1 mois de la pose)
 - Douleur, écoulement purulent,
 - Désunion ou nécrose ou inflammation de la cicatrice
- En faveur d'une infection chronique
 - Douleur et/ou descellement radiologique
- Sepsis chez un patient porteur de prothèse

Critères de diagnostic d'infection

❑ Critère clinique péri-opératoire : SPILF 2009

- ☞ Fistule communiquant avec la prothèse et/ou présence de pus

❑ Critère bactériologique : SPILF 2009

- ≥ 1 prélèvement positif si bactérie pathogène stricte ou rare
- ≥ 3 prélèvements positifs (*P. acnes*, STACN, corynébactéries)

Analyse

- ❑ **Description des patients à l'inclusion**
- ❑ **Analyse principale descriptive**
 - ☞ **Infection certaine**
 - Présence des critères clinique **et** bactériologique
 - ☞ **Infection probable**
 - Présence du critère clinique **ou** bactériologique
 - ☞ **Infection exclue**
 - Absence du critère clinique **et** bactériologique
- ❑ **Pour l'analyse moléculaire**
 - ☞ Analyse de tous les sepsis, à l'exception des sepsis polymicrobiens

Les prélèvements et leur devenir



5 prélèvements per-
opératoires pour la
bactériologie

+

1 prélèvement per-
opératoire pour
l'histologie (capsule)

BROYAGE
(automatisé,
standardisé)

CULTURE X5



**BIOLOGIE
MOLECULAIRE X5**
→ PCR 16S

3 milieux solides COS/CHOC/ANA
1 milieu liquide ana
1 flacon Hc
Incubation 7j (mil. Solides)/14 j (mil liquides)

Protocole standardisé:

- Extraction de 200 µl de broyat
- PCR universelle avec amorces identiques
- 1 contrôle interne/prélèvement
- 3 contrôles de qualité (broyats et souches bactériennes envoyés aux 7 centres)

Histologie

Sur capsule ou pseudocapsule :

1. Compte des polynucléaires neutrophiles

→ lecture de 10 champs (seuil 5 PNN/champ)

HPF1*	HPF2*								HPF10

2. Classification histopathologique selon Morawietz

Tissu de granulation inflammatoire (bourgeon charnu)	Oui	Non
Polynucléaires neutrophiles intra-tissulaires	Oui	Non
Plasmocytes	Oui	Non
Nodules lymphocytaires	Oui	Non
Granulome épithélioïde	Oui	Non
Tissu fibro-vasculaire cicatriciel	Oui	Non
Granulome macrophagique/débris d'usure prothétiques	Oui	Non

Classification histopathologique selon Morawietz

Type I : réaction granulomateuse macrophagique
aux débris d'**usure prothétique**

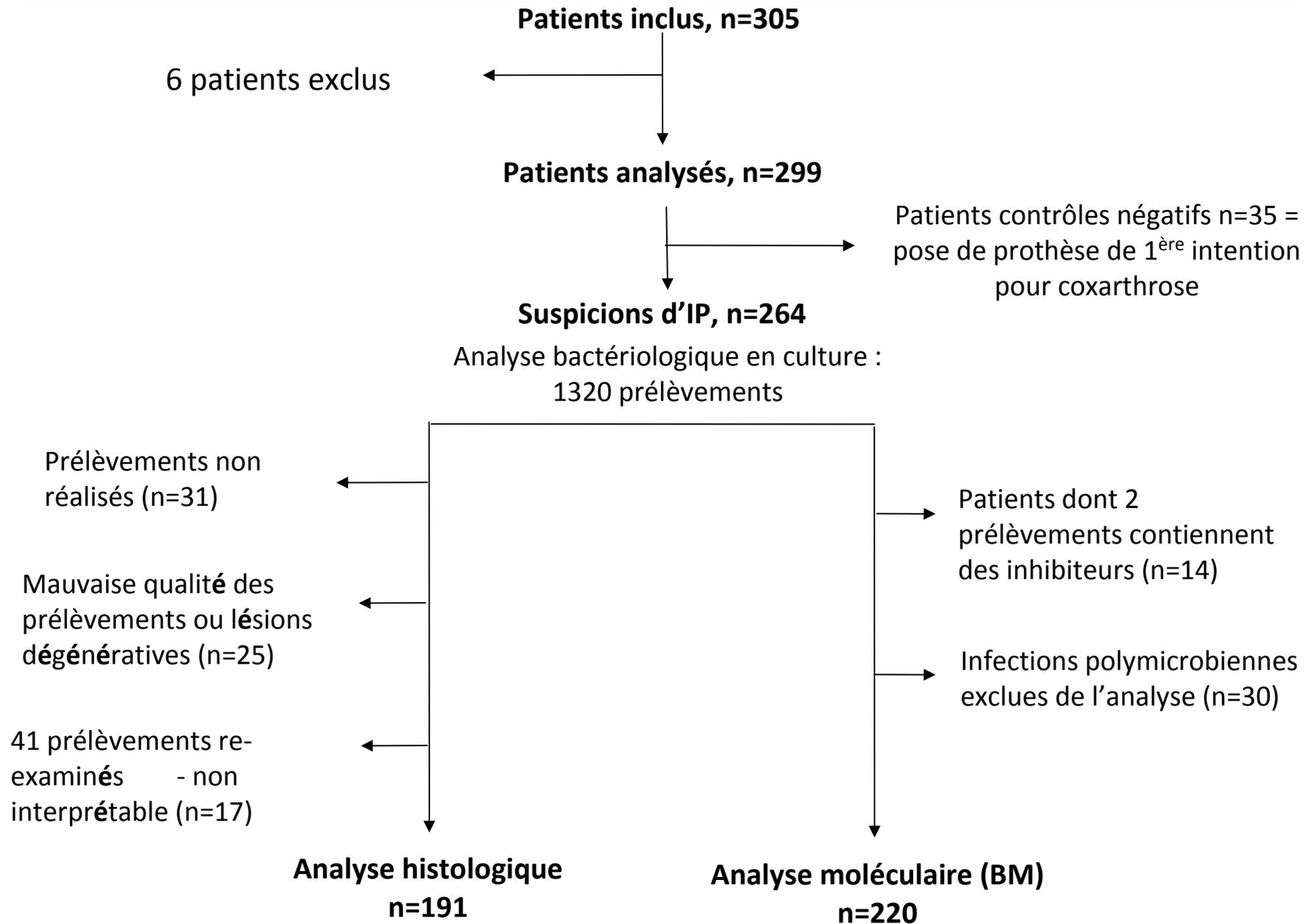
Type II : réaction inflammatoire dominée
par les polynucléaires neutrophiles
⇒ correspond à une **infection péri-prothétique**

Type III : mélange des types I et II
⇒ **associé majoritairement à une infection**

Type IV : tissu fibreux riche en vaisseaux, exsudat fibrineux
Rares polynucléaires neutrophiles
⇒ tissu de **nature cicatricielle**

Morawietz L et al. Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. J Clin Pathol. 2006; J Orthop Surg Res 2008

Répartition des inclusions



Description des patients à l'inclusion

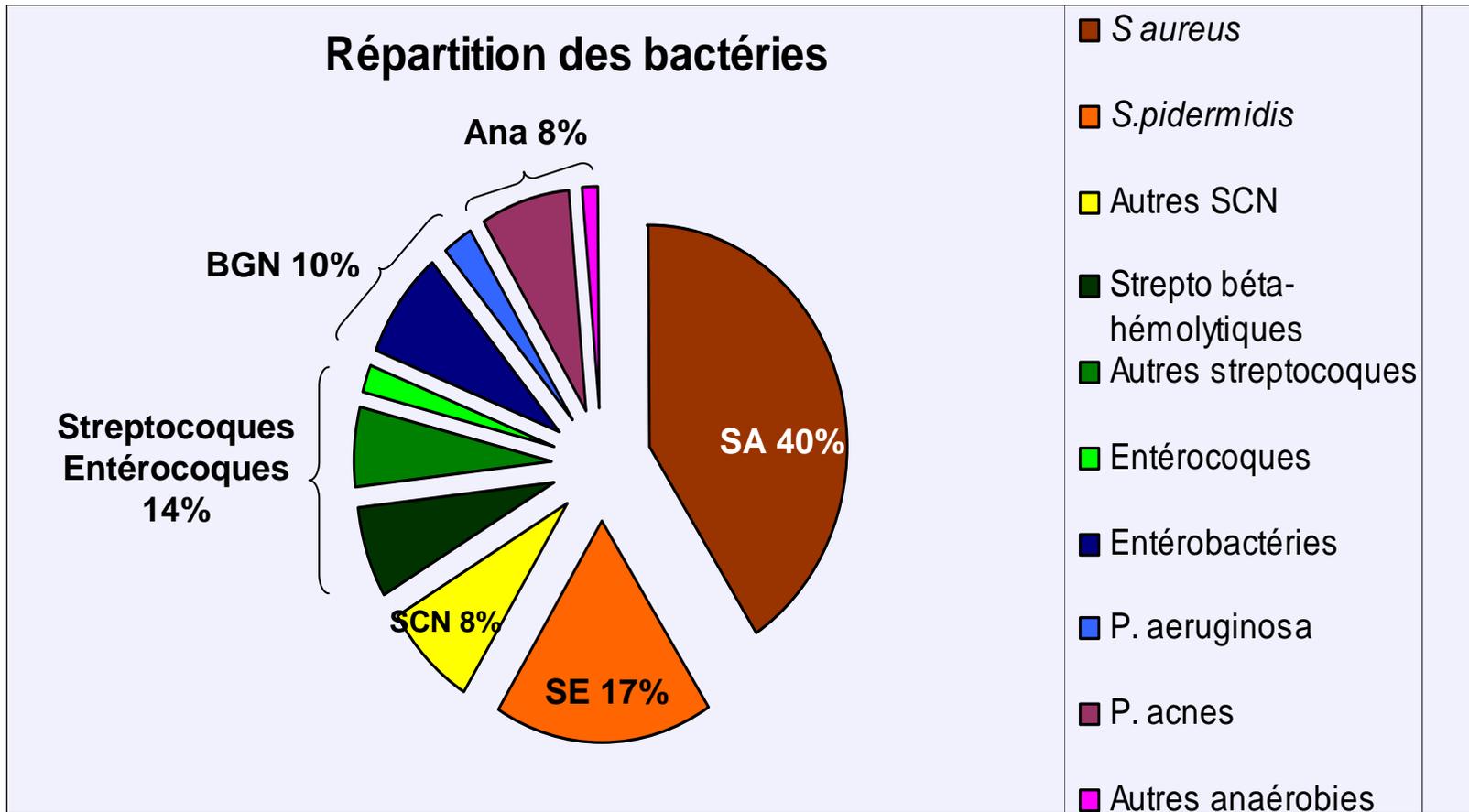
Variables	Controls n=35, n (%)	Suspicion d'IP n=264, n (%)
Age, médiane en années (interquartile range)	70 (63-77)	73 (63-79)
Sexe		
Masculin	23 (66)	127 (48)
Féminin	12 (34)	137 (52)
Localisation de la prothèse		
Hanche	23 (66)	165 (62.5)
Genou	12 (34)	88 (33)
Epaule/coude	0/0	10 (4), 1 (0.5)
Présentation de l'infection		
Précoce	0	50 (19)
Retardée ou tardive	0	214 (81)
Signes péri opératoires en faveur d'une infection		144 (54.5)
Fistule au contact de la prothèse	0	23 (9)
Pus dans l'articulation ou au contact de la prothèse	0	87 (33)
Fistule et pus	0	34 (13)
Antibiothérapie au cours des 15 jours précédant la chirurgie	0	76 (29)

Critères cliniques et bactériologiques

- ❑ **Infection certaine ou probable : 208/264 (78%)**
 - ❑ Critères clinique et bactériologique : 121
 - ❑ Critère bactériologique seul : 68
 - ❑ Critère clinique seul : 19

- ❑ **IP bactériologiquement documentée : 189/208 (91%)**
 - ➡ ❑ Monomicrobienne : 84% (159/189)
 - ❑ Polymicrobienne : 16% (30/189)

Répartition des bactéries dans les infections monomicrobiennes



Apport de l'histologie dans le diagnostic des IP

		Infection		
		Certaine ou probable	Exclue	Total
Critère histologique de Morawietz	Présent	SE 85% 128*	SP 93% 3	131
	Absent	23	37	60
		151	40	191

*74 avec les 2 critères, 44 avec critère bactériologique uniquement, 10 avec critère clinique uniquement

Classification de Morawietz	Nombre de polynucléaires neutrophiles par champ			Total
	< 1	≥ 1 and <5	≥ 5	
Type I	39	3	0	42
Type IV	16	2	0	18
Type II	0	10	82	92
Type III	0	3	36	39
Total	55	18	118	191

Apport de la PCR16S dans le diagnostic des IP

		Infection		
		Certaine ou probable	Exclue	Total
Critère moléculaire	Présent	SE 68% 117*	SP 94% 3	120
	Absent	56	44	100
		173	47	220

*81 avec les 2 critères, 29 avec critère bactériologique uniquement, 7 avec critère clinique uniquement

« discordances » résultats de culture et de BM

- ➔ **10 patients étaient négatifs en culture et positifs en PCR : tous traités**
 - ➔ 7 avaient une infection certaine ou probable; étaient sous ATB
 - ➔ 3 étaient des infections exclues → étaient sous ATB
 - 2 patients : ATB des mois auparavant
 - 1 patient encore traité le jour de la chirurgie
- ➔ **56 IP certaines ou probables, négatives en PCR :**
 - ✓ 40 IP avec 1 critère bactériologique
 - ❑ 30 (75%) IP à bactéries cutanées (STACN 20, *P. acnes* 8); parmi ces 30, 18 avaient 1 ou 2 prélèvements + en BM (exclues car <3)
 - ❑ 10 IP à germes virulents (SA, *Pyo*, entérobactéries..)
 - ✓ 16 IP avec 1 critère clinique seul : 8/16 étaient sous ATB dans les 15j précédant la chirurgie

Discussion - conclusion

- ❑ Le **broyage automatisé des prélèvements optimise au mieux la culture**
- ❑ **Faible sensibilité du critère clinique**, absent dans 1/3 des IP documentées bactériologiquement (68/208)
- ❑ **L'histologie est une étape importante** dans le diagnostic d'IP
 - Pas de supériorité de la classification de Morawietz
 - Préférer le compte de PNN, **avec un seuil de 5 PNN/champ**
- ❑ **Pas d'indication de la PCR 16S en première intention**
 - Sauf chez les patients traités-cultures négatives
 - Etablir un critère moléculaire, similaire au critère bactériologique:
 - Aisé pour les germes virulents, difficile pour la flore cutanée : 2P+ ?
- ❑ **A venir...**
 - Analyse bactériologique des résultats de MICROBIOS
 - Milieux de culture (hémocultures...), numération bactérienne...
 - MICROBIOS 2
 - Intérêt des PCR spécifiques en première intention

Investigateurs

- ❑ **Investigateur coordonnateur** : P. Bémer
- ❑ **Co-investigateurs** :
 - Angers : J. Cottin, C. Lemarié, M. Kempf
 - Brest : D. Tande, G. Héry-Arnaud
 - Nantes : S. Corvec, S. Gibaud
 - Orléans : L. Bret, A. Guigon
 - Poitiers : C. Burucoa, C. Plouzeau-Jayle
 - Rennes : A. Gougeon, P. Vincent
 - Tours : AS. Valentin, L. Bernard, G. de Pinieux
- ❑ **Méthodologistes** : J. Léger, M.E. Juvin, B. Giraudeau, C. Coffre
- ❑ **Attachées de recherche clinique** : K. Fèvre, L. Happi

Collaborateurs associés

- ❑ Angers : C. Quinqueneau, P. Bizot, MC. Rousselet
- ❑ Brest : S. Rozec, R. Gérard, I. Quentin-Roué
- ❑ Nantes : R. Boisson, A. Guilloux, S. Touchais, A. Moreau
- ❑ Orléans : J. Guignard, F. Razanabola, P. Michenet
- ❑ Poitiers : AS. Cognée, LO. Gayet, S. Milin
- ❑ Rennes : P. Gautier, JL. Polard
- ❑ Tours : R. Quentin, P. Rosset