

**MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE  
MÉDICALE**

Soutenu devant le jury

le 4 Juillet 2016

par **M<sup>lle</sup> Damasie MALANDAIN**

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

**THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Evaluation d'une PCR multiplexe combinée  
pour la détection rapide des bactéries directement  
à partir des prélèvements ostéo-articulaires broyés.**

**Président :**

**Madame le Pr. Nathalie CAROFF**, Professeur de Bactériologie  
Faculté de Pharmacie – Nantes

**Membres du jury :**

**Monsieur le Pr. François GOUIN**, Professeur de Chirurgie Orthopédique  
Faculté de Médecine – Nantes

**Monsieur le Pr. David BOUTOILLE**, Professeur de Maladies Infectieuses et Tropicales  
Faculté de Médecine – Nantes

**Madame le Dr. Pascale BEMER**, Praticien Hospitalier de Bactériologie  
CHU – Nantes

**Madame le Dr. Aurélie GUILLOUZOUIC**, Praticien Hospitalier de Bactériologie  
CHU – Nantes

**Monsieur le Dr. Stéphane CORVEC**, Maître de Conférences de Bactériologie  
Faculté de Médecine – Nantes (Directeur de Thèse)

## Remerciements

En préambule de ce travail, je tiens à remercier :

### **Mon jury de thèse,**

**Madame le Professeur Nathalie Caroff**, vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

**Monsieur le Docteur Stéphane Corvec**, pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Merci de m'avoir impliquée dans un projet aussi intéressant et de m'avoir initiée à ce monde rigoureux et exigeant qu'est la recherche. Je vous remercie pour votre soutien, votre patience, votre entière disponibilité et vos nombreuses corrections.

**Monsieur le Professeur François Guin**, pour votre aide dans le recrutement des patients consultants en Orthopédie. Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de juger ce travail.

**Monsieur le Professeur David Boutoille**, pour me faire l'honneur et la gentillesse de participer à mon jury de thèse. Merci de m'avoir intégrée dans votre service et m'avoir faite confiance en m'impliquant dans divers projets.

**Madame le Docteur Pascale Bémer**, pour avoir accepté de juger ce travail, pour m'avoir fait confiance pour mener ce projet, pour vos enseignements et votre bienveillance pendant ces semestres.

**Madame le Docteur Aurélie Guillouzouic**, pour avoir accepté de juger ce travail. Merci pour m'avoir encadrée pendant mon internat.

### **Ceux qui m'ont fait profiter de leurs connaissances et de leurs expériences tout au long de mon Internat et de la réalisation de ce projet,**

Je tiens à remercier l'équipe de la société Curetis® pour leur confiance pour mener à bien ce projet. Julie Léger pour ses aides statistiques et méthodologiques. La CRIOGO study team pour leurs différents avis critiques sur l'interprétation des résultats et pour m'avoir fait parvenir le devenir des patients de chaque CHU.

Je remercie toute l'équipe du Service Bactériologie-Hygiène du CHU de Nantes. A tous les biologistes qui ont eu la patience de nous inculquer les subtilités de la Bactériologie. Aux techniciens, pour leur bonne humeur et leur aide. Je remercie mon acolyte, Anne-Gaëlle, d'avoir avancer mes manip lorsque j'étais en Inter-CHU.

Je remercie également l'équipe du Service Microbiologie du CHU de Caen, pour leur accueil, leur convivialité et leur professionnalisme. J'ai hâte de vous retrouver.

Merci également aux Docteurs Kalyane Bach-Ngohou et Matthieu Grégoire, ainsi qu'au Professeur Vincent Cattoir pour nos collaborations fructueuses lors de divers projets.

### **Ma famille,**

Une pensée pour mon père et ma grand-mère, qui j'espère, seraient fiers de moi aujourd'hui.

A ma mère et Alain, merci pour l'amour, le soutien et le goût de la réussite que vous m'avez toujours apportés.

A ma sœur, tu es toujours là pour moi quoi qu'il arrive et Yohan, merci pour l'aide informatique ! A ma petite nièce et filleule, Alycia, je te transmettrai mon goût des études.

A mon grand-père, merci pour ton amour. Nous sommes là pour toi maintenant.

A ma belle famille, vous êtes géniaux, merci de m'avoir accueillie parmi vous avec autant de gentillesse.

### **Mes amis internes et anciens internes en Biologie Médicale de Nantes et de Caen,**

Merci à tous. A mes co-internes sans qui mes semestres n'auraient pas été aussi agréables et tout particulièrement, à Anne-Gaëlle, Elsa, Sophie, Manue, Marion, Matt Greg, Iris, Olivier, Arnaud, Aurélie, Pauline, Lydie, Benjamin, Mathilde, Clément.

### **Mes amis de longues dates qui ne comprenaient pas toujours dans quelles études je m'étais embarqués,**

Merci à Aurélie et François, Camille et Antoine, Clémence, Emilie, Fleur, Christophe, Céran, Julien, Charlotte et Mathieu.

### **Ma plus belle rencontre,**

Germain, tu es ce qui m'est arrivé de mieux, merci d'être là chaque jour...

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>10</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>11</b>
<b>1<sup>ère</sup> partie : Revue bibliographique .....</b>	<b>13</b>
I. Les infections ostéo-articulaires .....	14
I.1. Physiopathologie.....	14
I.1.1. Portes d'entrée.....	14
I.1.2. Physiopathologie de l'infection osseuse .....	15
I.1.3. Site de l'infection.....	17
I.1.4. Facteurs favorisants .....	17
I.2. Les différents types d'infections ostéo-articulaires .....	21
II. Les infections ostéo-articulaires sur matériel .....	21
II.1. Définition des infections ostéo-articulaires complexes .....	21
II.2. Incidence .....	23
II.3. Epidémiologie .....	24
II.4. Facteurs de risques.....	25
II.5. Impact sociétal.....	26
II.6. Particularités des IOAM .....	27
II.6.1. Immunodépression locale.....	27

II.6.2.	<i>Substratum</i> .....	27
II.6.3.	Biofilm.....	27
II.6.4.	Small Colony Variants .....	29
II.7.	Classification des infections sur prothèses .....	30
II.7.1.	IOAM précoces et retardées .....	31
II.7.2.	IOAM tardives.....	31
III.	Diagnostic des IOAM .....	32
III.1.	Diagnostic clinique .....	33
III.1.1.	Tableaux cliniques .....	33
III.1.2.	Imagerie.....	33
III.2.	Diagnostic histologique .....	36
III.3.	Diagnostic biologique.....	37
III.4.	Diagnostic microbiologique classique par culture .....	38
III.4.1.	Etape pré-analytique.....	38
III.4.2.	Etape analytique .....	40
III.4.3.	Interprétation des résultats.....	43
III.5.	Nouvelles méthodes diagnostiques biologiques .....	45
III.6.	Nouvelles méthodes diagnostiques microbiologiques .....	48
III.6.1.	Apport du broyage des prélèvements per-opératoires .....	48
III.6.2.	Apport du pré-traitement par le dithiothreitol (DTT) .....	49
III.6.3.	Apport de la sonication des matériels prothétiques .....	50
III.6.4.	Apport de l'ensemencement en flacon d'hémoculture.....	53
III.6.5.	Apport de culture du sonicat en flacon d'hémoculture.....	54

III.6.6.	Apport de l'incubation prolongée.....	55
III.6.7.	Apport de l'identification par spectrométrie de masse type MALDI-TOF .....	55
III.7.	Nouvelles méthodes diagnostiques moléculaires.....	56
III.7.1.	Apport de la PCR ARN16S.....	57
III.7.2.	Apport de la technologie GeneXpert®.....	59
III.7.3.	Apport des PCR spécifiques .....	61
III.7.4.	Apport des PCR multiplexes spécifiques .....	62
III.7.5.	Apport des puces à ADN .....	65
<b>2<sup>ème</sup></b>	<b>partie : Etude expérimentale.....</b>	<b>66</b>
I.	Objectif .....	67
II.	Matériels et méthodes.....	68
II.1.	Caractéristiques des prélèvements sélectionnés pour l'étude .....	68
II.2.	Culture .....	69
II.3.	PCR 16S.....	70
II.4.	PCR multiplexe Curetis® .....	71
II.4.1.	Principe de fonctionnement de l'automate.....	71
II.4.2.	Principe de fonctionnement des cartouches.....	73
II.4.3.	Méthodologie de l'étude.....	75
III.	Résultats .....	77
III.1.	Résultats obtenus par culture après broyage.....	77
III.2.	Résultats obtenus par PCR multiplexe Curetis® .....	77
III.2.1.	Concordances .....	78

III.2.2. Discordances .....	80
III.2.3. Détection des gènes de résistance .....	87
III.2.4. Panel.....	87
III.2.5. Echechs de chambres .....	88
III.2.6. Concordance PCR Curetis®/PCR 16S .....	88
<b>3<sup>ème</sup> partie : Discussion.....</b>	<b>90</b>
Conclusions - Perspectives .....	99

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Coupe sagittale d'un os long.....	15
Figure 2 : Evolution d'une ostéomyélite aigüe. ....	16
Figure 3 : Répartition des CRIOAC en France métropolitaine. ....	23
Figure 4 : Evolution du nombre de poses et de révisions de prothèse de hanche/genou aux Etats-Unis entre 2005 et 2030. ....	26
Figure 5 : Biofilm à la surface d'un implant.....	27
Figure 6 : Cycle de développement du biofilm.....	28
Figure 7 : Vue en microscopie électronique d'un biofilm produit par <i>Staphylococcus epidermidis</i> sur du matériel étranger. ....	28
Figure 8 : SCV et phénotype normal de <i>S. lugdunensis</i> isolés à partir d'un même échantillon. ....	30
Figure 9 : Fréquences des infections sur prothèse per-opératoires et hématogènes après implantation primaire. ....	31
Figure 10 : Différents types de membrane péri-prothétique.....	37
Figure 11 : Broyeur disperseur Ultra turrax® .....	48
Figure 12 : Broyeur à billes Retsch® .....	48
Figure 13 : Effet du DTT sur les ponts disulfures. ....	49
Figure 14 : Exemple de boîte de transport stérile. ....	50
Figure 15 : Schéma de déroulement de la sonication. ....	51
Figure 16 : Schéma expliquant le principe de la sonication. ....	51
Figure 17 : Nombre d'isolats positifs dans un ou deux flacons d'hémoculture selon le type d'organisme. ....	54
Figure 18 : Principe de fonctionnement de la technologie MALDI-TOF .....	56
Figure 19 : Exemple de cartouche et d'automate GeneXpert® .....	61
Figure 20 : Algorithme décisionnel en cas de cultures négatives ou non contributives.....	62
Figure 21 : Panel de la PCR maison utilisée avec les gènes d'intérêt correspondants.....	63
Figure 22 : Panel de la PCR multiplexe SeptiFast® Roche Diagnostics.....	64
Figure 23 : Panel Seeplex Sepsis® screening assay .....	64
Figure 24 : Panel de la technologie Prove-it® Sepsis.....	65
Figure 25 : Algorithme des prélèvements randomisés et analysés.....	69
Figure 26 : Présentation du Lysator, du Cockpit et de l'Analyzer du système Unyvero Curetis®, de droite à gauche.....	72
Figure 27 : Mode opératoire du système Unyvero Curetis®.....	72
Figure 28 : Exemple d'une cartouche ITI (Implant and Tissue Infection) Curetis®.....	73
Figure 29 : Arbre décisionnel représentant la méthodologie utilisée pour l'analyse des résultats. ....	76
Figure 30 : Algorithme des résultats obtenus. ....	79
Figure 31 : Histogramme représentant les espèces positives en Culture et Curetis®. ....	83
Figure 32 : Proposition d'arbre décisionnel pour le diagnostic microbiologique des IOAP. ....	100

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Micro-organismes responsables d'infection sur prothèse. ....	24
Tableau 2 : Micro-organismes responsables d'infection sur prothèse dans le CRIOGO.....	25
Tableau 3 : Classification des infections en fonction de leur délai de survenue. ....	31
Tableau 4 : Place de la radiographie standard dans le diagnostic infectiologique. ....	34
Tableau 5 : Place du scanner dans le diagnostic infectiologique.....	34
Tableau 6 : Place de l'IRM dans le diagnostic infectiologique. ....	35
Tableau 7 : Critères d'infection de MSIS 2011.....	44
Tableau 8 : Critères d'infection de l'IDSA 2012.....	44
Tableau 9 : Critères d'infection de ICM 2013 .....	45
Tableau 10 : Tableau récapitulatif des différentes recommandations d'experts concernant l'interprétation des cultures.....	45
Tableau 11 : Bilan de la littérature concernant la sonication et le diagnostic des IOAP.....	52
Tableau 12 : Tableau comparatif des différentes études sur le diagnostic par PCR 16S des IOAP.....	59
Tableau 13 : Comparaison des différentes études menées pour évaluer les performances de la technologie GeneXpert® MRSA/SA SSTI.....	59
Tableau 14 : Liste des micro-organismes détectés intégrés au panel du système Unyvero ITI Curetis®.....	74
Tableau 15 : Liste des gènes de résistance intégrés au panel du système Unyvero ITI Curetis®.....	74
Tableau 16 : Distribution des pathogènes et gènes de résistance détectés par chambre dans la cartouche ITI Curetis®.....	75
Tableau 17 : Concordance des résultats de Curetis® confrontés à ceux de la culture. ....	78
Tableau 18 : Analyse des résultats discordants. ....	80
Tableau 19 : Détails des résultats pour les dix prélèvements Culture négative/Curetis® positif.....	81
Tableau 20 : Pourcentage d'échantillons positifs en Curetis® en fonction de la nature de prélèvements. ....	82
Tableau 21 : Pourcentage d'échantillons positifs en Curetis® en fonction du nombre de milieux de culture positifs.....	82
Tableau 22 : Pourcentage d'échantillons positifs en Curetis® en fonction du nombre de colonies par milieu solide.....	82
Tableau 23 : Pourcentage d'échantillons positifs en Curetis® en fonction de la vitesse de pousse. ....	83
Tableau 24 : Détails des résultats pour les 13 prélèvements Culture positive/Curetis® positif/Discordants. ....	85
Tableau 25 : Détails des résultats pour les 3 prélèvements Culture positive/Curetis® positif/Confusions. ....	86
Tableau 26 : Pathogènes retrouvés en culture et absents du panel. ....	88

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DesoxyriboNucléique  
ARN : Acide RiboNucléique  
Bbp : Bone sialoprotein-Binding Protein  
BGN : Bacilles à Gram négatif  
BLSE :  $\beta$ -Lactamase à Spectre Elargi/Etendu  
CRIOGO : Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest  
CRP : Protéine C-Réactive  
EBJIS : European Bone & Joint Infection Society  
ICM : International Consensus Meeting  
IDSA : Infectious Diseases Society of America  
IOA : Infections Ostéo-Articulaires  
IOAC : Infections Ostéo-Articulaires Complexes  
IOAM : Infections Ostéo-Articulaires sur Matériel  
IOAP : Infections Ostéo-Articulaires sur Prothèse  
MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight  
MSCRAMMS : Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules  
MSIS : Musculoskeletal Infection Society  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PCT : ProCalciTonine  
PHRC : Programme Hospitalier de Recherche Clinique  
PTG : Prothèse Totale de Genou  
PTH : Prothèse Totale de Hanche  
PVL : Leucocidine de Panton Valentine  
RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire  
SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative  
SCV : Small Colony Variant  
SPILF : Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française  
TSST1 : Toxic Shock Syndrome Toxin-1  
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine  
VPN : Valeur Prédictive Négative  
VPP : Valeur Prédictive Positive  
VS : Vitesse de Sédimentation

## Introduction

Les infections ostéo-articulaires (IOA) rassemblent une extrême diversité de situations cliniques. Ce sont des infections graves conduisant à une mortalité et une morbidité importantes (1). Leur prise en charge demeure complexe. Elle repose sur une organisation multidisciplinaire de la prise en charge chirurgicale, microbiologique et thérapeutique des patients. Malgré l'optimisation des procédures d'antibioprophylaxie et la lutte contre les infections associées aux soins, le risque d'infection au niveau d'une prothèse persiste. Il est supérieur à 1 % pour les prothèses totales de hanche et de l'ordre de 2 % pour celles de genou (2). En raison de l'augmentation du nombre de prothèses posées (3), la population touchée par ces infections ne cesse et ne cessera de croître. Dans ce contexte, le diagnostic parfois difficile constitue un véritable enjeu (4).

Ce diagnostic implique nécessairement la microbiologie. La méthode de référence utilisée au laboratoire reste aujourd'hui la culture. Cet examen de Biologie Médicale est basé sur un faisceau d'arguments. Il nécessite le plus souvent des prélèvements per-opératoires multiples et étagés, pour un même patient. La mise en évidence de la ou des bactéries en cause est obtenue par mise en culture de prélèvements liquidiens, tissulaires et osseux. Un antibiogramme est réalisé, le plus précocement possible, afin de permettre au clinicien d'adapter l'antibiothérapie.

La culture des prélèvements per-opératoires a montré son efficacité. En effet, en cas de broyage préalable, 89 % des prélèvements sont retrouvés positifs en culture, lorsque l'infection est avérée cliniquement (5). Cependant, dans 10-15 % des cas, cette méthode peut manquer de sensibilité en raison de la possible présence de bactéries à croissance lente voire difficile (6), ou bien lors d'infection décapitée par une antibiothérapie préalable (2). La mise en évidence par culture des bactéries impliquées dans un sepsis osseux demeure parfois encore longue. En effet, 48 à 72 heures au minimum sont nécessaires pour l'identification de la souche et l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques. Ce délai peut s'allonger à plusieurs jours voire une à deux semaines pour des micro-organismes à croissance lente comme les bactéries anaérobies.

Pour pallier à ces limites, des techniques pré-analytiques ont été développées : l'ensemencement des prélèvements per-opératoires en flacons d'hémoculture (7) ou la

sonication des prothèses (8)(9). Enfin, différentes techniques de biologie moléculaire permettent de détecter l'ADN bactérien directement à partir du prélèvement clinique initial, telles que les puces à ADN, la Polymerase Chain Reaction (PCR) universelle 16S ou les PCR spécifiques (10)(11).

Le laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse s'intéresse depuis de nombreuses années aux IOA. Dans le cadre d'un Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC), une cohorte importante « MICROBIOS I » (5) a été constituée afin de comparer la méthode dite « de référence » (diagnostic par culture après broyage mécanique) à une méthode de biologie moléculaire, la PCR universelle. Une sensibilité de l'ordre de 70 % pour la PCR dite 16S a été rapportée (5).

Nous avons eu l'opportunité de tester une stratégie innovante de PCR multiplexe combinée dans le but d'accroître cette sensibilité. Ce kit commercialisé par la société Curetis® est capable de détecter rapidement la présence de bactéries et/ou levures. Il détecte également certains gènes de résistances aux antibiotiques, directement à partir des prélèvements.

L'objectif de ce travail était d'évaluer la faisabilité, les performances et la concordance des résultats obtenus par cette technique semi-automatisée de PCR multiplexe, dans le cadre des infections ostéo-articulaires sur prothèse (IOAP), en l'absence de gold standard.

Après une présentation des IOA, nous insisterons sur les IOAP, ainsi que sur les différentes techniques de diagnostic possibles au laboratoire avant de présenter les résultats de nos travaux utilisant cette nouvelle technologie.

Enfin, nous discuterons les résultats obtenus, le niveau de concordance et la place de ce nouveau type d'outils dans la prise en charge de ces infections dont les coûts et la morbidité ne sont pas négligeables.

## **1<sup>ère</sup> partie : Revue bibliographique**

## **I. Les infections ostéo-articulaires**

Les IOA rassemblent une extrême diversité de situations cliniques en fonction du site ostéo-articulaire atteint, du ou des micro-organismes en cause, du terrain et de la présence ou non de matériel étranger. Leur évolution est d'ailleurs très variable. Cette thèse se focalise sur les infections sur prothèse mais il convient d'abord de décrire les différents éléments qui favorisent la survenue des infections osseuses.

### **I.1. Physiopathologie**

Quel que soit son mode d'expression, une IOA doit toujours être considérée comme une infection grave pouvant engager à un stade précoce le pronostic vital, et à un stade tardif, le pronostic fonctionnel, avec un passage possible à la chronicité.

#### ***I.1.1. Portes d'entrée***

En général, les micro-organismes peuvent infecter l'os par l'une des trois voies suivantes :

- par voie hématogène ;
- par effraction ;
- par contiguïté.

La dissémination par voie sanguine à partir d'un foyer septique à distance, au cours d'une bactériémie est le mode de contamination majoritairement rencontré (12). La cause de la dissémination hématogène n'est pas toujours évidente (geste chirurgical sur le foyer septique, endoscopie urologique ou gynécologique ; ou autres localisations du foyer septique : dentaire, sinusien, rhinopharyngé, cutané, urinaire, endocardique, ...) (13).

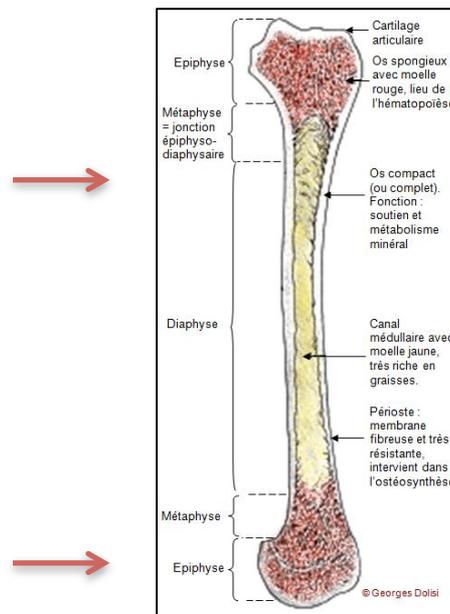
La dissémination par effraction est une inoculation directe du micro-organisme. Elle constitue la deuxième voie d'infection des IOA mais la plus fréquente pour les IOA sur Matériel (IOAM) (14). L'effraction peut être accidentelle ou iatrogène, médicale ou

chirurgicale, à la suite d'une plaie pénétrante, d'une ponction articulaire, d'une infiltration de corticostéroïdes, d'une arthroscopie, ou encore d'une arthrographie.

La dissémination par contiguïté d'un foyer septique (extension) est la propagation aux structures ostéo-articulaires voisines d'une infection des parties molles, suivant les territoires de drainage lymphatiques (cellulite, abcès, mal perforant plantaire,...).

### *I.1.2. Physiopathologie de l'infection osseuse*

L'os sain est un tissu bien vascularisé, hormis la région métaphysaire (Figure 1) qui est le lieu d'un ralentissement circulatoire, particulièrement chez l'adolescent.



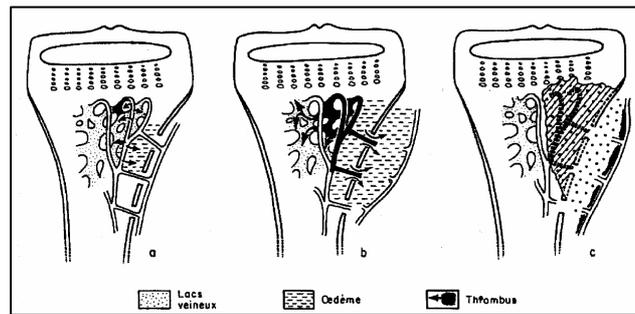
**Figure 1 : Coupe sagittale d'un os long.**

D'après [www.dictionnaire-medical.net](http://www.dictionnaire-medical.net)

Les flèches indiquent les parties de l'os où la circulation sanguine est ralentie.

En revanche, en cas d'infection et indépendamment du mode de pénétration, les bactéries déclenchent une réaction inflammatoire suppurée qui se développe soit dans la région sous-périostée (formant un abcès sous-périosté précoce qui évolue vers les parties molles), soit dans la cavité médullaire. Ces réactions s'accompagnent rapidement d'une hyperhémie diffuse (artériolaire, capillaire et veinulaire) responsable d'une augmentation du débit sanguin et de la perméabilité capillaire. Il s'ensuit une transsudation plasmatique responsable d'un œdème et d'une hyperpression locale (Figure 2, page 16).

Dans la cavité médullaire, ces réactions entraînent une compression des capillaires et des sinusoides, responsable de thromboses veineuses et artériolaires. L'ischémie provoque des zones d'infarcissement de la moëlle grasseuse et hématopoïétique qui évolueront secondairement vers la formation d'abcès bordés par une réaction d'ostéoporose. Les thrombi septiques peuvent être à l'origine de métastases, soit à distance, soit dans des territoires osseux de voisinage, expliquant la possibilité de pandiaphysite.



**Figure 2 : Evolution d'une ostéomyélite aiguë.**

D'après Métaizeau, <http://medecine-pharmacie.univ-rouen.fr>

a) Thrombose débutant au niveau d'une boucle capillaire métaphysaire et entraînant un œdème en amont.

b) Extension de la thrombose le long des vaisseaux : décollement du périoste et suppression de son apport vasculaire.

c) Apparition du pus et nécrose du territoire dévascularisé, formation du séquestre, et apparition des premières lamelles osseuses sous le périoste décollé.

Plus tardivement, des foyers de nécrose osseuse se constituent. Les petits foyers, toujours nombreux, peuvent être résorbés par l'action des ostéoclastes. Si le fragment d'os nécrosé est plus volumineux, la résorption est impossible et il se forme un séquestre osseux septique, première étape du passage à la chronicité. Ces réactions se produisent très rapidement. L'expérimentation animale montre qu'en 72 heures une ostéomyélite aiguë staphylococcique peut, en l'absence d'un traitement antibiotique efficace, avoir constitué des séquestres (15). Au contact des séquestres, le périoste réagit en produisant un os neuf. Cette réaction de néo-ostéogénèse peut atteindre une épaisseur considérable. Dans les ostéomyélites chroniques, cet os néoformé est creusé de multiples cavités comportant de petits séquestres dans lesquels des bactéries vivantes peuvent persister indéfiniment. En parallèle, l'accumulation de pus dans la cavité articulaire va entraîner une distension capsulaire qui interfère avec la nutrition du cartilage, induisant l'apoptose de nombreux chondrocytes. Ce processus enzymatique de destruction chondrocytaire persiste longtemps, même après stérilisation de l'articulation par un traitement antibiotique. Enfin, à partir de ces foyers abcédés, des trajets fistuleux vont se former à travers les parties molles pour tenter d'assurer un drainage qui reste toujours très insuffisant.

### ***1.1.3. Site de l'infection***

Tous les os peuvent être atteints, principalement les os longs, mais les IOA surviennent majoritairement au niveau des membres inférieurs, avec en premier lieu le genou puis la hanche. Au niveau de l'articulation, c'est la chondro-épiphyse, structure anatomique pluri-tissulaire située à chacune des deux extrémités d'un os long, qui se trouve au cœur de l'infection (arthrite septique). Son rôle est essentiel d'une part, car elle est porteuse du potentiel de croissance en longueur de l'os et, d'autre part, car son développement détermine également le volume et la forme de la surface articulaire. Il est donc aisé de comprendre la gravité des séquelles fonctionnelles notamment en termes de déséquilibre de croissance que peuvent engendrer les infections articulaires.

La métaphyse osseuse est la cible dans l'ostéomyélite aiguë. A l'extrémité des vaisseaux métaphysaires, le réseau vasculaire se termine en de fines boucles sinusoïdales, siège d'un important ralentissement circulatoire qui favorise la greffe bactérienne locale, en cas de bactériémie. De plus, le risque d'embolisation septique est maximal au niveau de la métaphyse des os longs, en raison d'un potentiel de croissance plus élevé et d'un réseau vasculaire développé en proportion.

Les IOA peuvent également survenir au niveau du rachis définissant les spondylodiscites. La structure des zones de croissances vertébrales est un peu différente de celle des chondro-épiphyses, mais la physiopathologie de ces infections reste similaire à celle des infections atteignant les membres.

### ***1.1.4. Facteurs favorisants***

Le développement de l'infection est multifactoriel et dépend de l'interaction entre l'agent pathogène et les réactions de défense de l'organisme.

#### **a. Facteurs de l'hôte**

Toutes les bactériémies physiologiques n'aboutissent pas à une IOA. Les processus physiopathologiques dépendent, non seulement de la virulence et de l'inoculum bactérien,

mais également de facteurs locaux et généraux, comme le statut circulatoire et les défenses immunitaires de l'hôte. Les facteurs généraux reconnus comme favorisant la survenue d'une IOA sont de manière non exhaustive : le diabète, l'éthylisme chronique, un âge supérieur à 60 ans, la toxicomanie, et l'immunodépression qui peut être d'origine pathologique (VIH) ou iatrogène (corticothérapie à fortes doses et/ou prolongée, chimiothérapie anti-cancéreuse,...) (16). Une IOA peut donc survenir sur un os ou une articulation antérieurement sains, ou compliquer l'évolution d'une articulation antérieurement lésée par un processus dégénératif (arthrose, rhumatisme inflammatoire comme la polyarthrite rhumatoïde, tendinopathie), par une chirurgie (traumatisme articulaire, mise en place d'un matériel prothétique articulaire), ou par un microtraumatisme sans effraction (17). La polyarthrite rhumatoïde est l'élément le plus fréquemment retrouvé, probablement car elle associe plusieurs facteurs de risque, à savoir des atteintes articulaires et un traitement immunosuppresseur (16). En effet, l'incidence des arthrites septiques est multipliée par un facteur d'environ dix chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, mais aussi chez ceux porteurs d'une prothèse articulaire (17). En pédiatrie, quelques particularités physiopathologiques peuvent expliquer certaines spécificités des IOA qui les différencient nettement des infections retrouvées chez l'adulte (18). Tout d'abord, un mode d'inoculation principalement bactériémique dont les agents sont variables selon l'âge, alors que chez l'adulte la contamination est plus souvent traumatique ou chirurgicale et survient sur des terrains particuliers (diabète, prothèse, maladie rhumatismale) (19). Le jeune nourrisson présente une anatomie vasculaire et tissulaire qui favorise l'extension articulaire (anastomoses entre les réseaux métaphysaire et épiphysaire) expliquant la prédominance de ces infections avant l'âge de cinq ans. Toutefois, le pronostic des IOA chez l'enfant est globalement bon car un terrain généralement sain et un os richement vascularisé permettant la diffusion des antibiotiques réduisent le risque d'échec thérapeutique et le passage à la chronicité (moins de cinq pour cent des cas) (19). A l'opposé, l'évolution est plus souvent médiocre chez l'adulte, avec un passage fréquent à la chronicité, la survenue d'abcès et de séquestres intra-osseux dont la prise en charge est alors chirurgicale (2).

## b. Facteurs bactériens

Parmi les micro-organismes pathogènes, *Staphylococcus aureus* prédomine largement dans les étiologies des IOA et est également celui qui a été le plus étudié, essentiellement dans des modèles expérimentaux. C'est donc pour *S. aureus* que les facteurs de virulence sont les plus connus, mais ils peuvent également être présents chez d'autres espèces bactériennes.

La première étape déterminante de l'infection est l'adhérence initiale de la bactérie aux tissus de l'hôte grâce à des récepteurs bactériens appelés adhésines. Chez *S. aureus*, plusieurs de ces molécules d'attachement regroupées sous l'acronyme de MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) sont exprimées à la surface. Ces adhésines lui permettent de se lier aux protéines de la matrice extracellulaire telles que le fibrinogène, la fibronectine, le collagène, mais aussi la vitronectine, la laminine, la thrombospondine, la sialoprotéine osseuse, l'élastine, ou le facteur Willebrand (20). La sialoprotéine osseuse n'est retrouvée que dans la matrice extracellulaire de l'os, ce qui pourrait expliquer la spécificité de cette localisation. En effet, il a été montré que les souches de *S. aureus* isolées de patients atteints d'ostéomyélite ou d'arthrite septique et inoculées à des souris, se lient à la sialoprotéine osseuse avec une affinité bien supérieure à celle des souches provenant de patients infectés au niveau d'autres sites ou infectés à *Staphylococcus epidermidis*. Ces souches de *S. aureus* expriment en fait une protéine particulière appelée Bbp (Bone sialoprotein-Binding Protein) qui lie la sialoprotéine osseuse et qui appartient à la même famille de molécules que les MSCRAMMs. Par ailleurs, des récepteurs à la laminine ont été mis en évidence chez *S. aureus* mais pas chez *S. epidermidis*, ce qui pourrait expliquer en partie, le moindre potentiel invasif de ce dernier (21).

En plus de ces protéines d'adhérence, *S. aureus* possède la capacité de survivre dans le cytoplasme des ostéoblastes et des cellules endothéliales après internalisation (synthèse d'exotoxines et d'hydrolases), lui permettant ainsi d'échapper à la phagocytose et aux antibiotiques (10).

La bactérie restée viable dans le compartiment intracellulaire peut alors induire une apoptose des cellules endothéliales. L'action d'autres protéines (protéine A, polysaccharide capsulaire, toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1), leucocidine de Pantou et Valentine (PVL), ...), lorsqu'elles sont présentes, a également un impact sur la fréquence de

survenue de l'IOA et sa sévérité (22).

Enfin, *S. aureus*, comme d'autres espèces de staphylocoques à coagulase négative (SCN) est capable de produire du biofilm. Ce biofilm représente l'ensemble des processus aboutissant à l'organisation et à la régulation d'une communauté bactérienne (23). Le «slime», substance polysaccharidique sécrétée par les bactéries, en est le premier composant ancrant définitivement l'adhérence bactérienne aux tissus de l'hôte. Le développement de micro-colonies engluées dans le slime est la deuxième étape. Cette structure se retrouve au sein d'une matrice polysaccharidique riche en eau, en ADN, en protéines et en molécules de signalisation. Des réseaux de communication intercellulaire se mettent alors en place et les signaux de passage en phase stationnaire de croissance (quiescence) peuvent conduire à l'apparition de variants micro-colonies, Small Colony Variants (SCV). Plusieurs études *in vitro* ont montré que cette phase de quiescence entraînait une réduction significative de la bactéricidie des antibiotiques. Les micro-colonies peuvent se maintenir ainsi de façon chronique au niveau de la matrice osseuse, à l'abri des défenses immunitaires et des antibiotiques, conduisant à une possible infection subaiguë voire à des rechutes infectieuses.

### c. La réponse immunitaire de l'hôte

Le système immunitaire va également participer aux lésions cellulaires par le recrutement de monocytes/macrophages et de polynucléaires neutrophiles lors de la réaction inflammatoire (21). En effet, ces cellules ont des effets bénéfiques qui permettent de réduire la mortalité due au sepsis en facilitant la clairance bactérienne (21). Néanmoins, elles vont aussi entraîner une intensification de la sévérité des atteintes articulaires, d'une part, en libérant des radicaux libres oxygénés et des protéases lysosomales et, d'autre part, en entretenant la production en cascade de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (21). Lorsque des superantigènes sont sécrétés par la bactérie (TSST-1, PVL, entérotoxines de *S. aureus*), la réponse inflammatoire de l'hôte se trouve accentuée, avec une proportion accrue de lymphocytes T activés (10)(21).

## **I.2. Les différents types d'infections ostéo-articulaires**

Différents types d'IOA existent, avec des portes d'entrée et des degrés de gravité différents. Certaines infections sont primitives. Elles regroupent deux grands types de pathologies différentes : les arthrites septiques, qui sont des infections des articulations et, les ostéomyélites, qui sont des infections des métaphyses ou des épiphyses au contact des cartilages de croissance. La distinction entre ces deux entités cliniques est habituelle mais une infection primitivement osseuse peut contaminer l'articulation, de même qu'une infection articulaire peut se compliquer d'une ostéomyélite.

D'autres infections sont secondaires. Les spondylodiscites, les infections de matériel orthopédique, infections post-traumatiques secondaires à une fracture ouverte ou les infections de pied diabétique appartiennent à ce groupe. Les IOAM, au cœur du sujet de cette thèse, seront développées lors du chapitre suivant.

## **II. Les infections ostéo-articulaires sur matériel**

### **II.1. Définition des infections ostéo-articulaires complexes**

Les Infections Ostéo-Articulaires Complexes (IOAC) recouvrent essentiellement les infections sur prothèse ou sur matériel d'ostéosynthèse (clou, plaque, vis, fixateur), les infections post-traumatiques (fractures ouvertes), le plus souvent poly-microbiennes et enfin, les infections osseuses chroniques (24). Elles mettent en jeu le pronostic fonctionnel, beaucoup plus rarement le pronostic vital. L'objectif d'une telle définition est triple (25) :

- l'orientation des patients atteints d'IOAC vers des structures adaptées, en raison de la gravité de l'infection ;
- l'accès à un tarif majoré pour ces structures identifiées (Z76 800) ;
- la possibilité de contrôle par l'assurance maladie sur des critères définis.

Une IOA est «complexe» en fonction de critères précis détaillés ci-dessous (25).

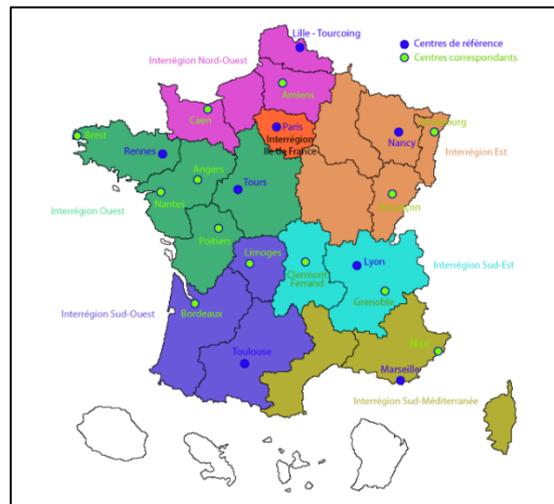
- Selon la prise en charge thérapeutique antérieure : Infection osseuse ou articulaire en échec d'une prise en charge thérapeutique médico-chirurgicale antérieure ayant

associé un geste chirurgical d'excision et une antibiothérapie.

- Selon le type de programme chirurgical :
  - . Situations chirurgicales nécessitant des gestes majeurs d'excision, de couverture, de reconstruction osseuse ou prothétique.
  - . Pseudarthrose infectée avec perte de substance nécessitant une reconstruction osseuse ou des parties molles.
  - . Ostéite sur os continu nécessitant une excision osseuse large ou une reconstruction osseuse ou des parties molles.
  - . Infection sur prothèse articulaire nécessitant une reconstruction complexe.
  - . Ostéoarthrite des grosses articulations (épaule, coude, poignet, hanche, genou et cheville) avec signes radiologiques d'atteinte osseuse, nécessitant une résection articulaire.
  - . Infection rachidienne, avec ou sans matériel, nécessitant une reconstruction osseuse.
  - . Exclusion : ablation de matériel en milieu septique, amputation en zone saine, synovectomie, excision des parties molles sans reconstruction.
  
- En raison de critères microbiologiques : la prise en charge par antibiothérapie est compliquée du fait d'un micro-organisme particulier ou d'une allergie aux antibiotiques limitant les possibilités thérapeutiques.
  
- En lien avec un terrain complexe : toute défaillance viscérale sévère interférant avec le programme thérapeutique (insuffisance rénale ou hépatique, immunodépression, polyopathologies...) ou avec un retentissement général chronique associé.

La prise en charge adéquate des IOA représente un enjeu majeur de Santé Publique. Elle fait partie des mesures inscrites dans les orientations nationales de lutte contre les infections associées aux soins et constitue également une préoccupation forte exprimée par des associations de malades et des usagers du système de Santé. Dans ce cadre, le Ministre en charge de la Santé s'est engagé à labelliser dès 2008 des centres de référence et, depuis 2011, des centres correspondants (Figure 3, page 23). Ainsi, la prise en charge des IOAC doit faire appel à plusieurs disciplines : Chirurgiens (orthopédique et plastique), Bactériologistes, Infectiologues, Radiologues, ainsi que les Anesthésistes, Rééducateurs fonctionnels,

Rhumatologues, Hygiénistes et Pharmaciens. Le Centre Hospitalier Universitaire de Nantes est ainsi centre associé au centre de référence de Tours, au sein du Centre de Référence Interrégional pour la prise en charge des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest (CRIOGO) (26).



**Figure 3 : Répartition des CRIOAC en France métropolitaine.**  
D'après Ochsner et al. (27)

## II.2. Incidence

Le remplacement d'une articulation par une prothèse, quel qu'en soit le motif, est de plus en plus fréquent lorsque celle-ci devient douloureuse ou fonctionnellement instable. En 2010, en France, ces interventions ont représenté 128843 arthroplasties de hanche et 66305 arthroplasties de genou (28). L'antibioprophylaxie adaptée et les blocs opératoires équipés de flux laminaires ont réduit les risques d'infection du site opératoire, après remplacement de la hanche et du genou, à respectivement moins de un et deux % (2). Toutefois, ce risque est susceptible d'augmenter de 20 %, lors d'une reprise ou d'une révision de prothèse. Malgré ces progrès considérables dans la prévention et le traitement de ces infections, le nombre absolu de patients dont la prothèse s'est infectée s'élève (3). Ces infections peuvent faire l'objet de complications, responsables d'une morbidité significative (1).

## II.3. Épidémiologie

Globalement, les principaux micro-organismes responsables d'infections sur prothèse de hanche ou de genou sont les SCN (30-43 %) et *S. aureus* (12-23 %), suivis par les streptocoques (9-10 %), les entérocoques (3-7 %), les bacilles à Gram négatif (BGN) (6-15 %) et les bactéries anaérobies strictes (2-4 %) (29)(30). Parmi les anaérobies, *Propionibacterium acnes* est considéré comme un pathogène émergent en particulier dans les infections ostéo-articulaires sur prothèse (IOAP) d'épaule (31). *Finnegoldia magna* est une autre bactérie anaérobie dit le « pathogène oublié » principalement retrouvé dans ce contexte d'IOAP (32). Des infections polymicrobiennes sont observées dans environ 10 % des cas. Ceci est résumé dans le Tableau 1 (29).

**Tableau 1 : Micro-organismes responsables d'infection sur prothèse.**

D'après Tande et Patel. (29)

	% patient avec IOA					
	Hanche et genou		Hanche	Genou	Epaule	Coude
	Toutes infections	Infections précoces				
<i>S. aureus</i>	27	38	13	23	18	42
SCN	27	22	30	23	41	41
<i>Streptococcus</i>	8	4	6	6	4	4
<i>Enterococcus</i>	3	10	2	2	3	0
BGN aérobie	9	24	7	5	10	7
Anaérobie	4	3	9	5		
- <i>Propionibacterium</i>					23	1
- Autres anaérobies					3	0
Culture négative	14	10	7	11	15	5
Polymicrobien	15	31	14	12	16	3
Autres germes	3					

L'épidémiologie du Grand Ouest a été étudiée lors de l'étude MICROBIOS I menée par Bémer et al. (5) chez 192 patients souffrant d'IOAP avec une documentation bactériologique. La culture a permis de mettre en évidence les bactéries répertoriées dans le Tableau 2, page 25.

**Tableau 2 : Micro-organismes responsables d'infection sur prothèse dans le CRIOGO.**

D'après Bémer et al. (5)

SCN = *S. epidermidis* n = 31; *S. lugdunensis* n = 6; *Staphylococcus capitis* n = 4; *Staphylococcus simulans* n = 2; *Staphylococcus caprae* n = 1; *Staphylococcus haemolyticus* n = 1.

Streptococcus = *S. agalactiae* n = 7; *Streptococcus dysgalactiae* n = 3; *Streptococcus* groupe *mitis* n = 4; *S. groupe milleri* n = 3; *Streptococcus pneumoniae* n = 1; *Streptococcus salivarius* n = 1.

BGN = *Escherichia coli* n = 5; *Klebsiella* n = 3; *Enterobacter cloacae* n = 2; *Proteus mirabilis* n = 2; *P. aeruginosa* n = 4.

Anaérobies = *P. acnes* n = 10; *Propionibacterium avidum* n = 1; *Peptoniphilus asaccharolyticus* n = 1; *Parvimonas micra* n = 1.

Autres = *Listeria monocytogenes* n = 2; *Corynebacterium amycolatum* n = 1; *Bacillus cereus* n = 1

	%	n
<i>S. aureus</i>	33	63
SCN	23	45
Polymicrobien	15	29
<i>Streptococcus</i>	10	19
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	3
BGN	8	16
Anaérobies	7	13
Autres	2	4

## II.4. Facteurs de risques

Certains facteurs de risque d'infection sur prothèse sont identifiés (28) :

- score ASA (Physical Status Score de l'American Society of Anesthesiologist pour exprimer l'état de santé pré-opératoire d'un patient)
- diabète
- obésité (IMC > 40)
- polyarthrite rhumatoïde
- temps opératoire (> 2,5 heures)
- tabagisme actif
- hématome post-opératoire
- délai entre fracture et intervention chirurgicale
- cirrhose
- traitement anticoagulant pré-opératoire (INR > 1,5).

Aucun facteur de risque ne permet de prédire la survenue d'une infection précoce sur prothèse. Toutefois, la présence de ces facteurs de risque peut modifier le tableau clinique et biologique. En revanche, la présence d'un ou plusieurs facteurs de risque ne doit pas modifier la démarche diagnostique.

En 1998, Berbari et al. ont publié une étude cas-témoin incluant 462 infections sur prothèse (17). Ils ont déterminé les facteurs de risques d'IOAP. Un modèle de régression logistique multivariée a révélé les deux meilleurs facteurs prédictifs : le développement d'une infection du site opératoire ne touchant pas la prothèse (OR = 35,9 ; IC à 95% = 8,3 à 154,6) et un score chirurgicale National Nosocomial Infections Surveillance, NNIS (combinaison de la classe de contamination d'Altemeier, du score ASA et de la durée d'intervention) de 1 (OR = 1,7 ; IC à 95% = 1,2 à 2,3 ) ou 2 (OR = 3,9 ; IC à 95% = 2,0 à 7,5). Deux autres facteurs de risque non statistiquement significatifs étaient une précédente arthroplastie sur l'articulation et une tumeur maligne systémique.

## II.5. Impact social

Les projections américaines estiment que le nombre de poses de prothèse totale de hanche (PTH) et de genou (PTG) devrait augmenter respectivement de 174 et 673 % d'ici 2030. Parallèlement, le nombre de révisions de ces prothèses devrait doubler, dans les dix années à venir (3). Ces estimations sont représentées sur la Figure 4. Ainsi, le coût de la prise en charge des infections sur prothèse dépasse 50000 dollars par patient et augmente de 250000 millions de dollars par an, impactant considérablement les budgets nationaux, en matière de Santé (33). Trois facteurs expliquent l'augmentation du nombre d'IOAP : le nombre croissant de pose de prothèse chez des patients âgés, l'allongement de la durée de vie avec une prothèse et l'amélioration de l'expertise des Bactériologistes dans la détection et l'identification des bactéries potentiellement impliquées (1).

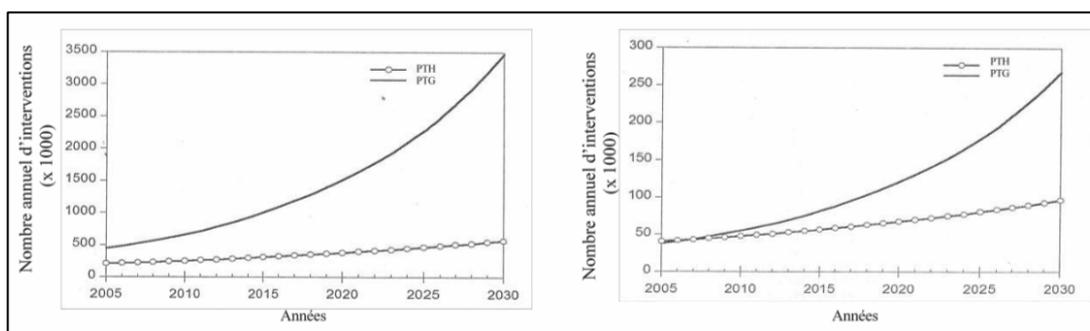


Figure 4 : Evolution du nombre de poses et de révisions de prothèse de hanche/genou aux Etats-Unis entre 2005 et 2030. D'après Kurtz et al. (3)

## II.6. Particularités des IOAM

Les IOAM ne sont pas des IOA comme les autres, plusieurs facteurs en font des IOA plus graves et plus difficiles à traiter.

### II.6.1. Immunodépression locale

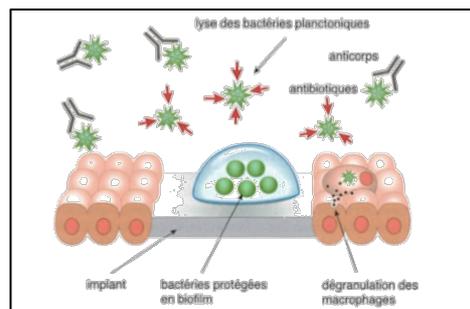
La réaction inflammatoire est dans les infections sur matériel, freinée par le développement du biofilm sur le matériel (34).

### II.6.2. Substratum

Le *substratum* est constitué des corps étrangers, des zones de nécrose et de séquestres. Il favorise l'adhérence bactérienne. Ces bactéries pourront ainsi se multiplier et produire du biofilm (35).

### II.6.3. Biofilm

Le biofilm est constitué d'exo-polysaccharides bactériens et de protéines de l'hôte (35). En se déposant sur toute la surface du *substratum*, il réduit l'action des antibiotiques et celles des défenses de l'hôte, comme représenté Figure 5 (27). Le développement d'un biofilm s'avère très rapide, 24 à 48 heures suffisent.

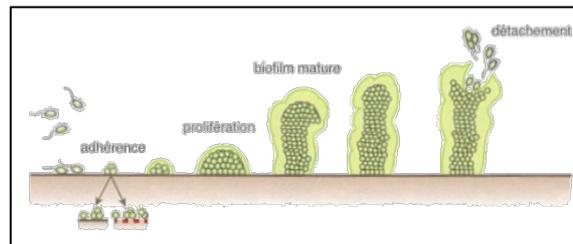


**Figure 5 : Biofilm à la surface d'un implant.**

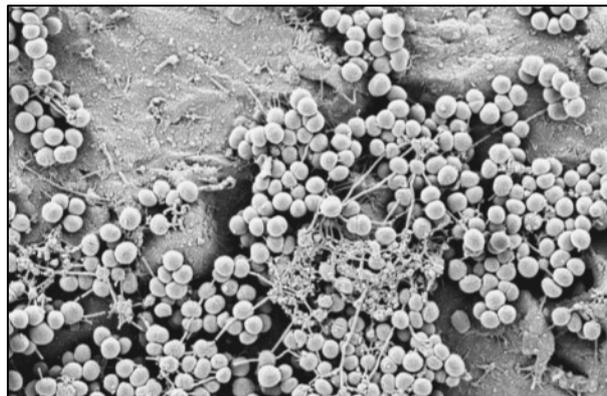
Les bactéries planctoniques libres ont été éradiquées par les antibiotiques et le système immunitaire, tandis que les bactéries adhérentes en biofilm ont survécu grâce à la protection offerte par la matrice extracellulaire. En contact avec des corps étrangers, les granulocytes et les phagocytes sont dégranulés et perdent leur pouvoir de phagocytose  
D'après Ochsner et al. (27)

Son développement se déroule en différentes étapes représentées Figure 6, page 28 (27). L'étape 1 amorce le processus avec l'adhérence initiale réversible des bactéries à la

surface cellulaire. L'étape 2 relève de la production locale d'exo-polysaccharides bactériens. L'étape 3 assure le développement d'un biofilm précoce c'est-à-dire la prolifération. L'étape 4 constitue la maturation du biofilm. Et pour finir, l'étape 5 (détachement) initie la dispersion de quelques cellules du biofilm lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables pour former, à nouveau, un biofilm à distance dans un environnement plus favorable (36). La Figure 7 représente la structure du biofilm en microscopie électronique.



**Figure 6 : Cycle de développement du biofilm.**  
D'après Ochsner et al. (27)



**Figure 7 : Vue en microscopie électronique d'un biofilm produit par *Staphylococcus epidermidis* sur du matériel étranger.**  
D'après Zimmerli et al. (2)

La formation de biofilm est la différence notable entre les IOA aiguës et chroniques.

Lors des IOA dites aiguës, les bactéries s'intègrent aux tissus mais restent généralement à l'état planctonique. Elles présentent une croissance exponentielle conduisant à une clinique bruyante mais les cibles bactériennes restent disponibles pour l'action des antibiotiques.

En cas de présentations chroniques, une adhérence bactérienne à la surface inerte du matériel précède la production de slime et donc la formation du biofilm. Dans celui-ci, les bactéries restent à l'état stationnaire et, sont bien souvent intra-cellulaires ou engluées dans la

matrice d'où une « résistance » aux antibiotiques par défaut de pénétration et de disponibilité des cibles. Ce processus s'ajoute à une immunodépression locale qui entraîne une persistance bactérienne à bas bruit, d'où des signes cliniques parfois frustes et un risque important de rechutes (dormance et apparition de colonies naines).

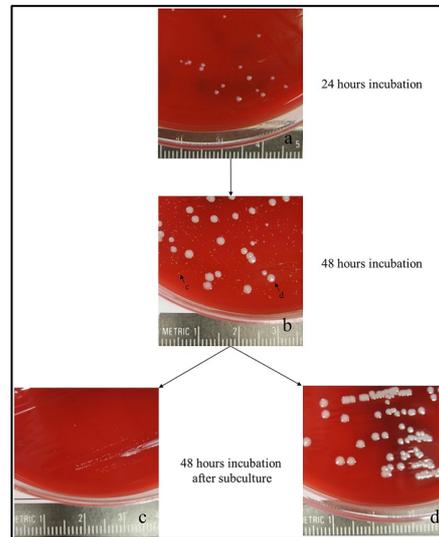
Compte tenu de la faible activité des antibiotiques et du système immunitaire, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont à l'étude pour traiter le biofilm caractéristique des IOAM. Le revêtement des prothèses, la vaccination anti-biofilm, ainsi que le développement d'inhibiteurs de Quorum-Sensing sont des stratégies prometteuses pour la prévention et le traitement de ces infections (37).

#### ***II.6.4. Small Colony Variants***

Les SCV sont des sous-populations de bactéries émergeant naturellement. Elles sont caractérisées par une croissance plus lente due à un défaut métabolique acquis. Ces bactéries sont difficiles à mettre en évidence au laboratoire (croissance après incubation prolongée, « écrasement » par d'autres micro-organismes, phénotype atypique des colonies, présence de « révertants ») (27). De même, le traitement des infections à SCV est complexe, car ces micro-organismes présentent une résistance à divers antibiotiques et peuvent persister au sein de niches intra-cellulaires. Il est possible qu'une nouvelle mutation engendre un retour au phénotype virulent normal (réversion), ce qui explique un taux élevé de récurrence (38). Ces infections sont considérées comme difficiles à traiter d'où la nécessité d'une ablation complète du matériel. La propension de certaines bactéries à former des SCV est connue (staphylocoques, *Salmonella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, etc.) (38).

Les caractéristiques cliniques et les résultats du traitement de patients atteints d'IOAP à variants colonies naines de staphylocoque restent inconnus. Tande et al. ont étudié ces types d'infections (39). La Figure 8, page 30 représente l'aspect de ces colonies et illustre la difficulté diagnostique au laboratoire (39). Les infections à SCV étaient plus fréquemment retrouvées chez des patients ayant reçu une antibiothérapie à long terme avant la chirurgie ( $p = 0,048$ ) (aminosides tout particulièrement, lors de l'utilisation de ciments imprégnés d'antibiotiques), ayant subi une chirurgie antérieure pour IOAP ( $p = 0,03$ ), ayant eu une plus longue durée des symptômes ( $p = 0,0003$ ), et ayant eu un temps plus long entre l'implantation

de la prothèse et la prise en charge actuelle ( $p = 0,007$ ), par rapport à ceux avec seulement des bactéries à phénotype normal. Par contre, les infections à SCV ne sont pas associées à un excès d'échec du traitement. A noter toutefois, que ces infections étaient traitées avec une stratégie chirurgicale de changement de prothèse en deux temps.



**Figure 8 : SCV et phénotype normal de *S. lugdunensis* isolés à partir d'un même échantillon.**

(A) Apparence de la culture sur gélose au sang de mouton après 24 h d'incubation, montrant seulement des colonies de phénotype normale.

(B) À 48 h, les deux types sont présents.

(C et D) Subculture d'une seule colonie du phénotype normal et du phénotype SCV après 48 h d'incubation.

D'après Tande et al.(39)

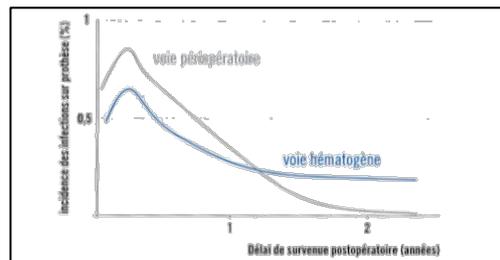
## II.7. Classification des infections sur prothèses

Classiquement, les infections sur prothèse sont classées en fonction du délai entre la date de la chirurgie et l'apparition des manifestations cliniques. Différentes classifications existent (Zimmerli, Tsukayama). Celle de Zimmerli, de loin la plus utilisée, est présentée dans le Tableau 3, page 31 (2). Elle définit une infection précoce, si elle survient dans les trois premiers mois post-opératoires, une infection retardée entre trois mois et deux ans, et une infection tardive plus de deux ans après la chirurgie. Les infections retardées sont caractérisées par l'importance du biofilm produit et par des bactéries non virulentes par rapport à celles impliquées dans les deux autres phases. La Figure 9, page 31, montre la fréquence de survenue des IOAP en fonction du délai après la pose et du type de pathogénèse (27).

**Tableau 3 : Classification des infections en fonction de leur délai de survenue.**

D'après Zimmerli et al. (2)

	Infection précoce	Infection retardée	Infection tardive
Délai après chirurgie	< 3 mois	3 à 24 mois	> 24 mois
Pathogénèse probable	voie per-opératoire ou post-opératoire immédiat		voie hématogène
Pathogènes fréquemment impliqués	<i>S. aureus</i>	SCN, <i>Corynébactérium</i> spp., <i>Propionibactérium acnes</i>	<i>S. aureus</i> , Entérobactéries, <i>Streptococcus</i> spp.



**Figure 9 : Fréquences des infections sur prothèse per-opératoires et hématogènes après implantation primaire.**

D'après Ochsner et al. (27)

### II.7.1. IOAM précoces et retardées

Les infections précoces et retardées sont typiquement des infections d'origine exogène (14). Le premier type est associé principalement à des micro-organismes virulents comme *S. aureus* ou *Escherichia coli*, alors que les infections retardées sont principalement dues à des bactéries moins virulentes, comme les SCN ou *P. acnes*.

L'ensemencement est généralement contemporain de la chirurgie ou immédiatement après, en cas d'anomalies de guérison de la plaie, notamment en raison d'un large hématome. Plus rarement, les infections exogènes apparaissent tardivement, au décours d'une arthrocentèse ou d'une perforation cutanée, spontanée ou traumatique, causée par le matériel (37).

### II.7.2. IOAM tardives

Les infections tardives apparaissent classiquement après une période asymptomatique. Leur origine est généralement hématogène. La porte d'entrée habituelle est cutanée. Toutefois, une origine urinaire, respiratoire, intestinale voire dentaire peut être rencontrée

(40). Souvent, aucune porte d'entrée évidente ne peut être évoquée. Il s'agit alors d'une bactériémie primaire ou d'une infection primaire déjà guérie lorsque les symptômes de l'infection sur prothèse apparaissent. *S. aureus* est la bactérie la plus fréquemment responsable d'infections sur prothèse d'origine hématogène.

Si le risque s'avère plus élevé en post-opératoire immédiat, les infections d'origine hématogène sont retrouvées à tout moment, après la chirurgie. En effet, la présence d'un corps étranger diminue localement les défenses immunitaires (41). L'accumulation de granulocytes autour de la prothèse conduit à une altération de leur fonction, probablement due à une phagocytose « frustrée », menant à une dégranulation et donc à la production de formes réactives de l'oxygène. Cette immunodépression locale favorise l'ensemencement préférentiel de l'implant. De plus, la présence du matériel diminue l'inoculum nécessaire à l'infection. Ainsi, que ce soit sur modèle animal ou chez l'Homme, la quantité de bactéries nécessaires pour former un abcès à *S. aureus* est 10000 fois inférieure, en présence de matériel étranger (34).

### **III. Diagnostic des IOAM**

Le diagnostic des IOAM s'avère souvent difficile. Il est même parfois occulté, par certaines équipes en raison de la difficulté à accepter la responsabilité, ainsi que le risque de conséquences chirurgicales lourdes. Ces aléas infectieux, heureusement rares, peuvent parfois conduire à un retard de prise en charge.

Le diagnostic se déroule en deux étapes : tout d'abord, suspecter ou évoquer l'infection devant un tableau clinique aigu ou chronique, grâce au soutien de l'imagerie médicale ou par l'apport des bio-marqueurs. Ensuite, identifier la bactérie responsable, grâce à la mise en culture des prélèvements per-opératoires qui reste le meilleur outil sans constituer un « gold standard » pour le diagnostic, bien que les critères de définition d'une IOA ne soient toujours pas consensuels selon les différentes sociétés savantes : Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Consensus Meeting on Surgical Site and Periprosthetic Joint Infection (ICM) et Musculoskeletal Infection Society (MSIS).

## III.1. Diagnostic clinique

### III.1.1. Tableaux cliniques

L'existence d'une fistule ou de pus (écoulement ou abcès) à proximité de la prothèse ou de l'implant, affirme l'infection, jusqu'à preuve du contraire. Dans le mois qui suit la mise en place d'une prothèse articulaire, les signes cliniques suivants sont évocateurs d'une infection :

- douleur d'intensité anormale ou sa réapparition après intervalle libre ;
- écoulement purulent de la plaie opératoire ;
- désunion, nécrose ou inflammation cicatricielle ;
- dégradation de la récupération fonctionnelle.

L'existence de signes généraux (fièvre, frissons) augmente la probabilité d'une infection (28) (42). L'existence d'une douleur et/ou la présence d'un descellement radiologique, surtout si la prothèse a été posée récemment, doivent faire rechercher une infection. Lorsqu'un intervalle libre long est constaté entre la pose de la prothèse et la survenue de signes infectieux en regard de celle-ci, il convient de rechercher un foyer infectieux à distance (infection de nature « hématogène »). Chez un patient porteur d'une prothèse articulaire ou d'un matériel d'ostéosynthèse, en présence d'un sepsis et en l'absence d'un autre point d'appel infectieux à l'examen clinique, il faudra évoquer une infection du matériel. Enfin, l'absence de signes inflammatoires cliniques, locaux et généraux, ne permet pas d'éliminer formellement une infection sur prothèse (28)(42).

### III.1.2. Imagerie

**La radiologie standard** peut être utile au diagnostic. Il demeure fortement recommandé de réaliser une radiographie standard, bien que dans 50 % des cas, elle reste normale. De plus, il n'existe aucun signe radiographique formel d'infection sur matériel (Tableau 4, page 34). Toutefois, il faut rechercher un descellement bipolaire, des liserés péri-prothétiques larges continus et rapidement évolutifs, des géodes endostées, des appositions périostées ou des ossifications péri-prothétiques. Cet examen a peu ou moins d'intérêt en cas

d'infection précoce, mais il est à utiliser en première ligne à partir du deuxième mois (infections retardées et tardives). La sensibilité de la radiographie standard est de 14 % et sa spécificité de 70 % (42).

**Tableau 4 : Place de la radiographie standard dans le diagnostic infectiologique.**

D 'après Ochsner et al. (27)

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bonne visualisation de la structure osseuse</li> <li>- Modifications reconnaissables par comparaison avec les clichés précédents</li> <li>- Artéfacts métalliques réduits</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Modifications visibles souvent peu spécifiques des infections</li> <li>- Visualisation médiocre des parties molles</li> <li>- Séquestres, fistules, abcès seulement partiellement identifiables, éventuellement après fistulographie.</li> </ul>

**Le scanner** avec injection intra-veineuse de produit de contraste iodé s'avère être le meilleur examen en présence d'un matériel d'ostéosynthèse. Il permet d'apprécier la structure osseuse sur os périphérique et l'analyse des parties molles (Tableau 5). Cependant, le matériel d'ostéosynthèse peut provoquer des artéfacts sur les images. Les signes tomодensitométriques d'une infection de prothèse sont les suivants : présence d'appositions périostées, ostéolyses floues et mal limitées autour du matériel, anomalie des tissus mous, collection dans les parties molles (42).

**Tableau 5 : Place du scanner dans le diagnostic infectiologique.**

D 'après Ochsner et al. (27)

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bonne visualisation de la structure osseuse</li> <li>- Meilleure visualisation des séquestres</li> <li>- Reconstructions possibles dans tous les plans</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Visualisation relativement médiocre des parties molles</li> <li>- Artéfacts métalliques</li> </ul>

**L'échographie** permet de rechercher une collection, un épanchement intra-articulaire ou localisé au niveau d'une bourse séreuse, un épaissement des tissus mous et une hyperémie doppler. En cas de suspicion d'infection articulaire, l'absence d'épanchement intra-articulaire a une Valeur Prédictive Négative (VPN) de 96 % (42).

**L'IRM** peut être effectuée chez les patients sans implants, ou avec des implants non ferromagnétiques (Tableau 6, page 35). Elle offre une très bonne visualisation des modifications des tissus mous et est particulièrement utile pour l'exploration du rachis. La

structure osseuse au contact d'un matériel d'ostéosynthèse n'est pas analysable et il existe des anomalies de signal de la médullaire osseuse en période post-opératoire précoce. Il est recommandé de réaliser des séquences « FLAIR » permettant de diminuer les artéfacts dus au matériel. Il est recommandé d'effectuer une injection intra-veineuse de Gadolinium<sup>®</sup>. L'IRM a une bonne valeur diagnostique en cas d'infection d'un matériel rachidien (42).

**Tableau 6 : Place de l'IRM dans le diagnostic infectiologique.**

D'après Ochsner et al. (27)

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Détection des foyers inflammatoires avec une sensibilité et une spécificité élevées</li> <li>- Visualisation des complications (abcès et fistules)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spécificité moindre pour les infections chroniques</li> <li>- Surestimations de l'œdème osseux</li> </ul>

### Stratégies :

Aucun examen d'imagerie n'est nécessaire pour le diagnostic d'infection précoce. Seule l'échographie peut être utile pour guider une ponction (28).

En cas d'infection retardée ou tardive, il est recommandé de pratiquer une radiographie standard en première intention du fait de sa simplicité, de son faible coût et de sa reproductibilité. En seconde intention, il est recommandé de réaliser un scanner avec injection de produit de contraste iodé. En cas de collection au contact du matériel d'ostéosynthèse dont la ponction est difficile, il est recommandé de la faire pratiquer sous contrôle scopique, échographique, tomodensitométrie ou arthro-tomodensitométrie en respectant les conditions d'asepsie chirurgicale. En troisième intention, l'imagerie utilisant les radio-isotopes, non détaillée ici, (scintigraphie osseuse couplée à une scintigraphie aux polynucléaires marqués) est recommandée. En cas de suspicion d'infection sur matériel d'ostéosynthèse rachidien, l'IRM avec injection de Gadolinium<sup>®</sup> et la scintigraphie osseuse couplée à la scintigraphie au Gallium sont les examens de choix (42).

### III.2. Diagnostic histologique

Il est recommandé, dans tous les cas, de réaliser un examen anatomopathologique du tissu osseux et de la synoviale. Histologiquement, une infection sur matériel se définit par la présence de plus de cinq polynucléaires neutrophiles par champ microscopique, à fort grossissement (x 400), dans au moins cinq champs séparés, sur le prélèvement osseux. Dans ce cas, la sensibilité et la spécificité de l'examen varient respectivement entre 43 et 100 % et entre 81 et 98 %. L'intérêt de l'examen histologique réside aussi dans sa capacité à pouvoir orienter plus spécifiquement le diagnostic vers une infection à mycobactérie ou vers une infection fongique, recherches non réalisées en première intention (42).

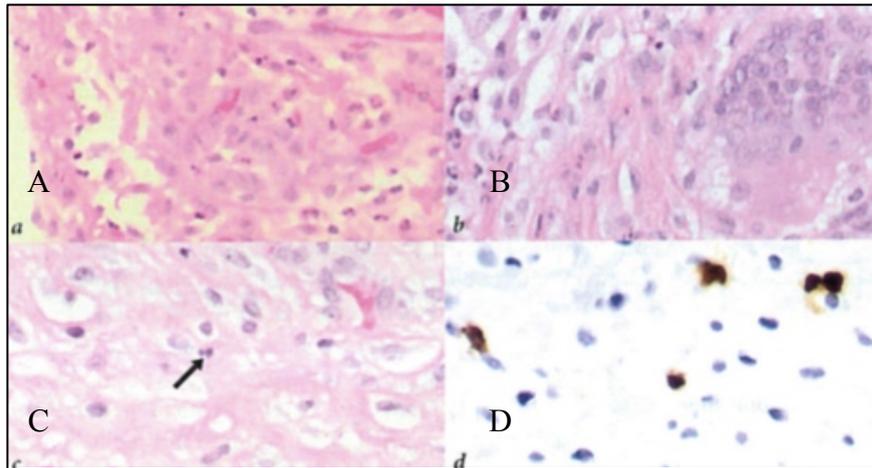
La classification histo-pathologique de Krenn-Morawietz a été mise au point récemment depuis le concept « d'allergie » à la prothèse (43)(44). En effet, l'analyse des membranes péri-prothétiques est compliquée par la présence de réactions inflammatoires à corps étrangers sur les particules d'usure. Dans ce contexte, quatre tableaux cliniques sont distingués :

- . Type I : Particule-induite = signes d'usure uniquement
- . Type II : Infectieuse = signes d'infection uniquement, Figure 10-A, page 37
- . Type III : Combinée/Mixte = signes d'usure et d'infection, Figure 10-B, page 37
- . Type IV : Fibreuse/Indifférenciée

Les types I et IV représentent généralement des descellements aseptiques et les types II et III, des infections de prothèses.

Différentes techniques ont été mises au point afin de faciliter l'identification des polynucléaires, même lorsqu'ils sont présents qu'en faible nombre. Le marquage immunohistochimique (CD15) est une de ces techniques, représentée Figure 10-D, page 37.

L'utilisation de la coloration à la chloroacétate estérase pour le diagnostic histologique des IOAP est utile, elle permet une meilleure identification des polynucléaires neutrophiles dans les coupes des tissus péri-prothétiques (45). Cette technique est importante, d'autant plus que les résultats anatomopathologiques rentrent dans les critères d'infection sur prothèse selon les différentes sociétés savantes MSIS, IDSA, ICM (46)(47)(48).



**Figure 10 : Différents types de membrane péri-prothétique.**

D'après Ochsner et al. (27)

A – Infection aiguë : membrane synoviale avec prolifération d'un grand nombre de polynucléaires.

B – Combinaison de signes d'infection et d'usure : membrane synoviale avec prolifération de polynucléaires et cellule géante avec matériel phagocyté.

C – Infection à bas bruit : polynucléaires isolées (flèche).

D – Infection à bas bruit : polynucléaires nettement mieux visibles après marquage immuno-histochimique (CD15).

### III.3. Diagnostic biologique

Aucun paramètre biologique n'est à lui seul suffisamment sensible et spécifique d'une infection sur prothèse.

La leucocytose sanguine est souvent absente et n'a ni une bonne Valeur Prédictive Positive (VPP), ni une bonne VPN (42). Une valeur normale de la Vitesse de Sédimentation (VS) et/ou de la Protéine C-Réactive (CRP) n'exclut pas une IOAM (42).

- Dans le mois post-implantation, la VS ou la procalcitonine (PCT) n'ont aucune valeur diagnostique et ne doivent donc pas être utilisées. Le dosage de la CRP est plus utile mais n'est pas interprétable en post-opératoire précoce. En revanche, il est recommandé de suivre la courbe de l'évolution de son taux sérique (28).
- Au-delà de 3 mois après la mise en place d'une prothèse, et en cas de suspicion d'infection, il est recommandé de réaliser une mesure de la VS et de la CRP. L'interprétation des résultats doit se faire en l'absence de facteurs confondants. Les seuils minimaux au-delà desquels l'existence d'une infection est suspectée, oscillent entre 22 et 30 mm pour la VS et entre 10 et 13,5 mg/l pour la CRP (42).

### **III.4. Diagnostic microbiologique classique par culture**

Les examens bactériologiques ont une importance capitale car eux seuls permettent d'une part, d'établir le diagnostic de certitude par isolement et identification du micro-organisme en cause et, d'autre part, de mettre en œuvre un traitement efficace et adapté grâce à l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. La qualité des prélèvements, les modalités de leur acheminement au laboratoire, ainsi que les techniques utilisées au laboratoire sont autant de paramètres qui influencent la sensibilité et la spécificité du diagnostic microbiologique.

#### ***III.4.1. Etape pré-analytique***

##### **a. Les prélèvements**

Lors de la mise en place de modes opératoires rigoureux pour le diagnostic des IOA au laboratoire, deux écueils majeurs sont à redouter : les prélèvements faussement négatifs conduisant à l'absence de diagnostic alors qu'il y a une infection avérée et les prélèvements faussement positifs conduisant à un excès de prise en charge et de traitement. Afin de diminuer le risque d'obtenir des prélèvements faussement négatifs, il est recommandé de respecter une fenêtre d'arrêt des antibiotiques de 15 jours, au minimum. Par ailleurs, afin d'éviter les prélèvements faussement positifs, il est recommandé de respecter une asepsie chirurgicale lors de la réalisation des prélèvements, de manipuler sous poste de sécurité microbiologique au laboratoire et de conduire une interprétation globale de l'ensemble des prélèvements en concertation avec le groupe multidisciplinaire.

#### **Pré-opératoires**

Les prélèvements pré-opératoires sont utiles en cas de doute diagnostique. En cas de positivité, ils posent le diagnostic et permettent d'adapter le traitement à l'antibiogramme. En cas de négativité, le diagnostic ne peut être exclu. Les écouvillonnages de cicatrice et les prélèvements de fistule sont à bannir (2). Une ponction éventuellement radioguidée reste l'idéal en cas d'épanchement intra-articulaire ou d'abcès au contact du matériel ostéo-articulaire. En l'absence d'élément liquidien, il est possible de réaliser une biopsie au Truecut® (42).

## **Per-opératoires**

Prélevés en début d'intervention, en dehors de toute antibiothérapie et parfois avant toute antibioprofylaxie, les prélèvements per-opératoires sont essentiels au diagnostic. Actuellement, les différentes recommandations ou conférences d'experts préconisent toujours cinq prélèvements étagés, au niveau de zones macroscopiquement pathologiques, tout en veillant au changement d'instrument entre chacun (42)(46)(47). A noter qu'une étude conduite dans le service de Bactériologie à partir des données issues de l'analyse des 960 prélèvements du PHRC MICROBIOS I a démontré que l'analyse bactériologique de seulement quatre prélèvements n'a pas d'impact sur l'efficacité clinique du diagnostic microbiologique des IOAP (49). Ces prélèvements peuvent être liquides (pus, liquide articulaire) ou solides (tissus de granulation, tissus osseux, tissu d'interposition ou tout tissu paraissant suspect). Cette étude du CRIOGO n'a pas montré la supériorité de certaines natures de prélèvements sur d'autres, contrairement à Bjerkan et al. qui préconisaient l'utilisation des tissus à l'interface os-implant appelés aussi membranes péri-prothétiques. Dans ce travail, le taux de culture positive de membranes péri-prothétiques était plus élevé par rapport aux cultures des capsules articulaires et des liquides synoviaux ; ceci s'explique par une charge bactérienne supérieure au sein des membranes péri-prothétiques (49)(50).

## **Post-opératoires**

Selon la SPILF, il peut être utile d'envoyer les liquides de drainage en bactériologie, leur positivité semble liée à un risque accru de rechute ou de récurrence d'infection (42). Les prélèvements post-opératoires peuvent également être utiles en cas de suspicion d'infection sur fiche de fixateur externe. Dans ce cas, les prélèvements se font par aspiration à la seringue du liquide purulent le long de la fiche ou bien par injection/ré-aspiration de sérum physiologique après nettoyage antiseptique de l'orifice de la fiche. Ces recommandations de la SPILF sont très peu suivies en pratique, en raison des risques de contamination de ces prélèvements par la flore cutanée du patient menant à des erreurs diagnostiques.

#### b. La gestion des prélèvements

L'acheminement des échantillons au laboratoire doit se faire rapidement. Si la durée du transport dépasse deux heures, il est préférable d'utiliser des milieux de transport, notamment pour favoriser la détection des bactéries anaérobies (51). Le transport doit s'effectuer à température ambiante. En cas de retard d'acheminement, il est à signaler dans le compte-rendu de résultats. Les échantillons doivent être correctement identifiés (nom, prénom et sites de prélèvement). La recherche éventuelle de mycobactéries ou de champignons/levures devra être précisée sur la demande. Le plus souvent, elle sera ajoutée secondairement après discussion en Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP).

Tous les prélèvements doivent être techniqués sous hotte à flux laminaire type PSM2 avec casaque à usage unique (changée tous les jours) et gants stériles (changés régulièrement) pour éviter au maximum une contamination externe. Il est recommandé d'utiliser du matériel à usage unique et des géloses les plus fraîches possibles (42).

### ***III.4.2. Etape analytique***

#### a. L'examen microscopique

##### **Liquide articulaire**

L'examen cytologique, c'est-à-dire la numération des éléments et la formule, doivent être systématiquement réalisés. Des valeurs seuils ont pu être définies pour le nombre de globules blancs et de polynucléaires neutrophiles présents dans le liquide de ponction. Les résultats peuvent toutefois être faussés chez les patients souffrant de maladies rhumatismales ou de neutropénie.

- Prothèse totale de genou :  $> 1\ 700$  leucocytes/mm<sup>3</sup> (sensibilité de 94 % et spécificité de 88 %) et  $> 65$  % de polynucléaires neutrophiles (sensibilité de 97 % et spécificité de 98 %) sont évocateurs d'une infection (52).
- Prothèse totale de hanche :  $> 4\ 200$  leucocytes/mm<sup>3</sup> (sensibilité de 84 % et spécificité de 93 %) et  $> 80$  % de polynucléaires neutrophiles (sensibilité de 84 % et spécificité

de 82 %) sont évocateurs d'une infection (27).

Ces valeurs ont été confirmées par une étude récente de Dinneen et al. pour les prothèses de hanche et de genou (53).

### **Autres prélèvements**

Selon la SPILF, il est recommandé d'effectuer un examen direct d'un frottis des broyats à la recherche de polynucléaires neutrophiles (mieux identifiés après la coloration de May-Grunwald-Giemsa) et de bactéries (*via* la coloration de Gram). La sensibilité de l'examen bactériologique direct reste faible (6 %) alors que sa spécificité est proche de 100 % (42).

L'apport de l'examen direct a été évalué dès 1996, par Chimento et al. sur 169 colorations de Gram dont 32 issues de prélèvements de patients souffrant réellement d'IOAP. Tous les examens directs étaient négatifs. La méthode a donc une très mauvaise sensibilité dans cette étude (0 %). Les auteurs concluaient que l'absence d'organismes visibles à la coloration de Gram, lors de la révision d'arthroplastie n'affirme pas l'absence d'infection (54).

Ces données ont été confirmées par plusieurs études. En 2010, une étude conduite sur 202 colorations de Gram a révélé une sensibilité et une spécificité respectivement de 9,8 % et 100 %, conduisant à une VPN de 62 % mais une VPP de 100 % (55). Par conséquent, de nombreux auteurs pensent que la coloration de Gram ne devrait plus être prise en considération pour le diagnostic d'IOAP (27)(55).

#### **b. La culture**

### **Liquide articulaire**

Le liquide articulaire est généralement ensemencé sur des géloses enrichies, incubées en aérobiose, sous 5 % de CO<sub>2</sub> et en anaérobiose pendant 14 jours. A la fin de cette période, il est recommandé de repiquer systématiquement les bouillons d'enrichissement, y compris en l'absence de trouble. Le liquide articulaire devrait également être inoculé, dans la mesure du possible, dans un flacon d'hémoculture (42)(49)(56).

## **Autres prélèvements**

Il est recommandé de broyer les prélèvements solides (fragments d'os, de tissus) afin de libérer les bactéries du biofilm (5)(57). L'ensemencement des prélèvements liquides et des broyats doit se faire sur milieux enrichis solides et liquides et, éventuellement, sur milieux spéciaux, généralement dans un second temps, pour la recherche de mycobactéries ou de champignons, à la demande du clinicien ou suite à la RCP.

L'incubation des milieux de culture solides doit être poursuivie pendant sept jours en aérobiose et en anaérobiose. Concernant les milieux liquides, l'incubation est prolongée 14 jours et les bouillons d'enrichissement sont repiqués de façon systématique, y compris en l'absence de turbidité pour l'isolement d'éventuelles micro-colonies, de bactéries à croissance lente, appelées « small colony variants », de *P. acnes* ou de bactéries d'espèces différentes qui apparaissent sur les milieux de façon décalée dans le temps lors de prélèvements pluri-microbiens. Toutes les colonies différentes (morphotypes), particulièrement celles des staphylocoques sont à identifier et des antibiogrammes sont à réaliser sur les différents types de colonies isolées pour permettre l'interprétation des cultures (42).

Par ailleurs, les broyats des prélèvements sont congelés à -80 °C pour réaliser, éventuellement secondairement des recherches particulières (mycobactérie, mycologie) ou mettre en œuvre des techniques de détection par biologie moléculaire.

Les types de milieux utilisés ainsi que les durées d'incubation sont différents d'une équipe à l'autre. Bémer et al. recommandent l'utilisation de trois milieux de culture : un flacon d'hémoculture, une gélose chocolat et un bouillon Schaedler, incubés respectivement cinq, sept et 14 jours (49). Ces nouvelles procédures permettent un taux de concordance de 98,1 % et 99,7 % respectivement avec le critère bactériologique et avec le diagnostic « confirmé » d'IOAP selon les critères de l'IDSA.

### III.4.3. *Interprétation des résultats*

Un résultat négatif n'élimine pas le diagnostic d'infection, surtout en cas de prélèvements pré-opératoires.

Il existe plusieurs recommandations de diverses sociétés savantes concernant la définition d'une IOAP avec des critères bactériologiques variables.

#### a. SPILF 2009

D'après les recommandations de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) en 2009, pour définir une IOAP, le patient doit présenter des signes cliniques d'infection et remplir les critères d'interprétation des cultures suivants (42) :

- Soit la présence d'au moins un prélèvement positif (un prélèvement par ponction articulaire, un prélèvement per-opératoire ou une hémoculture) avec une bactérie n'appartenant pas à la flore cutanée, et pour lequel la question d'une contamination ne se pose pas (*S. aureus*, entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*...) ou bien avec une bactérie exceptionnellement rencontrée pour laquelle la question d'une contamination ne se pose pas (*Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Pasteurella*).
- Soit la présence d'au moins trois prélèvements positifs (trois prélèvements per-opératoires ou deux prélèvements per-opératoires + un prélèvement par ponction articulaire réalisé quelques jours avant la chirurgie) avec la (les) même(s) bactérie(s) appartenant à la flore cutanée (SCN, *P. acnes*, corynébactéries...), et dont l'isolement pose la question d'une éventuelle contamination.

#### b. MSIS 2011

Selon la Musculoskeletal Infection Society (MSIS) en 2011, une infection de prothèse se définit par la présence d'un critère majeur et de quatre critères mineurs. Une infection de prothèse est toutefois possible si quatre critères mineurs sont retrouvés (46). Ces critères sont présentés dans le Tableau 7, page 44.

**Tableau 7 : Critères d'infection de MSIS 2011.**

D'après Parvizi et al.(46).

<b>Critères majeurs</b>	Présence d'une fistule communiquant avec la prothèse ; Isolement d'un germe dans au moins deux prélèvements pré- ou per-opératoires.
<b>Critères mineurs</b>	VS et CRP élevées ; Compte de leucocyte du liquide articulaire élevé ; Pourcentage de PNN dans le liquide articulaire élevé ; Aspect purulent de l'articulation ; Isolement d'un germe dans un seul prélèvement ; Plus de cinq PNN par champs microscopiques à un grossissement x400 sur au moins 5 champs séparés.

c. IDSA 2012

Selon l'Infectious Diseases Society of America (IDSA) en 2012, une infection de prothèse se définit comme suivant (Tableau 8) (47) :

**Tableau 8 : Critères d'infection de l'IDSA 2012.**

D'après Osmon et al.(47).

<b>Critères d'infection certaine</b>	Présence d'une fistule communiquant avec la prothèse ; Présence de pus autour de la prothèse sans autre étiologie connue ; Isolement d'un germe dans au moins deux prélèvements pré- ou per-opératoires ; Isolement d'un germe virulent dans un seul prélèvement pré- ou per-opératoire.
<b>Critères d'infection possible</b>	Signe d'inflammation à l'examen anatomo-pathologie ; Isolement d'un germe cutané dans un seul prélèvement pré- ou per-opératoire ; Jugement du clinicien d'une IOAP en fonction des informations pré- ou per-opératoires.

d. ICM 2013

Selon l'International Consensus Meeting on Surgical Site and Periprosthetic Joint Infection (ICM) en 2013, une IOAP est définie par la présence d'un critère majeur ou de trois à cinq des critères mineurs suivants, présentés dans le Tableau 9, page 45 (48).

**Tableau 9 : Critères d'infection de ICM 2013**

D'après Parvizi et al. (48)

<b>Critères majeurs</b>	Présence d'une fistule communiquant avec la prothèse ; Isolement d'un germe dans au moins deux prélèvements pré- ou per-opératoires.
<b>Critères mineurs</b>	VS et CRP élevées ; Compte de leucocyte du liquide articulaire élevé ou virage de la bandelette leucocyte estérase (++) ; Pourcentage de PNN dans le liquide articulaire élevé ; Analyse histologique positive des tissus péri-prothétiques ; Isolement d'un germe dans un seul prélèvement .

Il existe des variantes concernant le diagnostic d'une IOAP, et notamment concernant l'interprétation des prélèvements positifs en culture, le Tableau 10, résume ces différences d'interprétation.

**Tableau 10 : Tableau récapitulatif des différentes recommandations d'experts concernant l'interprétation des cultures.**

Critères	SPILF 2009	MSIS 2011	ISDA 2012	ICM 2013
1 prélèvement positif à germe virulent	x	majeur	certain	majeur
≥ 3 prélèvements positifs à germe cutané	x		certain	
≥ 2 prélèvements positifs à germe cutané			certain	
1 prélèvement positif à germe cutané		mineur	possible	mineur

### III.5. Nouvelles méthodes diagnostiques biologiques

D'autres méthodes indirectes de diagnostic sont en cours d'évaluation. Certaines sont basées sur des méthodes classiques ou utilisent des scores diagnostics, d'autres sont plus innovantes et conçues exclusivement pour les IOA.

Le dosage de biomarqueurs sériques de l'inflammation semble être une alternative non invasive intéressante. Bottner et al. ont mené une étude prospective pour évaluer le rôle de nouveaux marqueurs biologiques dans le diagnostic d'IOAP chez 78 patients dont 21 avec des prélèvements per-opératoires positifs en culture (58). Le nombre de globules blancs sanguins, la VS et les taux de CRP, d'IL-6, de facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- $\alpha$ ) et de PCT ont été évalués avant la chirurgie. Un taux de CRP (> 3,2 mg/L) et d'IL-6 (> 12 pg/ml)

présentaient la sensibilité la plus élevée (95 %). L'IL-6 était moins spécifique que la CRP (87 % *versus* 96 %). La combinaison de ces deux marqueurs identifiait tous les patients atteints d'une infection. La PCT (> 0,3 ng/ml) et le TNF- $\alpha$  (> 40 ng/ml) étaient très spécifiques (98 et 94 %), mais peu sensibles (33 et 44 %).

De manière intéressante, le dosage de ces biomarqueurs peut se faire dans le sérum mais également directement dans le liquide synovial ponctionné.

Deirmengian et al. ont évalué prospectivement les performances diagnostiques de 16 biomarqueurs prometteurs dosés dans le liquide synovial pour le diagnostic d'IOAP. 95 patients ont été inclus dont certains souffrant de maladies inflammatoires systémiques et d'autres ayant déjà reçu un traitement antibiotique ; 29 d'entre eux souffraient réellement d'IOAP selon les critères de la MSIS. Dans cette étude, cinq marqueurs biologiques : l' $\alpha$ -défensine, l'élastase neutrophile 2 (ELA-2), la Bactericidal/permeability-increasing protéine (BPI), la Neutrophile Gélatinase Associated Lipocaline (NGAL) et la lactoferrine prédisaient la catégorisation des patients, selon la classification MSIS. Huit autres biomarqueurs : IL-8, CRP, résistine, thrombospondine, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, et IL-1 $\alpha$  ont démontré une excellente valeur prédictive du diagnostic, avec une aire sous la courbe ROC de plus de 0,9 (59). Les limites de ces études reposent sur le faible nombre de patients souffrant d'IOAP, l'absence de disponibilité de ces dosages au laboratoire, ainsi qu'aucune stratification des groupes de patients (infection aigüe ou chronique, précoce ou retardée, etc.)

Ettinger et al., en 2015, ont mis au point un algorithme décisionnel basé sur les dosages de la CRP ultrasensible et de IL-6 (60). En pré-opératoire, il permet de statuer entre un descellement aseptique et une infection de prothèse, catégorisant les patients en trois groupes à risque (bas, moyen et élevé). Cet arbre décisionnel a été conçu de manière rétrospective sur un effectif de 98 patients avec les résultats microbiologiques des prélèvements per-opératoires. Ainsi, si le dosage de l'IL-6 est inférieur à 5,12 pg/ml, le patient est considéré à bas risque ; par ailleurs, le dosage de la CRP ultrasensible permet de séparer les patients à risque moyen (CRP  $\leq$  0,3 mg/dl) des patients à risque élevé (CRP > 0,3 mg/L). Ce test est en cours d'évaluation prospective.

Au CHU de Strasbourg, l'équipe d'Orthopédie du Dr. Jenny a créé un « score d'Infectiosité » afin de déterminer si la prothèse articulaire est infectée ou non. Cette étude

rétrospective a été menée chez 104 patients ayant eu une révision de prothèse de hanche dont 41 pour cause infectieuse. Ce score est basé sur l'indice de masse corporelle, la présence d'un diabète, l'existence de complication mécanique, de fièvre et un défaut de cicatrisation. Ce score composite permet de séparer les patients infectés et non-infectés de façon exacte dans 75 % des cas, avec une sensibilité assez faible de 57 % et une spécificité de 93 % (61).

De manière récente, une nouvelle approche sérologique non invasive innovante a été développée par le laboratoire InGen Diaxonhit. Le test BJI Inoplex<sup>®</sup> est un test sérologique multiplexe basé sur la détection d'anticorps dirigés contre des antigènes bactériens clés impliqués dans les IOAP : staphylocoques (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*), *Streptococcus agalactiae* et *P. acnes*. Une première étude prospective, basée sur un échantillon de 455 patients a été menée en cas de suspicion d'infection sur prothèse ostéo-articulaire dans deux centres français de référence dans le diagnostic des IOA. 176 patients (38,7 %) étaient infectés et environ 60 % des infections étaient dues à au moins une des espèces détectées par le test. Les sensibilité et spécificité ont été évaluées en comparant les résultats à ceux de la culture des prélèvements microbiologiques. Elles étaient de 72,3 % / 80,7 % pour les staphylocoques ciblés, de 75 % / 92,6 % pour *S. agalactiae*, et de 38,5 % / 84,8 % pour *P. acnes*. Le test s'avère plus sensible pour les infections survenant plus de trois mois après l'arthroplastie et pour les patients avec une CRP ou une VS élevée. Une VPN supérieure à 90 % a été calculée s'il est associé à la CRP et la VS (62). L'analyse mériterait d'être stratifiée en fonction du type de sepsis aigu/chronique. Ce test a l'avantage d'être non invasif mais il demeure coûteux (60 € environ par test). Il pourrait également être utilisé pour le suivi de ces patients après la chirurgie mais, à ce jour, aucune étude n'a prouvé son intérêt dans le suivi cinétique des anticorps.

Ces différentes méthodes montrent l'intérêt de tests non invasifs mais aussi parfois leurs faibles performances.

## III.6. Nouvelles méthodes diagnostiques microbiologiques

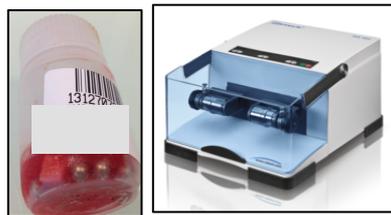
### III.6.1. Apport du broyage des prélèvements per-opératoires

La pré-analytique a un rôle très important dans le diagnostic des IOAP. En raison de la présence de bactéries adhérentes, de biofilm mature même précocement, de bactéries à métabolisme ralenti (SCV) typiquement retrouvées dans le biofilm, une étape de broyage est essentielle à la désintégration de ce dernier. Il existe deux techniques principales de broyage. Le système de dispersion d'Ultra-Turrax®, qui homogénéise, agite et triture le prélèvement grâce à l'utilisation de tubes d'échantillons jetables, à verrouillage hermétique (Figure 11).



**Figure 11 : Broyeur disperseur Ultra turrax®**  
D'après <http://www.ika.com>

Le vibro-broyeur de paillasse de la marque Retsch® (Figure 12) est compact, multifonctionnel, et spécialement développé pour le broyage à sec ou à l'état humide de petites quantités d'échantillons. Il se prête parfaitement à la désintégration de cellules biologiques (biopsie, valve, os, etc.) pour conduire une culture ou une extraction d'acides nucléiques.



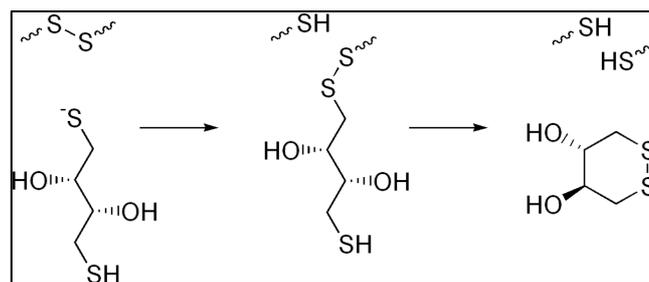
**Figure 12 : Broyeur à billes Retsch®**  
D'après <http://www.retsch.fr>

Quelle que soit la technique utilisée, cette étape de broyage s'avère très simple à mettre en œuvre et elle est d'ores et déjà en routine dans certains laboratoires. Le broyage apporte une documentation microbiologique dans 83,7 % selon Roux et al. qui ont réalisé une étude chez 92 patients (495 prélèvements) (57). Une autre étude multicentrique, menée par le

CRIOGO sur 264 patients et 1320 prélèvements a montré une sensibilité de la culture avec broyage préalable de 89 %. Parmi ces infections, 81 % étaient des sepsis chroniques et 29 % des patients avaient reçu des antibiotiques dans les 15 jours précédents la chirurgie (5). Des évolutions du broyage sont possibles telles que l'ensemencement des liquides de broyats directement dans les flacons d'hémoculture et l'utilisation de billes d'inox de cinq millimètres de diamètre. Le broyage des prélèvements solides reste la méthode la plus facile à utiliser, et elle est applicable à tout prélèvement solide, même au petit matériel.

### III.6.2. Apport du pré-traitement par le dithiothreitol (DTT)

Le broyage et la sonication des prothèses (cf. III.6.3) constituent des méthodes mécaniques intéressantes pour diminuer le nombre de Faux Négatifs en culture. Certaines méthodes chimiques, qui lysent le biofilm, pourraient être aussi pertinentes. Le DTT est un agent réducteur également connu sous le nom de réactif de Cleland, qui réduit les ponts disulfures et maintient les groupements thiols à l'état réduit, en formant un pont disulfure intramoléculaire (Figure 13). Il agit comme un dénaturant protéique. Il est parfois utilisé aux laboratoires pour liquéfier les prélèvements respiratoires, il interférerait avec le polysaccharide du biofilm.



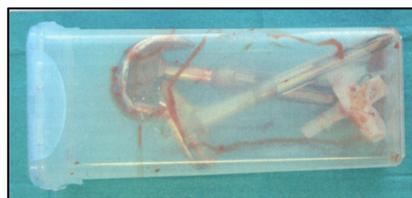
**Figure 13 : Effet du DTT sur les ponts disulfures.**  
D'après <https://fr.wikipedia.org/wiki/Dithiothréitol>

Deux études ont investigué son intérêt dans le diagnostic des IOAP. La première démontrait que le DTT détachait les bactéries du biofilm aussi bien que la sonication et mieux

que le broyage, sans conséquence sur la croissance bactérienne (63). La deuxième est une étude conduite sur des prélèvements cliniques chez 76 patients. La sonication avait une sensibilité et une spécificité plus élevées (respectivement, 71,4 % et 94,1 %) à celles de la culture des tissus péri-prothétique, tandis que le pré-traitement par DTT montrait une spécificité identique à celle retrouvée par la sonication mais une meilleure sensibilité (85,7 %), en particulier lorsque le micro-organisme pathogène était un *Staphylococcus epidermidis* (64). En conclusion, le DTT pourrait présenter un intérêt pour le diagnostic des IOAP, en raison de sa facilité d'utilisation, de son faible coût, de sa non-toxicité et de ses bonnes sensibilité et spécificité.

### ***III.6.3. Apport de la sonication des matériels prothétiques***

Au niveau des conditions pré-analytiques, la SPILF recommande le broyage préalable des pièces opératoires solides, mais il existe un débat entre cette méthode et la sonication des prothèses. La sonication des implants vient du constat que les bactéries lors d'une IOAM sont à la fois intra-cellulaires, extra-cellulaires et enchâssées dans le biofilm. Cette étape préalable à la culture permettrait une extraction des micro-organismes du biofilm de la surface de l'implant et donc augmenterait la sensibilité de la culture. En pratique, l'implant prothétique est recueilli dans une jarre en polypropylène (Figure 14), il est soniqué dans un bain à ultrasons à basse fréquence (40kHz, ~5 min) pour préserver la viabilité bactérienne (Figure 15 et 16, page 51). Le liquide de sonication est alors mis en culture. L'interprétation de la culture positive est faite en fonction d'un seuil bactérien significatif (8).

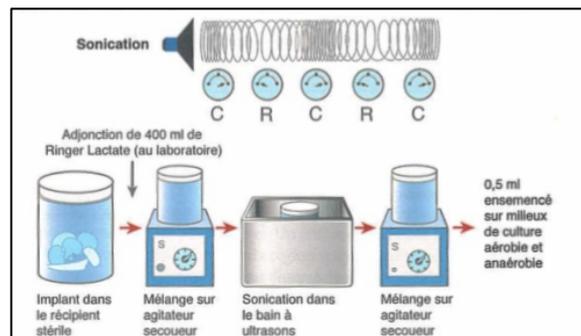


**Figure 14 : Exemple de boîte de transport stérile.**  
D'après Ochsner et al. (27)



**Figure 15 : Schéma de déroulement de la sonication.**

D'après <http://www.criogo.fr>



**Figure 16 : Schéma expliquant le principe de la sonication.**

D'après Ochsner et al. (27)

Les ultrasons pas alternativement d'une phase de compression (C) à une phase de raréfaction (R).

La publication princeps décrivant cette technique par Trampuz et al. date de 2007 (8). Elle montre que la culture des sonicats de prothèses est plus sensible que la culture conventionnelle (sans broyage), surtout chez les patients ayant reçu une antibiothérapie pendant les 14 jours précédents la chirurgie. En effet, les sensibilités de la culture conventionnelle et de la culture des sonicats sont respectivement de 60,8 % et 78,5 % alors que les spécificités s'avèrent semblables (99,2 % et 98,8 %). Concernant les patients sous antibiothérapie, pendant les 14 jours précédents la chirurgie, les sensibilités sont respectivement de 45,0 % et 75,0 % (65). Scorzolini et al. se sont intéressés uniquement aux

patients sous antibiothérapie dans les 15 jours précédents la chirurgie. Ils retrouvaient une meilleure sensibilité de la sonication par rapport à la culture conventionnelle avec des chiffres similaires à ceux de l'étude de Trampuz et al. (77,0 % *versus* 34,1 %). Par ailleurs, ils ont prouvé que la sensibilité de la sonication n'était pas affectée par le délai d'interruption des antibiotiques avant la chirurgie. En revanche, 90 % des bactéries détectées grâce à la sonication étaient des SCN. L'éternel problème de la contamination, engendrée par cette technique délicate, reste posée. Une étude de Portillo et al. a permis de comparer différentes méthodes de traitement des prothèses : soniquer *versus* vortexer, montrant un avantage certain de la sonication et un moindre intérêt de vortexer les prothèses (9).

Cette technique reste compliquée à mettre en œuvre (logistique de stérilisation des contenants). De plus, dans un contexte d'accréditation des laboratoires d'analyses médicales, il est difficile de mettre en place des contrôles de qualité. Le risque de contamination lors de la manipulation des prothèses demeure important d'où une adaptation des seuils d'interprétation des cultures à cinq UFC/ mL (Unité Formant Colonie). Il faut rester prudent et critique sur ces différentes études (Tableau 11) qui comparent des conditions pré-analytiques différentes et utilisent des conditions de cultures pas toujours optimales (durée d'incubation de sept jours, absence de broyage des prélèvements solides).

**Tableau 11 : Bilan de la littérature concernant la sonication et le diagnostic des IOAP.**

Publication	Sensibilité	Spécificité	Effectif	Commentaires
Trampuz et al. 2007 (8)	78,5 %	98,8 %	331 dont 76 IOAP	75 % de sensibilité en cas d'antibiothérapie préalable
Scorzolini et al. 2014 (65)	77 %	-	56 dont 41 IOAP	Antibiothérapie préalable / Hanche 94% vs genou 50%
Portillo et al. 2013 (9)	60 %	99 %	135 dont 35 IOAP	
Bogut et al. 2014 (66)	75 %	97 %	76 dont 22 IOAP	
Portillo et al 2014 (67)	81 %	99 %	231 dont 69 IOAP	
Portillo et al. 2015 (7)	100 %	-	75 dont 39 IOAP	Ensemencement en flacons d'hémoculture des sonicats
Shen et al. 2015 (68)	87 %	88 %	110 dont 50 IOAP	Ensemencement en flacons d'hémoculture des sonicats

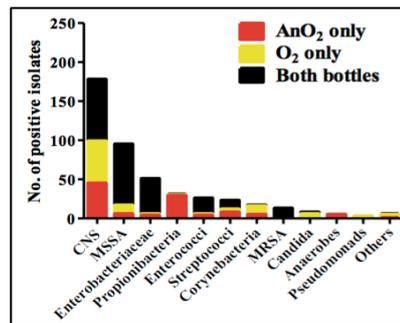
### ***III.6.4. Apport de l'ensemencement en flacon d'hémoculture***

Une autre méthode permettant d'augmenter les performances de la culture des prélèvements semble être l'ensemencement de flacon d'hémoculture directement à partir des broyats. L'avantage de cette technique serait pour les infections à faibles inocula, pour les patients ayant reçu des antibiotiques en pré-opératoire mais aussi pour réduire les délais de croissance afin d'obtenir une identification et un antibiogramme plus rapidement. Il reste à définir certaines modalités de cette technique : nature du flacon, nature des prélèvements à ensemercer, ensemencement au bloc opératoire ou au laboratoire. Ces questions, qui restent en suspens, concernent le risque de contamination et, par conséquent, la possibilité de Faux Positifs connus lors du diagnostic de bactériémies. Elles concernent également une éventuelle dilution des prélèvements dans le bouillon du flacon et le diagnostic des infections polymicrobiennes où probablement une espèce bactérienne prendrait le pas sur la ou les autre(s). Le temps technique supplémentaire conduit également à un surcoût de cette technique.

Jordan et al. ont conduit une étude rétrospective pour déterminer la sensibilité, la spécificité et les VPP / VPN de différentes techniques de culture (69). Ils ont comparé la culture des liquides articulaires de manière classique, à celle effectuée en flacons d'hémoculture puis à la culture des tissus per-opératoires lors de 219 ponctions dont seulement 33 se sont avérées positives. La sensibilité la plus élevée (85 %) a été retrouvée pour les flacons d'hémoculture comparée à celles de la culture conventionnelle des liquides articulaires (26 %) et des tissus (32 %). Les flacons utilisés étaient une paire d'hémoculture aérobie/anaérobie, les tissus per-opératoires n'étaient pas broyés avant ensemencement. Malheureusement, peu de patients (n=34) ont bénéficié des trois techniques. De plus, la marque des flacons, les types de milieux utilisés pour la culture traditionnelle et la durée d'incubation n'étaient pas détaillées dans la publication.

Minassian et al. ont également évalué, de manière prospective, cette technique de culture de tissus péri-prothétiques avec le système d'hémoculture BD BACTEC aérobie et anaérobie chez 332 patients subissant une révision de prothèse (70). Les flacons étaient incubés pendant 14 jours et repiqués si négatifs à la recherche de *Propionibacterium* spp. 79 patients répondaient à la définition des critères d'IOAP et 66 d'entre eux présentaient des

prélèvements positifs en culture, dans les trois premiers jours d'incubation (sauf pour un cas). Le repiquage à la recherche de *Propionibacterium* spp. a permis d'identifier un seul cas supplémentaire. La Figure 17 présente le nombre d'isolats positifs pour chaque nature de flacon selon le type de micro-organisme. Le graphique montre qu'une proportion importante des isolats n'aurait pas été détectée sans utilisation d'une paire de flacons.



**Figure 17 : Nombre d'isolats positifs dans un ou deux flacons d'hémoculture selon le type d'organisme.**  
D'après Minassian et al. (70) (Aérobie = O<sub>2</sub> et anaérobies = AnO<sub>2</sub>)

Une étude, plus récente, menée par le CRIOGO, publiée par Bémer et al., suggère la réalisation de quatre prélèvements per-opératoires uniquement et d'ensemencer chaque prélèvement avec trois milieux de culture : un flacon d'hémoculture aérobie, un milieu liquide anaérobie et une gélose chocolat (49).

### ***III.6.5. Apport de la culture du sonicat en flacon d'hémoculture***

L'ensemencement en flacon d'hémoculture des liquides articulaires et des broyats pourrait être une alternative intéressante pour obtenir un gain de sensibilité. Certains auteurs proposent de combiner la sonication des prothèses et l'ensemencement du sonicat dans un flacon d'hémoculture.

En effet, une étude de Portillo et al. a montré une sensibilité de 100 % de la culture du liquide de sonication, ensemencé en flacon d'hémoculture, contre 87 % pour la culture conventionnelle du sonicat et seulement 57 % pour la culture des tissus per-opératoires (sans broyage). Une antibiothérapie préalable pourrait diminuer la sensibilité de la culture des prélèvements per-opératoires (71) alors qu'avec cette technique de culture de sonicat en

flacon d'hémoculture, Portillo et al. ont montré une sensibilité de 100 % y compris lors d'une antibiothérapie préalable. De plus, le temps de positivité s'avère plus court avec cette méthode : détection de 72 % des micro-organismes après seulement un jour d'incubation des flacons contre 28 et 18 % pour respectivement, la culture traditionnelle des sonicats et des prélèvements per-opératoires (7).

Cette excellente sensibilité n'a pas été retrouvée dans l'étude de Shen et al. (68). Elle comparait les performances de l'ensemencement en flacon d'hémoculture des liquides articulaires et des sonicats. Les sensibilités étaient de 64 % et 88 %, respectivement et les spécificités de 98 % et 87 % et ce, quelle que soit l'administration ou non d'antibiotique en pré-opératoire.

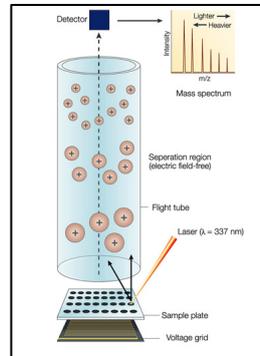
### ***III.6.6. Apport de l'incubation prolongée***

La durée d'incubation des cultures est également un élément clé du diagnostic des IOAM. En effet, les bactéries au contact de la prothèse se développent moins vite avec établissement d'une structure en biofilm protecteur, au sein duquel les cellules présentent un métabolisme ralenti. La durée d'incubation, la plus fréquemment rapportée, était de sept jours. Schäfer et al., dès 2008, ont prouvé que le taux de détection à sept jours était de 73,6 %. Toutefois, dans certains cas, la bactérie responsable de l'infection pouvait être retrouvée après 13 jours de culture. Les espèces à croissance rapide (essentiellement les staphylocoques ou les BGN) poussent lors de la première semaine d'incubation alors que les espèces dites à croissance lente (*Propionibacterium*, streptocoques déficients, Small Colonies Variant) sont détectées plus tardivement, au delà de la première semaine (sept à 14 jours) (72).

### ***III.6.7. Apport de l'identification par spectrométrie de masse type MALDI-TOF***

L'identification des SCN, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp. ou des *Propionibacterium* spp. était plutôt délicate et fastidieuse par méthode biochimique. Depuis déjà quelques temps, l'identification par spectromètre de masse a permis un gain de temps important et primordial dans le contexte des IOAP (73). Depuis 2005, la technologie MALDI-

TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) (Figure 18) a révolutionné l'étape d'identification des micro-organismes au laboratoire, soit après culture, soit directement à partir des prélèvements ensemencés en flacons d'hémoculture (74).



**Figure 18 : Principe de fonctionnement de la technologie MALDI-TOF**  
D'après <http://www.nature.com>

Cette technologie est plus rapide et moins coûteuse, une fois amorti le coût de l'investissement de l'appareil. Elle permet une interprétation plus rapide des cultures et ainsi la classification en pathogène ou contaminant, selon les recommandations. Le faible coût de cette méthode permet un gain en qualité de travail (moins d'hésitations à identifier : vérification facile et rapide des différents morphotypes).

### III.7. Nouvelles méthodes diagnostiques moléculaires

De nouvelles méthodes de diagnostics moléculaires sont mises en place afin de tenter de pallier au manque de sensibilité de la culture non optimisée. Barbari et al. ont mené une étude en 2007, concernant leurs IOAM non documentées, 53 % survenant sous antibiothérapie. Ils ont montré également que ces IOAM non documentées n'avaient pas un pronostic plus défavorable que les IOAM documentées (71). Un avantage des méthodes moléculaires est leur rapidité par rapport à la culture conventionnelle. De plus, ces techniques détectent l'ADN bactérien et ne nécessitent pas une bactérie viable, ce qui est "intéressant" en cas d'antibiothérapie préalable ou en cas à de bactéries à croissance difficile. Toutefois, cela peut aussi constituer un inconvénient, en détectant, des traces d'ADN bactérien *in situ*, parfois longtemps après l'infection (5).

### **III.7.1. Apport de la PCR ARN16S**

La PCR ARN 16S est une technique basée sur l'amplification et le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S. Elle se déroule en plusieurs étapes. Le premier temps correspond à l'amplification du gène bactérien de l'ARN 16S, suivi d'une étape de séquençage de ce gène et une comparaison de la séquence obtenue à celles disponibles dans les différentes banques de données électroniques. Cette technique est utile pour le diagnostic de nombreuses infections (75). Cependant, le procédé est extrêmement sensible et sujet à la contamination par de l'ADN étranger, le plus souvent par le biais des réactifs utilisés (76).

Marin et al. ont mené une étude en comparant la PCR 16S et la culture sur cinq prélèvements per-opératoires, par patient, chez 122 patients (497 prélèvements) dont 40 ayant des critères d'IOAP (11). Ils ont évalué le nombre requis d'échantillons positifs en culture et PCR 16S pour diagnostiquer une IOAP. Ils ont montré qu'il suffit d'avoir un seul prélèvement positif pour avoir une spécificité de 96,3 % et une VPP de 91,7 % comparables à celles obtenues lors d'une culture avec trois prélèvements positifs au même micro-organisme. Ils ont également démontré que si nous nous basons sur le critère d'au moins deux prélèvements positifs (recommandations de la SPILF), la sensibilité et la spécificité étaient de 94 % et 100 % pour la PCR 16S contre 96 % et 82 % pour la culture. En conclusion, pour les auteurs, la PCR 16S est plus spécifique et possède une VPP meilleure que la culture. Ainsi, un résultat de PCR 16S positif est fortement évocateur de IOAM, y compris lorsque peu d'échantillons sont analysés. Toutefois, la culture reste plus sensible.

Levy et Fenollar ont également tenté de définir la place de ces méthodes moléculaires dans le diagnostic des IOAP (77). Ainsi, il semble que la PCR 16S devrait être mise en œuvre quand les cultures sont restées négatives, malgré une forte suspicion clinique et un syndrome inflammatoire. Cet outil a permis d'augmenter le diagnostic des infections à bactéries anaérobies comme *F. magna* mais aussi la découverte de *Tropheryma whipplei* comme agent d'IOA, chez des patients ne souffrant pas de la maladie de Whipple. Pour ces auteurs, les PCR spécifiques en temps réel sont plus sensibles et plus spécifiques mais elles présentent l'inconvénient de ne détecter qu'un seul pathogène. Elles doivent donc être utilisées pour confirmer l'identification obtenue par une PCR large spectre type 16S ou en cas d'échec de celle-ci.

Lors d'une étude prospective incluant 2308 patients suspects d'IOA (non exclusivement sur prothèse), chaque échantillon a été cultivé pendant 15 jours et a bénéficié de PCR large spectre : 16S pour les bactéries, 18S pour les champignons, ainsi que de PCR spécifiques *S. aureus*, et *Kingella kingae*, en cas de prélèvements négatifs en culture (78). Les échantillons de 1567 patients (67,9 %) sont restés stériles en culture. La PCR était positive chez 141 patients (9 %). Les micro-organismes identifiés par PCR ont été classés en 2 groupes : les bactéries exigeantes (n = 35, bactéries anaérobies chez les patients adultes, et *K. kingae* chez les enfants) et les bactéries non exigeantes (n = 106, le plus souvent *S. aureus* : 32,7 %). La différence entre un résultat de PCR positif pour *S. aureus* et une culture négative a été expliquée par une antibiothérapie préalable dans 31,4 % des cas. L'étude a mis en évidence l'utilité de la PCR 16S pour le diagnostic des infections osseuses si les cultures sont négatives. Les auteurs recommandent l'utilisation de la PCR 16S pour les prélèvements à culture négative mais également la réalisation d'une PCR spécifique *S. aureus* pour les adultes et *K. kingae* pour les enfants.

Bjerkan et al. ont mené une étude prospective chez 54 patients, ayant subi une chirurgie pour descellement de prothèse (50). Aucun de ces patients n'avait reçu une antibiothérapie préalable. Une PCR 16S a été réalisée en parallèle de la culture. La stratégie visant à minimiser le risque de Faux Positif a été un succès puisque seulement deux résultats de la PCR se sont avérés positifs sur les 216 échantillons des patients négatifs (*Pseudomonas* spp. and *Zea mays*). Malgré une PCR très sensible, trois échantillons ayant un faible nombre de colonies en culture se sont révélés négatifs par PCR. Ceci est probablement due au volume réduit utilisé lors de la PCR par rapport à la culture et peut également être due à l'interférence de l'ADN humain présent dans les échantillons de tissus. Selon le protocole utilisé dans cette étude, la PCR 16S n'a pas identifié d'autres cas d'IOAP. Ils en concluent que si la culture est bien conduite, la PCR 16S n'apporte pas plus pour le diagnostic des IOAP.

Bémer et al. ont menée une étude prospective, multicentrique pour définir la place de la PCR 16S en routine (5). 264 patients suspects d'IOAP ont été inclus, ainsi que 35 témoins négatifs. Le diagnostic définitif de l'infection a été confirmé dans 215 des 264 cas suspects. Les mêmes critères bactériologiques ont été utilisés pour le diagnostic moléculaire :  $\geq 1$  échantillon positif pour les agents pathogènes stricts et  $\geq 2$  échantillons positifs pour les bactéries de la flore cutanée commensale. La sensibilité de la culture était de 89 % contre

73% pour la PCR 16S. La force de cette étude est le nombre important de cas d'infection confirmée inclus.

Le Tableau 12 résume les caractéristiques des différentes études portant sur le diagnostic par PCR 16S des IOAP.

**Tableau 12 : Tableau comparatif des différentes études sur le diagnostic par PCR 16S des IOAP.**

Publications	Sensibilité	Spécificité	Technique utilisée (amorces)	Type d'étude	Culture
Bjerkan et al. (2012) (50)	-	-	519F, 1105R, 966F, 1405R, 1175F et 1511R	monocentrique, prospective 54 patients	-
Marin et al. (2012) (11)	94 %	100 %	ARN16S : fD1 et rP2	monocentrique, prospective 122 patients (40 cas)	Se 96 % Sp 82 %
Levy et al. (2013) (78)	-	-	ARN16S : 536f, 536r, 800f, 800r, 1050f et 1050r ARN18S : CUF et CUR	monocentrique, prospective 2308 patients	-
Bémer et al. (2014) (5)	73,3 %	-	ARN16S : 27F, 685R3	multicentrique, prospective 304 patients : 269 cas (215 confirmés) 35 contrôles négatifs	Se 89 %

### III.7.2. Apport de la technologie GeneXpert®

La société Cepheid® (Sunnyvale, CA) a développé des kits de PCR en temps réel. Elle a créé une cassette dédiée au diagnostic des IOA (MRSA/SA SSTI) détectant directement à partir du broyat les staphylocoques dorés et la résistance à la méticilline (Figure 19, page 61). Ces PCR sont basées sur la détection des gènes *spa*, *SCCmec* et *mecA*. La cartouche comporte un module pour réaliser l'extraction adaptée aux tissus mous et donne une réponse en 56 minutes. Un contrôle interne (*Bacillus globigii*) est amplifié à chaque run. Le Tableau 13 résume les différentes performances de cette technique obtenues lors de diverses études.

**Tableau 13 : Comparaison des différentes études menées pour évaluer les performances de la technologie GeneXpert® MRSA/SA SSTI**

Etudes	n=	Type	<i>S. aureus</i> (Se/Sp)	SASM (Se/Sp)	SARM (Se/Sp)	SCNRM (Se/Sp)	Global par patient (Se/Sp)
Dubouix-Bourandy et al. 2011 (76)	105 patients 135 échantillons	Prospective	100/97,8	100/98,3	100/100	100/95,3	-
Titecat et al. 2012 (77)	30 patients 104 échantillons	Prospective	100/91,2	-	-	-	92,3/100
Lourdet-Hascoëtt et al. 2014 (78)	72 patients 72 échantillons	Rétrospective	-	-	-	36/98	-
Valour et al. 2014 (79)	76 patients 91 échantillons	Rétrospective	94,4/100	94,4/100	100/100	-	-

Dubouix-Bourandy et al. ont testé les performances de ce kit chez 105 patients (135 échantillons) souffrant ou non de diverses IOA lors d'une étude prospective. Ils ont montré une sensibilité et une spécificité respectivement (i) de 100 % et 98,3 % pour la détection des *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM), (ii) de 100 % et 100 % pour la détection des *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) et enfin (iii) de 100 % et 95,3 % pour la détection des SCN résistant à la méticilline (79). A noter que cette étude mélangeait différents types d'infections : IOAP, arthrite septique et spondylodiscite alors qu'elles ne sont pas exposées aux mêmes difficultés diagnostiques.

Cette méthode a également été évaluée pour le diagnostic des IOAP par Titécat et al. lors d'une étude prospective sur 104 prélèvements provenant de 30 patients (au moins trois échantillons par patient). La sensibilité globale par patient était de 92,3 % et la spécificité de 100 % quels que soit le micro-organisme (80). Cette étude présente l'avantage de ne pas avoir sélectionné que les infections à staphylocoques et d'évaluer les performances par patient mais également par échantillons.

Lourtet-Hascoëtt et al. ont voulu vérifier ces données concernant la détection des SCN résistants à la méticilline (SCN-RM) (81). De manière rétrospective, ils ont repris 72 prélèvements d'os et de liquide articulaire positifs à SCN-RM en culture et ont retrouvé une sensibilité de seulement 36 % et une spécificité de 100 %. 42 patients souffraient d'IOAP (32 à SCN-RM et 10 à *S. aureus*) alors que les 30 autres se sont révélés être des descellements aseptiques. La faible sensibilité de la technique dans cette étude pourrait être expliquée par l'analyse d'un unique prélèvement par patient.

Valour et al. ont comparé cette même technique à la culture conventionnelle à partir de 91 prélèvements ostéo-articulaires (76 patients), dont 24 liquides articulaires, 42 os et 25 tissus randomisés parmi une collection de 512 échantillons de culture négative et 276 échantillons positifs en culture à *S. aureus*. La sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 94,4 % et 100 %. Trois résultats Faux Positifs ont été observés pour des patients connus pour être infectés par *S. aureus* sur d'autres prélèvements ostéo-articulaires concomitants. Quatre résultats Faux Négatifs ont été observés et peuvent s'expliquer selon eux par la conception rétrospective de l'étude (étapes de congélation/décongélation) des échantillons). Les limites de cette étude étaient la sélection des infections uniquement à *S.*

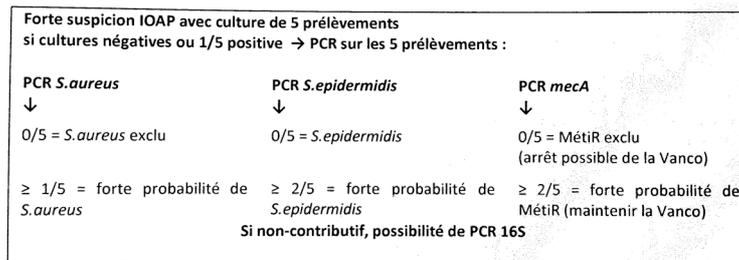
*aureus* et le recrutement rétrospectif des échantillons (82).



**Figure 19 : Exemple de cartouche et d'automate GeneXpert®**  
D'après <http://www.cepheid.com>

### **III.7.3. Apport des PCR spécifiques**

L'équipe du CRIOGO a menée une étude pilote, rétrospective, afin d'évaluer les performances de PCR spécifiques détectant les staphylocoques et la résistance à la méticilline, dans le cadre du diagnostic des IOAP (83). 41 patients ont été inclus dont 21 présentant une infection à staphylocoque retrouvé en culture. Pour chaque patient, les résultats de la culture des prélèvements préalablement broyés ont été comparés à ceux de quatre PCR spécifiques ciblant les staphylocoques : gène *tuf* pour le genre *Staphylococcus*, gène *nuc* pour *S. aureus*, gène *atlE* pour *S. epidermidis* et le gène *mecA* pour la résistance à la méticilline. Les sensibilité et spécificité des PCR étaient respectivement de 75 % et 86 % pour le gène *tuf*, de 100 % et 97 % pour le gène *nuc*, de 100 % et 94 % pour le gène *atlE*, et de 100 % et 92 % pour le gène *mecA*. La concordance entre les PCR et la culture était de 88 %. Les cas discordants étaient repartis ainsi : quatre patients avec des prélèvements uniquement positifs par PCR et un patient dont les prélèvements étaient positifs uniquement en culture. Suite à cette étude, l'équipe conseille de suivre un algorithme en cas de forte suspicion d'IOAP, alors que les cultures restent stériles ou non informatives (Figure 20, page 62).



**Figure 20 : Algorithme décisionnel en cas de cultures négatives ou non contributives.**

D'après Michaud et al. (83)

Malgré un effectif faible, cette démarche semble être applicable en pratique quotidienne, en deuxième intention, après échange en RCP.

Vandercam et al. ont conduit une étude pour envisager la place des méthodes de biologie moléculaire dans le diagnostic des IOAP (84). Ils ont comparé la culture conventionnelle à la PCR 16S combinée à une PCR du gène *femA* spécifique des staphylocoques. En cas d'amplification du gène *femA*, une PCR *mecA* était réalisée. 41 patients ont été inclus pour une reprise de prothèse. 34 souffraient réellement d'IOAP et 22 présentaient une culture positive des prélèvements per-opératoires. Les résultats montrent une sensibilité plus élevée des techniques moléculaires combinées (ARN16S et *femA*) de 91,2 % contre 64,7 % pour la culture et ceci tout particulièrement chez les patients ayant reçu une antibiothérapie. Le coût de ces techniques moléculaires combinées est de 93 € par échantillons. A noter que les conditions de culture utilisées n'étaient pas optimales, incubation seulement d'une semaine et absence de broyage préalable, d'où une plus faible sensibilité de la culture.

### **III.7.4. Apport des PCR multiplexes spécifiques**

Des PCR multiplexes peuvent être utilisées dans le diagnostic de multiples types d'infections, ce sont soit des PCR dites « maison », c'est-à-dire élaborées au laboratoire avec des amorces ciblant les gènes bactériens d'intérêt, soit des PCR *via* des kits commerciaux prêts à l'emploi. Les limites de ces techniques par rapport à la PCR 16S sont qu'elles ciblent un panel plus ou moins restreint de micro-organismes. Dans les deux cas, les performances de la technique doivent être connues et/ou évaluées.

Cazanave et al. ont testé une PCR multiplexe « maison » directement sur le liquide de sonication. Ils ont étudié 434 patients dont 144 souffrant d'IOAP (hanche et genou), en comparant les résultats de la culture conventionnelle (sans broyage préalable) des prélèvements per-opératoires, à ceux de la culture des liquides de sonication et à ceux de leur PCR multiplexe dite « maison » ciblant dix espèces/groupe bactériens (85). Les détails des gènes détectés par cette PCR sont répertoriés dans la Figure 21. Ce panel semble convenir au diagnostic des IOAP en regard à l'épidémiologie bactérienne retrouvée dans ce type d'infection, mais la réponse donnée par cette technique est peu précise (ex : *Staphylococcus*) et nécessite l'emploi d'une seconde technique pour pouvoir appliquer les critères des sociétés savantes. De plus, cette technique ne détecte pas la méticillino-résistance, information primordiale pour adapter l'antibiothérapie. La sensibilité et la spécificité de ces différentes méthodes étaient respectivement de 70,1 % et 97,9 % pour la culture des tissus, 72,9 % et 98,3 % pour la culture des sonicats et 77,1 % et 97,9 % pour la PCR à partir des sonicats. Cette dernière est plus sensible et permet un résultat rapide, le jour de la chirurgie, dans le cadre d'une organisation adaptée à la routine. Toutefois, ce type de technique pose un problème dans le contexte d'accréditation des laboratoires de Biologie Médicale, en raison d'un manque d'évaluation, de standardisation et de contrôles de qualité interne et externe.

Organismes ciblés	Gènes ciblés
<i>Staphylococcus</i>	<i>tuf</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>rpoB</i>
<i>Enterococcus/Granulicatella/Abiotrophia</i>	<i>rpoB</i>
Enterobactéries	<i>rpoB</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>gyrB</i>
<i>B. fragilis</i> group	<i>leuB</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>kinase</i>
Cocci Gram positif anaérobie	<i>ARN 16S</i>
<i>Propionibacterium/Actinomyces</i>	<i>ARN 16S</i>

**Figure 21 : Panel de la PCR maison utilisée avec les gènes d'intérêt correspondants.**  
D'après Cazanave et al. (85)

De même, Portillo et al. ont mené une étude similaire en comparant les résultats de la culture des tissus per-opératoires, à ceux de la culture des sonicats et à ceux de la PCR multiplexe réalisée à partir du liquide de sonication (86). Cette étude comportait 86 prothèses (genou, hanche, coude et épaule), 24 patients souffraient réellement d'IOAP. La PCR multiplexe commerciale SeptiFast® de Roche Diagnostics était dérivée de celle utilisée lors de la détection des bactériémies. Le panel détecté est répertorié dans la Figure 22. Il a l'avantage de détecter certaines espèces fongiques (*Aspergillus* et *Candida*) et de différencier le *S.*

*aureus* des SCN. En revanche, il ne comporte pas la détection de *P. acnes*, des corynébactéries, des streptocoques déficients (*Granulicatella*, *Abiotrophia*) et du gène codant pour la métilino-résistance. La sensibilité et la spécificité de la PCR à partir du sonicat étaient de 96 et 100 % contre 67 et 98 % pour la culture des tissus péri-prothétiques et 71 et 100 % pour la culture des sonicats. Cette différence était plus importante chez les patients ayant déjà reçu des antibiotiques.

Ces deux précédentes études comparent la culture des sonicats en utilisant un seuil  $\geq 50$  UFC/mL à des PCR multiplexes à partir de ces même sonicats qui n'intègrent pas de seuil de positivité dans leur rendu de résultats.

Gram (-)	Gram (+)	Fungi
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)</i>	SCN	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Enterobacter (cloacae/aerogenes)</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		
<i>Acinetobacter baumannii</i>		

**Figure 22 : Panel de la PCR multiplexe SeptiFast® Roche Diagnostics**

D'après Portillo et al. (86)

Une équipe coréenne a testé un autre kit commercial nommé Seeplex Sepsis screening assay (Seegene Inc., Séoul, Corée) à partir de 80 liquides articulaires issus de patients suspects d'arthrite septique dont seulement 20 étaient positifs en culture (87). Cette PCR multiplexe a été comparée à la culture conventionnelle des liquides synoviaux et à une PCR universelle de type 16S. Cette technique comporte deux étapes, une phase de screening et en cas de positivité une étape d'identification, elle dure entre 3,5 et 6 heures. Les micro-organismes détectés sont nombreux (n=64) et sont répertoriés dans la Figure 23. Dans ce panel, il manque les *Propionibacterium spp.*, les *Corynebacterium spp.* et la détection de gènes de résistance. La sensibilité et la spécificité de la PCR multiplexe étaient respectivement de 92,9 et 100 % et le taux de concordance était de 91,3 % avec la culture et de 96,3 % avec la PCR 16S.

Staphylococcus spp. (22)	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> et 19 autres <i>Staphylococcus spp.</i>
Streptococcus spp. (24)	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. mitis</i> et 20 autres <i>Streptococcus spp.</i>
Enterococcus spp. (2)	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
BGN (10)	<i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i>
Fungi (6)	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>A. fumigatus</i>

**Figure 23 : Panel Seeplex Sepsis® screening assay**

D'après Kim et al.(87)

### III.7.5. Apport des puces à ADN

La technologie des puces à ADN qui combine amplification par PCR multiplexe et hybridation sur sonde apparaît comme une alternative particulièrement intéressante. Allais E. a évalué les performances d'un kit commercial (Prove-it™ Sepsis, Mobidiag, Helsinki), dans le diagnostic étiologique des IOA (10). Initialement développé pour la détection de bactéries directement dans les flacons d'hémocultures pour lesquels l'automate a détecté une croissance microbienne, ce test moléculaire permet de mettre en évidence et d'identifier plus de 50 bactéries, ainsi que le gène de résistance à la méticilline (Figure 24). De manière rétrospective, sur 130 prélèvements ostéo-articulaires positifs en culture ou par PCR 16S, cette technique a permis d'obtenir un diagnostic dans seulement 62,3 % des cas. C'est un test simple qui permet une détection rapide (moins de 24 heures) des principales espèces bactériennes responsables d'IOA et des infections polymicrobiennes. L'optimisation des étapes du protocole ainsi que l'élargissement du panel de bactéries détectées à d'autres agents classiquement isolés au cours des IOA, comme *P. acnes*, pourraient faire de cette nouvelle technologie une alternative à la PCR universelle dans le diagnostic bactériologique des IOA.

Gram-	Bacterial content	Gram+
<i>Acinetobacter baumannii</i>		<i>mecA</i> methicillin resistance marker
<i>Enterobacter aerogenes</i>		<i>vanA</i> vancomycin resistance marker**
<i>Enterobacter cloacae</i>		<i>vanB</i> vancomycin resistance marker**
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Haemophilus influenzae</i>		<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Kingella kingae</i> *		<i>Enterococcus casseliflavus</i> **
<i>Klebsiella oxytoca</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>		<i>Enterococcus gallinarum</i> **
<i>Proteus mirabilis</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Proteus vulgaris</i>		<i>Propionibacterium acnes</i> *
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Serratia marcescens</i>		<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subspecies <i>equisimilis</i>
<i>Bacteroides fragilis</i> group		<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>		<i>Streptococcus pyogenes</i>
Enterobacteriaceae		
<i>Neisseria sp. non-meningitidis</i>		Coagulase negative <i>Staphylococcus</i>
		Fungal content*
		<i>Candida albicans</i>
		<i>Candida lusitanae</i>
		<i>Candida dubliniensis</i>
		<i>Candida parapsilosis</i>
		<i>Candida glabrata</i>
		<i>Candida tropicalis</i>
		<i>Candida guilliermondii</i>
		<i>Candida krusei</i>
		Pan-Yeast

Figure 24 : Panel de la technologie Prove-it® Sepsis.

D'après <http://old.mobidiag.com/> (88)

## **2<sup>ème</sup> partie : Etude expérimentale**

## **I. Objectif**

Dans le cadre du diagnostic des IOAP, il n'existe pas de « Gold Standard ». La contribution des méthodes de biologie moléculaire en pratique quotidienne reste à définir. L'arrivée sur le marché de kits « prêts à l'emploi » de PCR multiplexes spécifiques pourrait avoir un intérêt dans le diagnostic des IOAP. Dans ce contexte, nous souhaitons évaluer un test commercial pour en expertiser les capacités sur un panel conséquent de prélèvements préalablement analysés en culture et par PCR universelle 16S (5)(49). L'objectif de ce travail de thèse a été de réaliser une étude rétrospective multicentrique afin d'évaluer les performances d'une nouvelle méthode de biologie moléculaire dans le diagnostic des IOAP. Cette méthode ITI (Implant and Tissue Infection) Unyvero commercialisée par la société Curetis® consiste en une PCR multiplexe combinée permettant de détecter plusieurs micro-organismes et gènes de résistance, et ceci directement à partir des prélèvements ostéo-articulaires en moins de cinq heures.

Dans un premier temps, nous comparerons les résultats obtenus à ceux de la culture qui constitue la méthode la plus classiquement utilisée. Le choix d'une culture optimisée, par un broyage préalable des prélèvements, a été naturel en raison des précédentes études démontrant l'intérêt de cette étape pré-analytique.

Dans un second temps, nous comparerons cette nouvelle méthode de biologie moléculaire à la PCR ARN16S qui avait déjà été effectuée préalablement sur ces échantillons lors de l'étude MICROBIOS I.

L'objectif était de pouvoir analyser le degré de concordance de ces trois techniques et de proposer éventuellement une conduite à tenir, en l'absence de Gold Standard dans le diagnostic microbiologique des IOAP.

## **II. Matériels et méthodes**

### **II.1. Caractéristiques des prélèvements sélectionnés pour l'étude**

Le CRIOGO a réalisé un PHRC évaluant l'intérêt de la PCR ARN 16S dans le diagnostic des IOA (5). Ce premier travail de recherche, intitulé MICROBIOS I, s'est déroulé entre 2010 et 2012 au sein des sept CHU/CHG de l'inter-région Ouest (Angers, Brest, Nantes, Orléans, Poitiers, Rennes et Tours). Cette étude prospective multicentrique a inclus 264 patients suspects d'IOA. Pour chaque patient inclus, cinq prélèvements per-opératoires ont été prélevés d'une part, pour la mise en culture et, d'autre part, pour la détection moléculaire par amplification puis séquençage du gène codant pour l'ARN 16S. Pour chacun des patients, les cinq prélèvements per-opératoires étaient de nature variée : hématome, liquide articulaire, liquide synovial, tissu sous-cutané, fausse membrane, tissu au contact de matériel, tissu sous-aponévrotique, tissu capsulaire, os cortical ou os spongieux. A noter, que pour valider ce protocole, 35 patients témoins (contrôles négatifs) avaient également été inclus.

A partir des 264 patients suspects d'infection ostéo-articulaire, mono- ou polymicrobienne sur matériel (genou, hanche, épaule ou coude), nous avons été en mesure d'analyser les prélèvements de 251 patients, soit 484 échantillons parmi les 1320 prélèvements (264x5), en respectant, sur le plan méthodologique, une égale répartition des natures de prélèvements, après tirage au sort. En effet, une étude de la totalité des échantillons aurait été idéale mais beaucoup trop onéreuse.

Parmi ces 484 échantillons randomisés, l'aliquote congelée s'est avérée insuffisante en quantité pour 34 d'entre eux (c'est-à-dire  $180 \mu\text{L} \times 2$ ). Par, ailleurs, dix autres ont fourni un résultat correspondant à un échec critique selon les critères d'interprétation fixés lors de notre étude (Figure 29, page 76). Au total, 440 prélèvements étaient interprétables. La Figure 25, page 69, représente le schéma de l'étude.

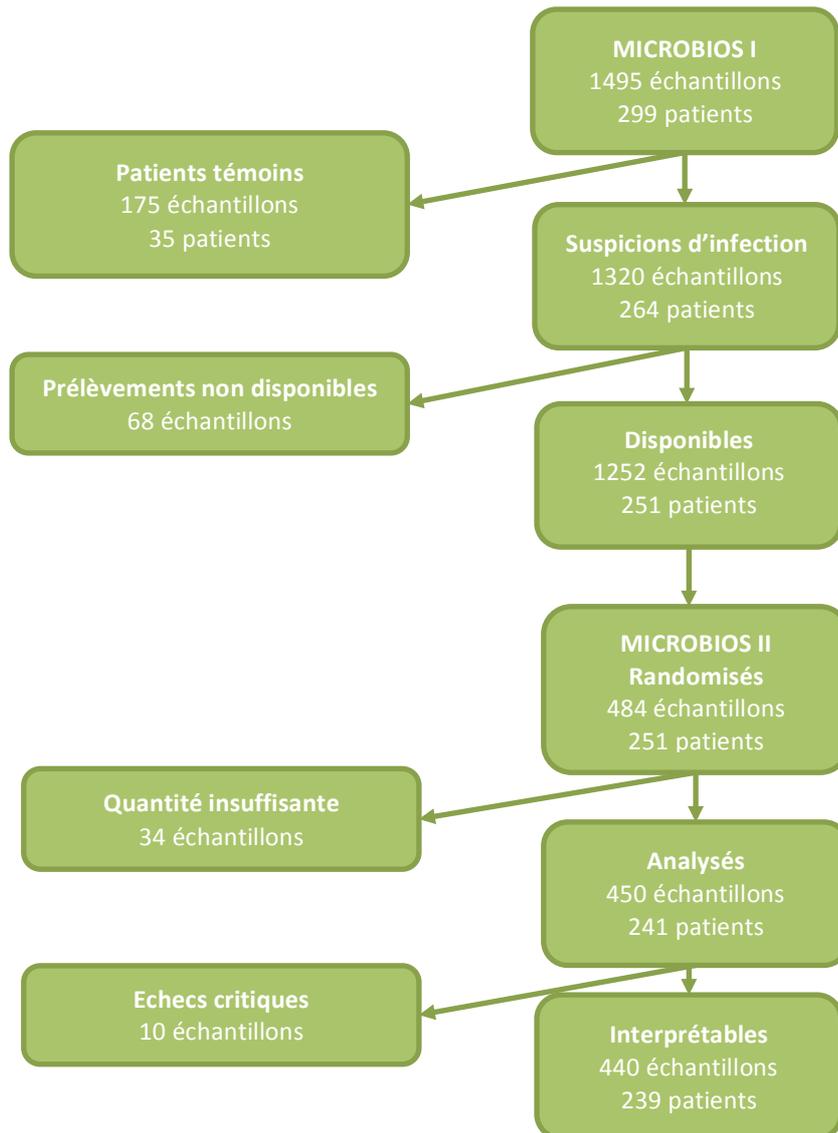


Figure 25 : Algorithme des prélèvements randomisés et analysés.

## II.2. Culture

En pratique, le protocole de mise en culture préconisé dans les laboratoires était le suivant : nous ajoutions 10 mL d'eau stérile ainsi que 10 billes d'acier stériles de 4 mm de diamètre au prélèvement puis l'ensemble était vortexé pendant deux minutes et 30 secondes, à 30 Hz avec un broyeur à billes de type MM401 (Retsch®, Haan, Allemagne).

- Les milieux liquidesensemencés (2 mL) étaient un flacon d'hémoculture

pédiatrique (Becton Dickinson<sup>®</sup>, Franklin Lakes, US) et un bouillon Schaedler en anaérobiose (bioMérieux<sup>®</sup>, Marcy-L'Etoile, France). Ces milieux étaient incubés à 37°C. En cas de trouble du bouillon anaérobie ou systématiquement au bout de 14 jours, il était repiqué sur gélose au sang (bioMérieux<sup>®</sup>) en anaérobiose et incubé pour 72h, à 37°C.

- Trois milieux solides étaient ensemencés avec 50 µL de broyat, une gélose au sang (bioMérieux<sup>®</sup>), une gélose chocolat Polyvitex (bioMérieux<sup>®</sup>), incubées sept jours à 37°C sous 5 % CO<sub>2</sub> et une autre gélose au sang (bioMérieux<sup>®</sup>), incubée en anaérobiose, pendant cinq jours, à 37°C.

Les bactéries retrouvées étaient identifiées selon les méthodes classiquement utilisées au laboratoire. La sensibilité aux antibiotiques était déterminée en suivant les recommandations de l'EUCAST ([https://eucast.org/clinical\\_breakpoint](https://eucast.org/clinical_breakpoint)).

Les critères d'interprétation des cultures utilisés étaient ceux de l'IDSA (47). Les cultures étaient donc considérées positives si :

- Un pathogène strict (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, Enterobactéries...) était retrouvé dans au moins un des cinq prélèvements per-opératoires ;
- Un commensal de la peau (SCN, *P. acnes*...) était retrouvé dans au moins deux des cinq prélèvements per-opératoires.

### II.3. PCR 16S

Une PCR universelle de type 16S a été réalisée en parallèle de la culture, à partir des mêmes broyats pour les cinq échantillons de chaque patient. 50 µL de protéinase K (C = 2g/L) étaient ajoutés à 200 µL de broyat et le mélange était incubé pendant trois heures à 65°C. Ensuite, une étape d'extraction des acides nucléiques a été réalisée, soit de façon automatisée sur différents automates en fonction des centres (MagNA Pure, Roche<sup>®</sup>, Mannheim, Allemagne ; EasyMag, bioMérieux<sup>®</sup> Marcy-L'Etoile, France ; IPrep, Invitrogen<sup>®</sup>, Saint Aubin, France), soit de façon manuelle (Qiagen, Hilden, Allemagne). La PCR 16S en temps réel a été réalisée en ciblant la partie 5' du gène codant pour l'ARN 16S : amorce sens 27F, 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'; amorce anti-sens 685R3, 5'-TCT RCG CAT

TYC ACC GCT AC-3'; conduisant à l'amplification d'un fragment de 658 bp; (GenBank accession number [NR024570](#)), détecté par du SYBRGreen. L'amplicon correspondant était alors séquencé dans les deux sens. La séquence obtenue a été comparée à celles contenues dans les bases de données BIBI (Bioinformatics Bacteria Identification, <https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>) et BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Des contrôles négatifs et positifs ont été analysés, en parallèle, de chaque série d'échantillons. Afin de contrôler l'extraction d'ADN et confirmer l'absence d'inhibiteur de PCR, un fragment du gène codant pour la  $\beta$ -globine humaine était amplifié pour chaque prélèvement. Lors de la détection d'inhibiteurs de PCR, l'analyse était refaite après dilution au 1/10<sup>e</sup>. Un patient dont deux ou plus de deux échantillons révélaient la présence d'inhibiteurs, était exclu de l'étude. Les critères utilisés pour le diagnostic moléculaire étaient les mêmes que ceux utilisés pour la culture (cf. II.2, page 69), c'est-à-dire ceux de l'IDSA 2012 (47).

## **II.4. PCR multiplexe Curetis<sup>®</sup>**

### ***II.4.1. Principe de fonctionnement de l'automate***

L'automate Unyvero de la société Curetis<sup>®</sup> (Holzgerlingen, Allemagne) est constitué de trois modules représentés à la Figure 26, page 72 : un Lysator, un Analyzer et un Cockpit.

Le module Lysator permet une lyse des prélèvements, grâce à l'association de plusieurs méthodes : chimique, thermique, mécanique et enzymatique, notamment par l'utilisation de protéinase K. Le module Analyzer permet l'extraction de l'ADN, son amplification et sa détection au sein d'une même cartouche. Le tout est coordonné par une unité centrale, le Cockpit qui constitue l'interface utilisateur.

Cet automate présente l'avantage d'une prise en main rapide, d'une utilisation aisée, ainsi qu'une traçabilité complète, *via* un système de code matriciel data matrix dit Quick Response (QR code), indispensable dans un contexte d'accréditation et d'assurance qualité des laboratoires.



Figure 26 : Présentation du Lysator, du Cockpit et de l'Analyzer du système Unyvero Curetis®, de droite à gauche.

L'automate a été utilisé selon les recommandations du fabricant. Son mode opératoire est simple, et résumé Figure 27. 180 µL de prélèvement ont été transférés du tube sérothèque patient (congélation des échantillons broyés) dans un tube échantillon pour analyse. Ce dernier a été placé dans le module Lysator. Cette étape de lyse dure 30 minutes. Le tube échantillon prétraité a ensuite été inséré dans une cartouche, ainsi qu'un tube de mastermix, contenant la Taq polymérase, préalablement décongelé (conservation à -20°C). Enfin, la cartouche a été insérée dans l'Analyzer pour une durée d'environ quatre heures et demie. Au total, l'analyse dure donc cinq heures. A noter que l'analyse a été réalisée sur les broyats congelés à -80°C et que l'extraction d'ADN a été réalisée par l'automate.

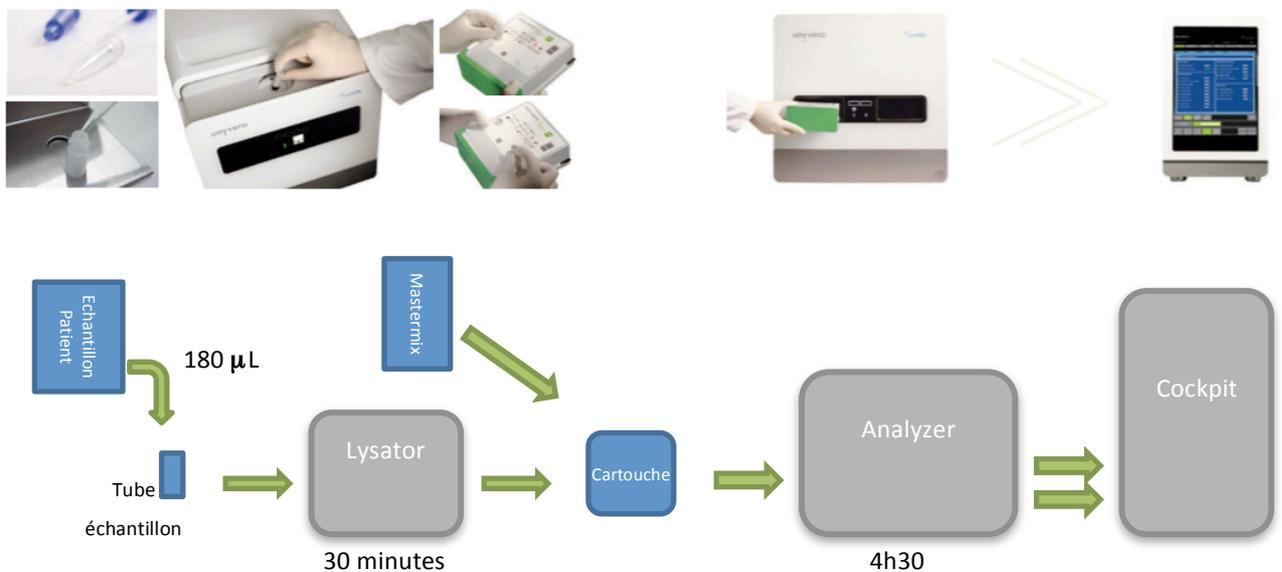


Figure 27 : Mode opératoire du système Unyvero Curetis®.

#### II.4.2. Principe de fonctionnement des cartouches

La cartouche ITI (Implant and Tissue Infection) représentée Figure 28 est divisée en plusieurs parties : des modules de réactifs, une colonne d'extraction, huit chambres de PCR contenant les amorces spécifiques ciblant les différents gènes permettant la détection d'une ou plusieurs espèce(s) bactérienne(s) ou d'un ou plusieurs gène(s) de résistance aux antibiotiques. La cartouche contient le tampon de purification de l'ADN, les réactifs, amorces et marqueurs fluorescents pour la PCR et les sondes d'hybridation.

La cartouche intègre toutes les étapes de l'analyse. Elle permet l'extraction de l'ADN, la réalisation de huit réactions de PCR multiplexes semi-quantitatives en point final, et la détection des amplicons par hybridation. Une série d'images de l'hybridation est prise par un appareil photo à fluorescence. Elles sont exploitées *via* le logiciel Unyvero. Enfin, la semi-quantification est conduite par une évaluation de l'intensité par un système de croix (+, ++, ou +++).

Un contrôle interne (gène synthétique sans homologie majeure avec des séquences connues) est testé en parallèle dans chacune des chambres de PCR afin de vérifier les étapes de purification et amplification de l'ADN.

Cette cartouche permet la détection de 52 pathogènes différents, et l'identification à l'espèce de 15 bactéries et levures. Ils sont représentés dans le Tableau 14 page 74. La cartouche ITI permet également la mise en évidence de 19 gènes de résistance aux antibiotiques répertoriés dans le Tableau 15, page 74.



Figure 28 : Exemple d'une cartouche ITI (Implant and Tissue Infection) Curetis®.

**Tableau 14 : Liste des micro-organismes détectés intégrés au panel du système Unyvero ITI Curetis®.**

Groupe	Agent pathogène	Groupe	Agent pathogène
Cocci à Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Variants déficients	<i>Granulicatella adiacens</i>
	Staphylocoques à coagulase négative <sup>1</sup>		<i>Abiotrophia defectiva</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Corynébactéries	<i>Corynebacterium</i> spp. <sup>6</sup>
	<i>Streptococcus pyogenes</i> <sup>2</sup>	Bacilles non fermentant	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>		Complexe <i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Enterococcus</i> spp. <sup>3</sup>		<i>Propionibacterium acnes</i>
Entérobactéries	<i>Escherichia coli</i>	Bactéries anaérobies	<i>Propionibacterium avidum/granulosum</i>
	Complexe <i>Enterobacter cloacae</i>		<i>Finexgoldia magna</i>
	<i>Enterobacter aerogenes</i>		Bactéroïdes du groupe <i>fragilis</i> <sup>7</sup>
	<i>Proteus</i> spp. <sup>4</sup>		Levures
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>5</sup>	<i>Candida albicans</i>	

1. *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus* subsp *saprophyticus*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. xylosus*
2. *S. pyogenes*, *S. dysgalactiae* subsp *equisimilis*
3. *E. casseliflavus*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. sulfurens*, *E. saccharolyticus*, *E. mundtii*, *E. gallinarum*, *E. flavescens*, *E. durans*, *E. dispar*, *E. columbae*, *E. cecorum*, *E. asini*
4. *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. penneri*, *P. hauseri*
5. *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*
7. *C. genitalium*, *C. jeikeium*, *C. aurimucosum*, *C. singular*, *C. amycolatum*
8. *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. uniformis*

**Tableau 15 : Liste des gènes de résistance intégrés au panel du système Unyvero ITI Curetis®.**

Type bactérie	Marqueur	Résistance
Cocci Gram +	<i>bla<sub>mecA</sub></i>	Oxacilline/Méticilline
	<i>bla<sub>mecC</sub></i>	Oxacilline/Méticilline
	<i>aac(6')/aph(2'')</i>	Aminosides
	<i>ermA</i>	Macrolides
	<i>ermC</i>	Macrolides
	<i>vanA</i>	Glycopeptides
	<i>vanB</i>	Glycopeptides
	<i>rpoB</i>	Rifampicine
Bacilles Gram -	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	Céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération
	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	Carbapénèmes
	<i>bla<sub>IMP</sub></i>	Carbapénèmes
	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	Carbapénèmes
	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	Carbapénèmes
	<i>aacA4</i>	Aminosides
	<i>gyrA</i>	Fluoroquinolones
	<i>bla<sub>OXA-23</sub></i>	Carbapénèmes
	<i>bla<sub>OXA-24</sub></i>	Carbapénèmes
	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	Carbapénèmes
<i>bla<sub>OXA-58</sub></i>	Carbapénèmes	

Le Tableau 16, page 75, indique la répartition des micro-organismes et des gènes de résistance dont la détection est réalisée, dans chacune des huit chambres de PCR indépendantes entre elles. Pour des raisons techniques, notamment de température d'hybridation des couples d'amorces, de proximité des séquences nucléotidiques, etc., une

optimisation de la mise au point des PCR a été réalisée par le département Recherche et Développement de la société Curetis®.

**Tableau 16 : Distribution des pathogènes et gènes de résistance détectés par chambre dans la cartouche ITI Curetis®.**

Chambre 1	Chambre 2	Chambre 3	Chambre 4
<i>Proteus</i> spp.	<i>gyrA</i> ( <i>E. coli</i> )	<i>ermA</i>	<i>ermC</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	Complexe <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>vanA</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	Staphylocoques à coagulase négative
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	<i>Granulicatella adiacens</i>
<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Finegoldia magna</i>	Bactéroïdes du groupe <i>fragilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Complexe <i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Streptococcus pyogenes</i>
Chambre 5	Chambre 6	Chambre 7	Chambre 8
<i>gyrA</i> ( <i>E. coli</i> )	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>bla</i> <sub>mecC</sub>
<i>bla</i> <sub>mecA</sub>	<i>Propionibacterium avidum/granulosum</i>	<i>rpoB</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-24</sub>
<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>vanB</i>	<i>aac(6'')/aph(2'')</i>
<i>Corynebacterium</i> spp.		<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Candida albicans</i>		<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>		<i>Candida parapsilosis</i>	

### II.4.3. Méthodologie de l'étude

L'outil que nous avons eu l'opportunité de tester est en cours d'optimisation, soulignant la difficulté de mise au point d'une telle technique (PCR multiplexes) dans le domaine des IOA. En effet, en raison d'un taux d'échec important dans certaines chambres de PCR (notamment en tout début de protocole), nous avons choisi de classer les chambres en fonction de la pertinence épidémiologique des bactéries et des gènes de résistance contenus dans ces dernières. Nous avons donc considéré comme critiques quatre chambres (numéros 1, 2, 4 et 5). Ces chambres détectent les pathogènes les plus fréquemment isolés (*S. aureus*, SCN), et révèlent également la présence de bactéries à croissance difficile comme *P. acnes*, *Finegoldia magna*, *Abiotrophia defectiva* et *Granulicatella adiacens*. Enfin, la chambre 5 contient la PCR qui permet la détection de la résistance à la méticilline. Par conséquent, nous avons considéré les autres chambres (numéros 3, 6, 7 et 8) comme non critiques. Lors de l'analyse des prélèvements, nous avons mis en place une méthodologie permettant d'exploiter les résultats. En effet, si au cours du premier passage, aucune des chambres critiques n'était en échec, l'interprétation des résultats obtenus était possible. En revanche, si une ou plusieurs

chambre(s) critique(s) étai(en)t en échec, nous avons décidé de réaliser un second passage. Lors de celui-ci, si aucune chambre critique n'était en échec, l'interprétation des résultats obtenus était licite. Si une ou plusieurs chambre(s) critique(s) étai(en)t à nouveau en échec, nous avons considéré ce prélèvement comme non interprétable.

Nous trouvons également important le résultat de la présence d'un gène codant pour une  $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE) de type *bla*<sub>CTX-M</sub> (chambre 3). Nous avons tout de même écarté cette chambre sachant qu'aucune entérobactérie productrice de BLSE n'a été retrouvée dans la cohorte MICROBIOS I. Cette méthodologie d'interprétation validée par l'équipe de biostatistique/méthodologie de Tours a permis de définir un arbre décisionnel présenté Figure 29.

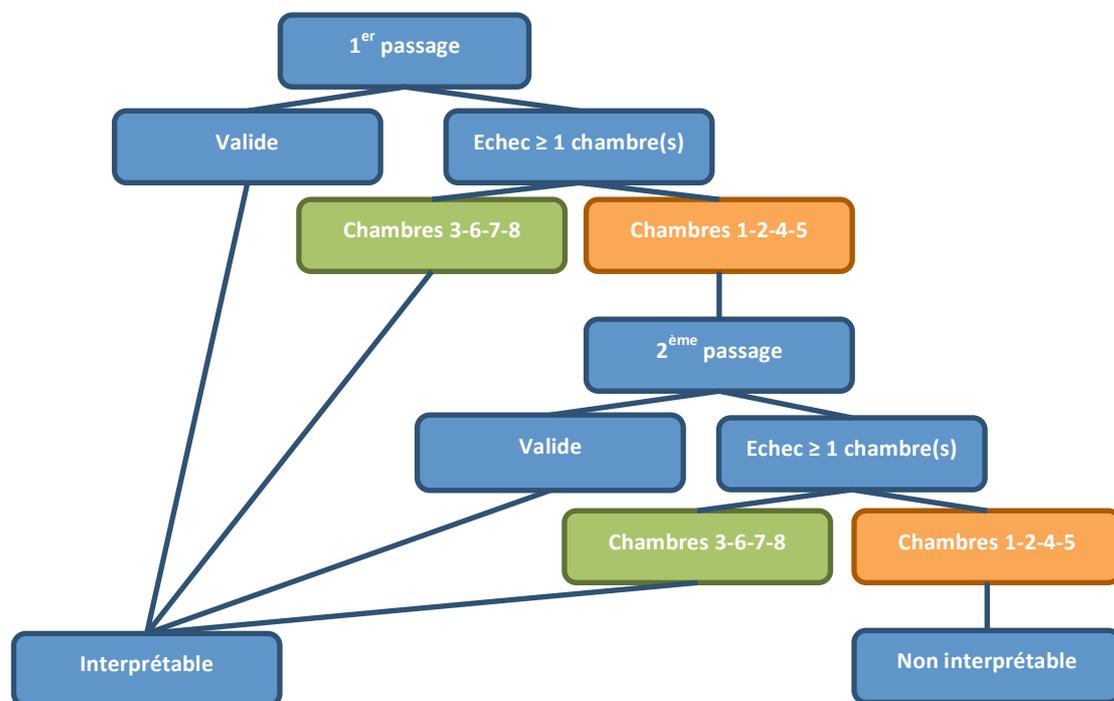


Figure 29 : Arbre décisionnel représentant la méthodologie utilisée pour l'analyse des résultats.

Interprétation des résultats : Pour chaque prélèvement, nous avons comparé les résultats de la PCR multiplexe combinée Curetis<sup>®</sup>, à ceux de la culture et de la PCR 16S. Les critères de concordance choisis étaient :

- une quantification supérieure au seuil défini par le fournisseur en fonction de la nature des prélèvements ;

- une concordance d'identification au moins au genre ou au groupe de bactéries (SCN, *Proteus* spp., *Enterococcus* spp.) ;
- une concordance complète de toutes les bactéries identifiées en cas d'infection poly-microbienne.

En fin d'analyse, une version 2 (V2) de la technologie Curetis<sup>®</sup>, nous a été proposée. Nous avons décidé de réaliser quelques analyses complémentaires seulement sur un faible échantillonnage.

### **III. Résultats**

En raison de la méthodologie utilisée, il était nécessaire qu'il reste au moins 2 x 180µL pour effectuer l'analyse (en cas de second passage) sinon le prélèvement était exclu de l'analyse. Au total, 34 des 484 prélèvements randomisés (7 %) étaient dans ce cas (Figure 25, page 69). De même, en dépit de l'arbre décisionnel utilisé pour limiter le nombre de prélèvements non interprétables, dix échantillons ont été exclus de l'analyse (2 %) pour échecs de chambre de PCR (Figure 25, page 69).

#### **III.1. Résultats obtenus par culture après broyage**

Les cultures de ces échantillons ont été réalisées en prospectif entre Décembre 2010 et Mars 2012. Parmi les 440 prélèvements interprétables, 164 sont restés stériles et 276 étaient positifs en culture. Parmi ces derniers, 25 (9 %) étaient positifs à plusieurs germes (infections poly-microbiennes). Les 251 autres étaient mono-microbiens (5)(49).

#### **III.2. Résultats obtenus par PCR multiplexe Curetis<sup>®</sup>**

Les analyses Curetis<sup>®</sup> ont été réalisées de manière rétrospective entre Octobre 2014 et Février 2016. Les résultats obtenus sont représentés dans l'algorithme de la Figure 30, page 79, ainsi que dans les Tableaux 17, page 78 et 18, page 80 permettant une analyse plus précise des résultats discordants entre la culture et la PCR multiplexe Curetis<sup>®</sup>. Malgré l'absence de « Gold Standard » pour le diagnostic d'IOAP, nous utiliserons les termes impropres de « Vrais Positifs », « Faux Positifs », « Vrais négatifs » et « Faux Négatifs ».

Tableau 17 : Concordance des résultats de Curetis® confrontés à ceux de la culture.

Culture	Concordants	Discordants	Total
Monomicrobien	101	132+18 =150	251
Polymicrobien	1	24	25
Stérile	154	10	164
Total	256	184	440

### III.2.1. Concordances

Au total, 256 des 440 prélèvements interprétables étaient concordants pour l'identification du pathogène, soit un taux de concordance de 58,1 %.

a. Culture négative/Curetis® négatif

Parmi les 164 prélèvements restés stériles en culture, 154 ont été confirmés négatifs avec la PCR multiplexe Curetis®. Ils sont donc considérés comme de « Vrais Négatifs ».

b. Culture positive/Curetis® positif

En groupant les prélèvements mono et poly-microbiens en culture, 102 des 276 prélèvements positifs en culture ont été confirmés positifs et concordants (cf. II.4.3) en PCR multiplexe. 101 des 251 prélèvements mono-microbiens étaient concordants. Un seul des 25 prélèvements poly-microbiens était totalement concordant. Ils sont donc considérés comme de « Vrais Positifs ».

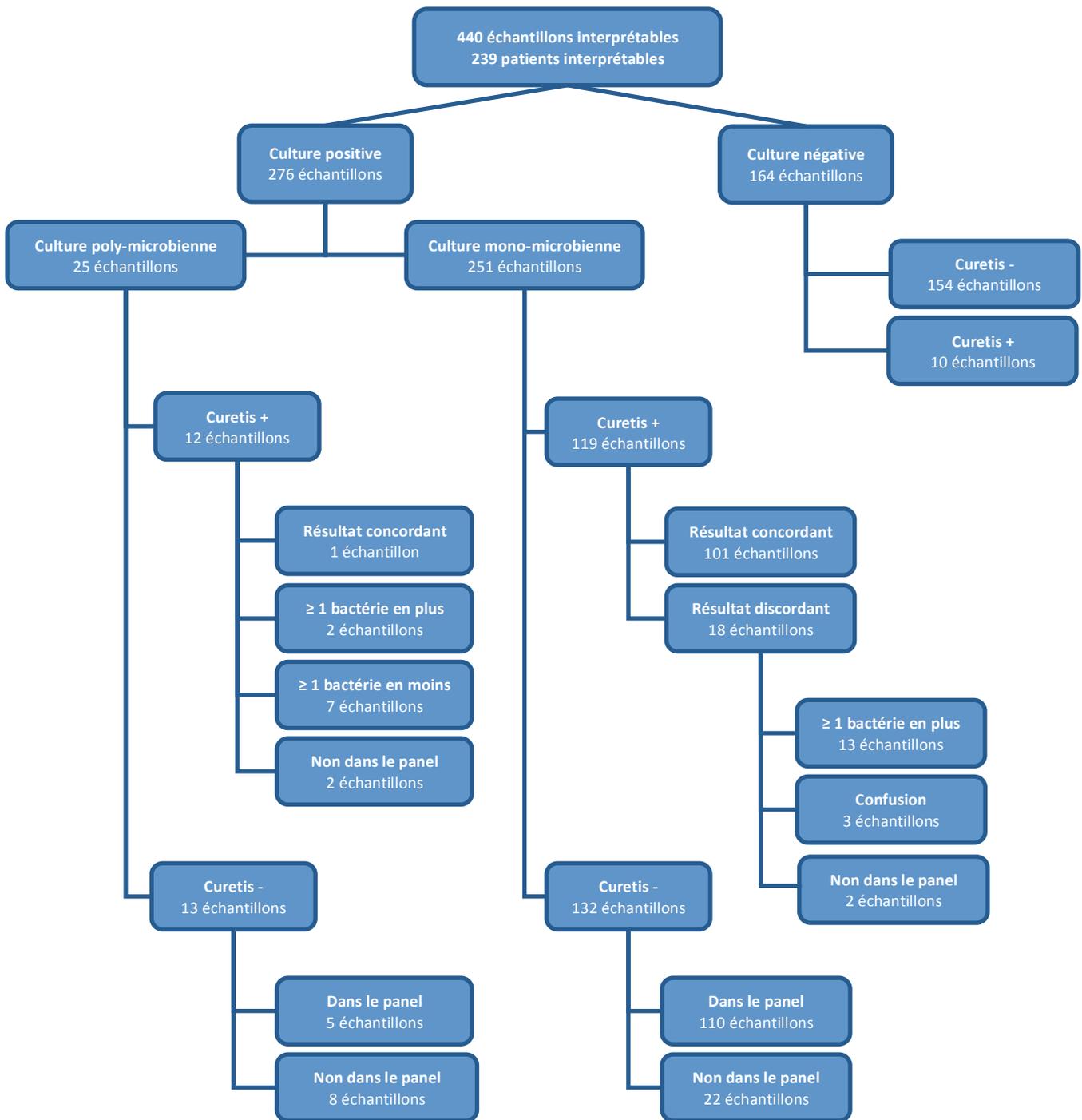


Figure 30 : Algorithme des résultats obtenus.

### III.2.2. Discordances

Nous retrouvons 184 discordances entre les résultats obtenus par culture et ceux obtenus *via* la PCR multiplexe Curetis® sur les 440 prélèvements interprétables, soit 41,8 %. Il convient d'analyser ces discordances pour tenter de les expliquer. Le Tableau 18 résume les différents cas de figure avec une discordance.

Tableau 18 : Analyse des résultats discordants.

Culture	Curetis®				Total
	≥ 1 bactérie en -	Confusion	≥ 1 bactérie en +	négatif	
Monomicrobien	-	3	13 / 2 <sup>1</sup>	132 <sup>2</sup>	150
Polymicrobien	9 <sup>3</sup>	-	2	13 <sup>4</sup>	24
Stérile	0	-	10	-	10
Total	9	4	26	145	184

- <sup>1</sup>2 positifs mais non inclus dans le panel.
- <sup>2</sup>22 non inclus dans le panel.
- <sup>3</sup>2 non inclus dans le panel.
- <sup>4</sup>8 non inclus dans le panel.

#### a. Culture négative/Curetis® positif

Parmi les 164 prélèvements stériles en culture, dix étaient positifs en PCR Curetis®, correspondant à 9 patients. Les détails de ces dix échantillons sont répertoriés dans le Tableau 19, page 81. La conclusion peut être « Vrai Positif », dans les cas où l'on retrouve le pathogène dans un autre prélèvement ou par une autre technique ou lors d'une récurrence. Nous avons conclu « Faux Positif » lorsque le patient a été guéri et que le micro-organisme retrouvé en Curetis® n'était pas sensible à l'antibiothérapie mise en place. Nous n'avons pas pu conclure (« non déterminé »), lorsque le patient était décédé, lorsque l'antibiothérapie aurait pu traiter ce micro-organisme ou lorsque l'antibiothérapie n'était pas connue.

Les bactéries détectées étaient : *S. aureus* (n=3), *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *E. faecalis*, *P. acnes* (n=3), *P. avidum/granulosum*. Une antibiothérapie avait été mise en place dans les 15 jours précédents la chirurgie pour cinq de ces neuf patients. Pour six de ces « Faux Positifs », un résultat positif avec la même bactérie avait été retrouvé, soit par PCR 16S pour ce même échantillon, soit par culture pour un autre échantillon de ce patient.

**Tableau 19 : Détails des résultats pour les dix prélèvements Culture négative/Curetis® positif.**

VP : Vrai Positif  
 FP : Faux Positif  
 ND : Information Non Disponible

CRO : Rocéphine  
 LEV : Levofloxacine

Echantillon		Pathogènes en Curetis®	IOAP	Antibiothérapie préalable	Culture autres prélèvements	PCR16S	Suivi à 2 ans		Conclusion
116	2	<i>E. faecalis</i>	oui	oui	Stérile	E. coli/Shigella	CRO LEV	Succès	Non déterminée
341	1	<i>S. aureus</i>	oui	non	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>			VP
401	3	<i>S. agalactiae</i>	oui	oui	Stérile	<i>S. agalactiae</i>			VP
403	5	<i>S. dysgalactiae</i>	oui	non	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i>			VP
415	5	<i>S. aureus</i>	oui	oui	Stérile	<i>S. aureus</i>			VP
538	4	<i>P. acnes</i>	oui	non	<i>Fingoldia magna</i> <i>Anaerococcus vaginalis</i>	Négatif	ND	Succès	Non déterminée
	5	<i>P. avidum/granulosum</i>		non					
609	4	<i>P. acnes</i>	non	non	SCN	Inhibiteur	Pas d'infection, va bien		FP
737	4	<i>S. aureus</i>	oui	oui	Stérile	<i>S. aureus</i>			VP
754	2	<i>P. acnes</i>	oui	oui	<i>P. acnes</i>	<i>P. acnes</i>			VP

#### b. Culture positive/Curetis® négatif

Parmi les 276 prélèvements positifs en culture, 145 (132 mono-microbiens, 13 poly-microbiens) étaient rendus négatifs en PCR Curetis®, soit 52,5 %. 30 de ces 145 résultats négatifs (20,7 %) sont expliqués aisément par le fait que les bactéries retrouvées en culture n'appartiennent pas au panel de la PCR Curetis®. Parmi les 132 prélèvements mono-microbiens négatifs en PCR Curetis®, 22 étaient positifs à des bactéries non incluses dans le panel. De même, parmi les 13 prélèvements poly-microbiens négatifs en PCR Curetis®, huit étaient positifs à des bactéries non incluses dans le panel. Cet aspect sera plus approfondi au paragraphe III.2.4.

Ainsi, outre ce problème de panel, 110 prélèvements mono-microbiens et cinq prélèvements poly-microbiens positifs en culture sont à considérer comme des « Faux Négatifs ». Nous avons essayé de comprendre ce phénomène en comparant les caractéristiques des cultures de ces 110 prélèvements à ceux des 101 prélèvements positifs en culture et en Curetis®. Les éléments étudiés ont été la nature des prélèvements étudiés (Tableau 20, page 82), le nombre de milieux de culture positifs (Tableau 21, page 82), le nombre de colonies par milieu de culture (Tableau 22, page 82) et le délai de croissance bactérienne (Tableau 23, page 83). Il n'existait pas de différence significative de la positivité

en PCR Curetis® en fonction des différentes natures de prélèvements (p-value : 0.875).

**Tableau 20 : Pourcentage d'échantillons positifs en Curetis® en fonction de la nature de prélèvements.**

Nature prélèvements	Culture+/Curetis+ (%)	Culture+/Curetis- (%)
Liquide articulaire	25,7	29,1
Tissus	43,6	41,8
Os	30,7	29,1

En revanche, il existait un effet de l'inoculum bactérien. En effet, il y avait une différence significative entre les échantillons retrouvés positifs dans les deux techniques et ceux positifs qu'en culture concernant le nombre de milieux positifs en culture (p-value : 0.0002), le nombre de colonies retrouvées en culture (p-value : 0.0004) mais surtout le délai de positivité des cultures (p-value : 0,000004). Ainsi, la présence d'un faible inoculum bactérien semble limiter les performances et la sensibilité de la PCR Curetis® (multiplexe mais spécifique). Dans ces cas, sa performance est inférieure à celle d'une culture optimisée après broyage.

**Tableau 21 : Pourcentage d'échantillons positifs en Curetis® en fonction du nombre de milieux de culture positifs.**

Nombre de milieu positif	Culture+/Curetis+ (%)	Culture+/Curetis- (%)
1	6,9	22,7
2	9,9	20
≥ 3	83,2	57,3

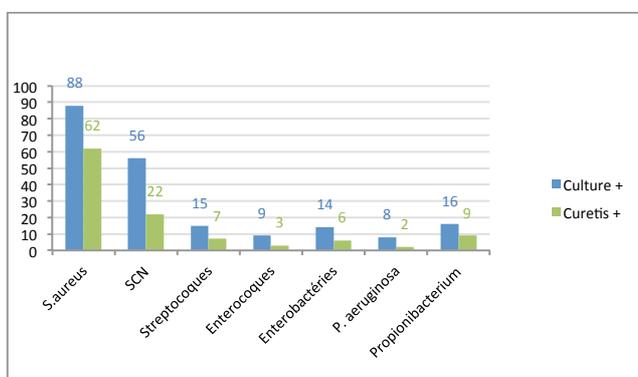
**Tableau 22 : Pourcentage d'échantillons positifs en Curetis® en fonction du nombre de colonies par milieu solide.**

Nombre de colonies par milieu	Culture+/Curetis+ (%)	Culture+/Curetis- (%)
< 5 colonies	13,8	39,4
5-50 colonies	34,0	37,9
> 50 colonies	52,2	22,7

**Tableau 23 : Pourcentage d'échantillons positifs en Curetis® en fonction de la vitesse de pousse.**

Jour de croissance	Culture+/Curetis+ (%)	Culture+/Curetis- (%)
J1-J2	91,8	78,9
>J2	8,2	21,1

Compte-tenu des ces résultats, il nous a paru pertinent de mener une investigation sur un éventuel lien entre un type bactérien particulier et cette faible sensibilité. L'histogramme (Figure 31) présente la répartition des différentes espèces ou groupes d'espèces bactériennes positifs en culture et en PCR Curetis®. Il n'existe pas de différence significative entre les différents groupes. (p-value : 0.6904).



**Figure 31 : Histogramme représentant les espèces positives en Culture et Curetis®.**

L'automate que nous avons pu tester fournissait une réponse semi-quantitative (+, ++, +++) avec des seuils différents en fonction de la nature des prélèvements analysés. Pour ces 110 échantillons négatifs en PCR Curetis®, il était intéressant de savoir si un signal inférieur au seuil était détecté pour la bactérie retrouvée en culture. Treize résultats montraient une détection bactérienne inférieure au seuil de détection de 250, mais pour seulement neuf d'entre eux, il s'agissait du même pathogène.

c. Culture positive/Curetis<sup>®</sup> positif/Discordant

Parmi les 131 échantillons positifs en culture et en Curetis<sup>®</sup>, 29 résultats étaient discordants (22,1 %). Toutefois, les discordances observées étaient de différents types.

i. Prélèvements mono-microbiens

Parmi les 119 prélèvements mono-microbiens positifs en Curetis<sup>®</sup>, 18 étaient discordants. Ces discordances étaient de trois types.

Dans un premier cas, le résultat de la PCR Curetis<sup>®</sup> rapportait la présence d'une bactérie en plus par rapport à la culture. Dans ce contexte, il pourrait alors s'agir d'un cas d'infection poly-microbienne. Ce cas s'est présenté pour 13 des 18 discordances. Les pathogènes retrouvés étaient : *S. aureus* (n=1), SCN (n=6), *Streptococcus dysgalactiae* (n=1), *P. acnes* (n=1), *P. avidum/granulosum* (n=1), *P. mirabilis* (n=1), *Acinetobacter baumannii* (n=1) et *Candida parapsilosis* (n=1). Pour sept de ces 13 échantillons, le patient avait reçu une antibiothérapie avant la chirurgie. Le traitement a pu décapité partiellement la documentation bactériologique. Les résultats de la PCR ARN 16S ne permettaient pas d'expliquer ces résultats. Le Tableau 24, page 85 résume les informations de ces 13 échantillons. Le traitement et le suivi de ces patients permettent parfois de statuer entre un « Faux Positif » ou non.

**Tableau 24 : Détails des résultats pour les 13 prélèvements Culture positive/Curetis® positif/Discordants.**

VP : Vrai Positif  
 FP : Faux Positif  
 ND : Information Non Disponible  
 OXA : Oxacilline  
 LEV : Levofloxacine  
 C3G : Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> Génération

ATF : Antifongique  
 FUC : Acide Fusidique  
 RIF : Rifampicine  
 VAN : Vancomycine  
 OFL : Ofloxacine

Echantillon		Culture	Curetis®			ATBt	Suivi		Conclusion	
215	4	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. dysgalactiae</i>			Oui	<i>S. dysgalactiae</i> dans culture des autres échantillons	VP	
312	4	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. acnes</i>			Non	OXA FUC	Décès	Non déterminée
342	1	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SCN			Non	RIF LEV	Récidive à SASM	Non déterminée
506	2	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. mirabilis</i>			Oui	ND	Décès	Non déterminée
509	3	<i>S. epidermidis</i>	SCN	<i>S. aureus</i>			Non	ND	Récidive EBLSE amputation	Non déterminée
560	2	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SCN			Non	ND	Guérison	Non déterminée
617	3	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>			Oui	C3G LEV	Guérison	FP
622	3	<i>S. epidermidis</i>	SCN	<i>Candida parapsilosis</i>			Non	pas d'ATF	Guérison	FP
625	4	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SCN			Non	OXA RIF	Guérison	Non déterminée
626	5	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SCN			Oui	RIF OFL	Echec	Non déterminée
717	2	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SCN			Oui	VAN FUC	Lavage <i>S. epidermis</i> , SARM, <i>P. acnes</i> échec fistulisation	VP
744	5	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	SCN	<i>F. magna</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	Oui	VAN CIP	Prothèse à l'air, reprise à SCN	VP et Non déterminée
756	4	<i>S. epidermidis</i>	SCN	<i>P. avidum/granulosum</i>			Oui	RIF OFL	Guérison	Non déterminée

Dans le deuxième type de discordance, le résultat de la PCR Curetis® présentait une bactérie différente de celle retrouvée en culture. C'est le cas pour trois échantillons. Dans un cas, la PCR Curetis® a détecté un SCN alors que la culture était positive à *S. aureus*. Pour le deuxième échantillon, la PCR Curetis® a détecté un *P. acnes* alors qu'il y avait un SCN en culture et pour le troisième échantillon, la PCR Curetis® a détecté un SCN alors que nous retrouvions un *P. acnes* en culture. Dans ce contexte, il pourrait s'agir soit d'un Faux Négatif de la culture conduisant en réalité à une infection poly-microbienne mais traitée par l'équipe médicale avec guérison de ces trois patients, soit d'un Faux Positif de la PCR Curetis®. Le Tableau 25, page 86 reprend les caractéristiques de ces trois échantillons.

**Tableau 25 : Détails des résultats pour les 3 prélèvements Culture positive/Curetis® positif/Confusions.**

ND : Information Non Disponible  
DALA : Dalacine

OXA : Oxacilline  
OFL : Ofloxacine

Echantillon		Culture	Curetis®	Antibiothérapie préalable	Suivi		Conclusion
549	4	<i>S. aureus</i>	SCN	Non	ND	Guérison	Non déterminée
738	4	<i>P. acnes</i>	SCN	Non	DALA	Guérison	Non déterminée
759	4	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. acnes</i>	Non	OXA puis DALA OFL	Guérison	Non déterminée

Dans la dernière configuration de discordance, la PCR Curetis® donnait un résultat positif alors que la bactérie détectée en culture n'appartenait pas au panel. C'est le cas pour deux échantillons, d'un même patient, positifs en culture à *Staphylococcus caprae* et positifs en PCR Curetis® à SCN. Deux hypothèses permettent d'expliquer ces résultats, soit les amorces de la PCR Curetis® permettant de détecter les SCN croisent avec l'ADN de *S. caprae*, soit en réalité, il s'agit d'une infection poly-microbienne à *S. caprae* et à un autre SCN. En effet, les SCN sont très similaires en culture et il se peut que nous soyons passés à côté d'une infection poly-microbienne à SCN. Ce patient a reçu un traitement par Rifampicine et Ofloxacine pendant 12 semaines et n'avait pas rechuté lors de sa visite de suivi (deux ans après l'infection). Ces informations ne nous permettent pas de confirmer une des deux hypothèses.

## ii. Prélèvements poly-microbiens

Parmi les 12 prélèvements poly-microbiens positifs en Curetis®, 11 étaient discordants. Ces discordances étaient également de trois types.

Dans le premier cas, le résultat de la PCR Curetis® présentait une bactérie en plus par rapport à la culture. C'est le cas pour deux prélèvements. En effet, pour l'un en culture, nous avons quatre bactéries différentes : *P. mirabilis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *B. fragilis*, tandis qu'avec la PCR Curetis®, nous retrouvions ces quatre pathogènes mais également un *F. magna*. Pour l'autre prélèvements, nous avons deux SCN en culture (*S. epidermidis* et *S. hominis*), nous retrouvions en plus un *B. fragilis*. Nous pouvons remarquer que ces deux pathogènes sont des bactéries anaérobies, de culture plus délicate, tout particulièrement pour *F. magna*. Ces patients n'avaient pas reçu d'antibiothérapie en pré-opératoire. Pour ces deux patients, un seul prélèvement avait été tiré au sort, il aurait été intéressant de connaître les

résultats des autres prélèvements de ces patients en Curetis® pour nous aider à déterminer si ce sont des Faux Positifs ou non.

Dans le deuxième type de discordance, le résultat de la PCR Curetis® présentait une bactérie en moins par rapport à la culture, c'est le cas pour sept prélèvements. Pour trois d'entre eux, nous observions un développement faible et tardif en culture de la bactérie non retrouvée en PCR Curetis®. Pour les quatre autres, aucune explication n'était retrouvée.

Dans la dernière configuration, le résultat de la PCR Curetis® présentait une bactérie en moins par rapport à la culture mais ceci s'expliquait, par le fait que les bactéries non retrouvées n'appartenaient pas au panel de la PCR multiplexe Curetis®. C'est le cas pour deux prélèvements de deux patients différents.

### ***III.2.3. Détection des gènes de résistance***

Nous nous sommes focalisés sur deux mécanismes de résistance essentiels : la résistance à la méticilline codé par le gène *bla<sub>mecA</sub>* et la résistance aux  $\beta$ -lactamines par expression du gène *bla<sub>CTX-M</sub>* codant pour une  $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE). En culture, 62 échantillons tirés au sort avaient mis en évidence un staphylocoque résistant à la méticilline. Pour ces 62 échantillons, le gène *bla<sub>mecA</sub>* a été amplifié par PCR Curetis® dans uniquement quatre cas (soit 6,45 %). Pour les autres, il n'y avait aucun signal de gènes de résistance tel que *bla<sub>mecC</sub>*. Pour 37 des 58 échantillons comportant un staphylocoque résistant à la méticilline, une nouvelle analyse a été réalisée avec la version 2 de la PCR Curetis®. Treize étaient positifs pour le gène *bla<sub>mecA</sub>*, soit 35,1 % de détection.

En l'absence d'entérobactéries productrices de BLSE dans la cohorte MICROBIOS I, nous n'avons pas pu évaluer la détection du gène *bla<sub>CTX-M</sub>*.

### ***III.2.4. Panel***

La PCR multiplexe permet de détecter une liste non exhaustive de pathogènes. Parmi les prélèvements de la cohorte MICROBIOS I tirés au sort et interprétables (440

échantillons), 35 étaient positifs à des pathogènes non présents dans le panel de la PCR Curetis<sup>®</sup>, ce qui correspond à 8 %. Le Tableau 26 répertorie les pathogènes retrouvés en culture et absents du panel.

**Tableau 26 : Pathogènes retrouvés en culture et absents du panel.**

Streptococcus n=15	<i>Streptococcus mitis/oralis</i> (n=6)
	<i>Streptococcus salivarius</i> (n=1)
	<i>Streptococcus anginosus</i> (n=2)
	<i>Streptococcus oligofermentans</i> (n=2)
	<i>Streptococcus intermedius</i> (n=2)
	<i>Streptococcus sanguinis</i> (n=2)
Staphylococcus n=6	<i>Staphylococcus sciuri</i> (n=2)
	<i>Staphylococcus simulans</i> (n=2)
	<i>Staphylococcus caprae</i> (n=2)
Corynebactéries n=4	<i>Corynebacterium striatum</i> (n=4)
Autres	<i>Listeria monocytogenes</i> (n=3)
	<i>Capnocytophaga canimorsus</i> (n=1)
	<i>Serratia marcescens</i> (n=4)
	<i>Bacillus cereus</i> (n=1)
	<i>Peptoniphilus asacharolyticus</i> (n=1)

### III.2.5. Echecs de chambres

Nous avons dû adapter notre méthodologie du fait d'un nombre important d'échec de chambres de PCR (cf. II.4.3). En effet, 63 résultats de PCR Curetis<sup>®</sup> comportaient un ou plusieurs échecs de chambres durant la première analyse. Pour 45 d'entre eux, cela touchait des chambres critiques (1-2-4-5), nous avons donc dû faire une seconde analyse pour ces échantillons. Lors de cette seconde analyse, 11 résultats comportaient des échecs de chambre dont dix portant sur des chambres critiques d'où, d'après l'algorithme utilisé, 10 résultats ininterprétables. Ce problème semblait moins prononcé lors de l'utilisation de la version 2. En effet, seul cinq tests sur les 57 réalisés étaient en échec, soit 8,7 % d'échec contre 74 (63+11) sur les 485 tests réalisées (440+45), soit 15,3 % d'échec pour la version 1.

### III.2.6. Concordance PCR Curetis<sup>®</sup>/PCR 16S

Un taux de concordance entre la PCR Curetis<sup>®</sup> et la PCR 16S a été calculé. Nous avons écarté de ce calcul 90 échantillons pour diverses raisons : les prélèvements en quantité insuffisante pour être analysés par la technologie Curetis<sup>®</sup> (n=34), les prélèvements en échec en Curetis<sup>®</sup> (n=10), les échantillons présentant des inhibiteurs de PCR lors de la PCR 16S

(n=21) et les prélèvements retrouvés polymicrobiens en culture (du fait de l'absence de clonage lors de la PCR 16S) (n=25). Au total, 276 résultats sont concordants sur les 394 échantillons (=484-90), correspond à un taux de concordance de 70,1 %.

Les résultats de ce travail ont été soumis pour une communication orale, lors de l'EBJIS 2016 (European Bone and Joint Infection Society), du 1<sup>er</sup> au 3 septembre 2016 à Oxford en Angleterre.

## **3<sup>ème</sup> partie : Discussion**

Les IOAM sont des complications infectieuses redoutables, parfois génératrices de séquelles importantes, nécessitant des traitements longs et coûteux (29). L'évolution des techniques chirurgicales, le respect des règles d'asepsie et la prescription d'une antibioprofylaxie per-opératoire ont significativement réduit le risque d'infections post-opératoires (89). Cependant, malgré ces mesures, la hausse du nombre d'implantations de prothèses articulaires, du fait du vieillissement de la population, s'accompagne d'une augmentation potentielle et réelle du nombre d'infections (3). Le diagnostic clinique et radiologique s'avère parfois difficile et délicat avec un doute entre une infection de prothèse ou un descellement aseptique (9) d'où l'intérêt de bénéficier d'outils innovants, de méthodes fiables pour un diagnostic microbiologique rapide et sûr.

Dans ce contexte, l'objectif de nos travaux était d'évaluer une nouvelle technique de diagnostic moléculaire de ces infections. Notre travail fait suite à plusieurs études tentant d'évaluer les différentes techniques existantes et de proposer une démarche de diagnostic microbiologique.

Le taux de concordance global de cette technique est ici de 58,1 % (analyse par prélèvement) avec la culture traditionnelle, mais nous avons pu voir aisément qu'il n'existe aucun Gold Standard pour le diagnostic des IOAP et que l'analyse de chaque résultat doit se faire au cas par cas.

De précédentes études ont été réalisées afin d'évaluer cette technique innovante. Hischebeth et al. ont mené une autre étude sur 62 échantillons provenant de 31 patients suspects d'IOAP ou de descellement aseptique. Ils ont comparé six méthodes différentes : culture des prélèvements tissulaires per-opératoires, culture des liquides articulaires, culture des sonicats de prothèses, PCR Curetis<sup>®</sup> des sonicats, PCR Curetis<sup>®</sup> des liquides articulaires, et PCR Curetis<sup>®</sup> des échantillons « poolés ». Les sensibilité et spécificité retrouvées sont respectivement de 66,7 % et 82,3 %, de 66,7 % et 84,6 %, de 88,9 % et 61,5 %, de 50 % et 100 %, de **55,6 % et 100 %** et de **66,7 % et 100 %**. Tous les résultats positifs en PCR ont été confirmés par la suite en culture. Cependant, outre le gain de temps, la technique de PCR ne donnait pas d'informations supplémentaires que celles obtenues à partir des cultures. Selon les auteurs, la PCR multiplexe Curetis<sup>®</sup> est une méthode complémentaire, rapide, utilisable dans

le diagnostic des IOAP (90).

Borde et al. (91), ont réalisé une étude pilote, prospective chez 28 patients, en comparant la PCR 16S et la PCR Curetis<sup>®</sup> à la culture. A noter que la PCR Curetis<sup>®</sup> a été réalisée sur seulement trois prélèvements pour 23 patients et deux prélèvements pour 5 patients. Ils retrouvaient un taux de concordance de la PCR Curetis<sup>®</sup> de 82 % avec la culture et de 96 % avec la PCR 16S. Ces taux sont différents des nôtres. En effet, le raisonnement a été conduit par patient et non par prélèvement comme lors de nos travaux. De plus, le faible nombre de patient ne permet pas d'avoir un reflet exact des performances de la technique pour le diagnostic des IOA, notamment de la clinique, du contexte aigu ou chronique, du contexte précoce, retardé ou tardif.

Rodriguez-Sevilla et al. (92) ont également évalué cette technique en la comparant à la culture des liquides de sonicats de prothèse. Ils ont mené une étude prospective sur 27 patients. Des sensibilités et spécificités par patient et par échantillon ont été réalisées en prenant les critères cliniques comme standard. Par prélèvement, les sensibilités et spécificités étaient respectivement de 73 % et 90 % pour la culture et de 83,3 % et 94,7 % pour les PCR Curetis<sup>®</sup>. Par patient, les sensibilités et spécificités étaient respectivement de 90 % et 98,9 % pour la culture et de 90 % et 94,4 % pour les PCR Curetis<sup>®</sup>. Les performances de cette technique sembleraient donc meilleures que celles de la culture des sonicats.

Dans notre étude, nous avons choisi de raisonner par prélèvement puisque seuls deux prélèvements sur les cinq effectués ont été analysés. Nous avons montré que les conditions pré-analytiques de broyage et analytique de temps d'incubation et de choix des milieux de culture utilisés dans l'étude MICROBIOS I permettent l'obtention d'une sensibilité de 89 % (5). Ce faible taux de concordance pourrait s'expliquer par les bonnes performances de la méthode de culture utilisée, ainsi que la réalisation de ce travail sur des prélèvements congelés pendant plusieurs années.

Ces discordances (41,9 % des cas) se séparent en « Faux Positifs » et en « Faux Négatifs ».

Les « Faux Positifs » ont nécessité de connaître le devenir des patients et le traitement

antibiotique prescrit pour conclure à un réel Faux Positif ou non. Les Tableaux 19, 24 et 25 fournissent ces renseignements et la conclusion qu'ils nous ont permis d'envisager. Concernant les prélèvements « Culture négative/Curetis<sup>®</sup> positif », pour six d'entre eux, la PCR Curetis<sup>®</sup> détecte la bactérie responsable de l'IOAP. Pour un cas, il a été aisé de conclure, en réalité, ce patient ne souffrait pas d'IOAP, il ne présentait aucun critère microbiologique et aucun critère de l'IDSA. Il n'a pas présenté d'infection lors de sa visite de suivi à deux ans. Pour les deux derniers patients, le suivi et le traitement ne nous ont pas permis de conclure.

Concernant les prélèvements « Culture positive/Curetis<sup>®</sup> positif/Discordants », trois sont en réalité des Vrais Positifs. En effet, soit la bactérie a été retrouvée dans un autre prélèvement en culture (n=1), soit lors de la reprise chirurgicale de la prothèse, il a été retrouvé cette bactérie (n=2). Pour ces deux patients, la PCR Curetis<sup>®</sup>, en 1<sup>er</sup> intention, aurait peut-être permis un diagnostic plus précoce, une meilleure prise en charge et éviter une reprise chirurgicale.

Pour deux patients, nous avons conclu à des Faux Positifs. Le prélèvement où nous retrouvons un *C. parapsilosis* en plus d'un SCN, semblerait plutôt être un Faux Positif car le patient est guéri sans avoir eu d'antifongique. *C. parapsilosis* est typiquement un germe cutané et une contamination a pu se produire lors du prélèvement, ou lors de la PCR Curetis<sup>®</sup> au laboratoire, ou bien c'est un Faux Positif de la technique (93). Pourtant, il existe des cas d'IOAP à *Candida* dont *C. parapsilosis* (94). Le prélèvement positif à *A. baumannii* semblait être un Faux Positif de la technique. En effet, les IOAP à *A. baumannii* sont très rares et le traitement mis en œuvre par céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération et lévofloxacine traitant une infection à *E. coli* n'aurait sûrement pas traité une infection à *A. baumannii*, en raison de ces fréquentes résistances (95).

Pour les huit autres patients, le suivi et le traitement ne nous ont pas permis de conclure. La PCR Curetis<sup>®</sup> retrouvait fréquemment des *P. acnes* ou des SCN pour ces patients. Nous pouvons suspecter soit un excès de sensibilité du système mais il existe pourtant de nombreux Faux Négatifs pour ces germes, soit des erreurs aléatoires de la technique, soit une contamination lors du prélèvements ou lors de la PCR car ces germes sont d'origine cutanée.

Si cette technique était mise en place en routine, il faudrait déterminer le nombre

d'échantillons à analyser. L'étude de Bémer et al. a montré que quatre échantillons per-opératoires suffisent pour avoir une bonne sensibilité en culture (49). L'analyse par PCR Curetis® pourrait être faite sur deux voire trois prélèvements en suivant ce qui a été fait dans les différentes études ou bien sur les quatre prélevés (problème de coût en fonction du nombre de patients). Toutefois, il faudrait probablement choisir et sélectionner des natures de prélèvements différentes. La possibilité de mélanger tous les prélèvements d'un patient pour réaliser la PCR Curetis® a été étudiée par l'équipe de Rottman (96), ceci permet un moindre coût analytique et une optimisation de l'utilisation de l'automate. Cette étude a été réalisée sur un effectif de 31 cas d'infection de prothèse (cinq prélèvements par infection) dont 11 polymicrobiennes en culture. Ils ont comparé trois méthodes : la culture avec broyage préalable comme méthode de référence, la PCR Curetis® de chacun des cinq prélèvements per-opératoires, la PCR Curetis® des cinq prélèvements « poolés ». La sensibilité et la spécificité de la PCR individuelle par rapport à la culture étaient de 47,6 % et 99,2 %. En mélangeant les échantillons, ils ont atteint une sensibilité et une spécificité de 66,7 % et 98,8 %, avec une VPP de 77,8 % et une VPN de 97,9 %. Deux des 51 micro-organismes isolés en culture (2/31 cas) ne figuraient pas dans le panel Curetis® Unyvero. *P. acnes* était l'espèce la plus isolée en PCR Curetis® et sa signification demeure incertaine. L'étude ne mentionne pas la version des cartouches utilisées. Par ailleurs, il faut savoir que la PCR Curetis® interprète les résultats obtenus avec des seuils différents en fonction de la nature des prélèvements analysés (cf. II.4.2), ce qui rend délicat l'interprétation, hors recommandation du fabricant.

Les « Faux Négatifs » peuvent s'expliquer par différentes caractéristiques de ces échantillons. D'une part, l'étude réalisée, ancillaire à MICROBIOS I, a été effectuée sur des échantillons ayant été congelés pendant plusieurs années. Ceci a pu réduire l'inoculum bactérien ou léser l'ADN bactérien. Cependant, une étude préliminaire a été effectuée par le service de Bactériologie du CHU de Poitiers pour tester la stabilité de l'ADN bactérien à partir de prélèvements congelés pendant plusieurs années. Les résultats montraient une bonne stabilité de l'ADN extrait congelé pendant trois années. En effet, la PCR 16S réalisée avant et après congélation, retrouvait un Ct identique (écart maximum +/-1). A noter que le Ct ou « Cycle treshold » pour cycle seuil, correspond au nombre de cycle à partir duquel le signal de fluorescence dépasse le seuil de départ pour la cible amplifiée.

De plus, le faible inoculum retrouvé en culture dans les prélèvements positifs en culture mais négatifs en PCR Curetis<sup>®</sup> (cf. Tableaux 21, 22 et 23 page 82) semble limiter les performances de la PCR Curetis<sup>®</sup> et tout particulièrement son manque de sensibilité. Une autre caractéristique des prélèvements inclus dans l'étude permet d'expliquer ces résultats. En effet, 81 % des patients présentaient des symptômes d'infection chronique d'où des infections plus torpides à plus faible inoculum qu'une infection aiguë ou hémotogène (5).

Nous avons également comparé les résultats de la PCR Curetis<sup>®</sup> à ceux obtenus par PCR 16S. Nous trouvons un taux de concordance de 70,1 %. La PCR Curetis<sup>®</sup> procure des performances plus proches de celles de techniques de biologie moléculaire que celle de la culture.

Une question importante dans les études est la définition d'une IOAP selon soit des critères microbiologiques, soit des critères clinico-biologiques des différentes sociétés savantes. Elles utilisent des critères d'inclusion différents et non homogènes. Par conséquent, cela conduit à une difficulté de comparer toutes ces études sur la PCR, la culture et/ou la sonication qui n'utilisent pas le même « Gold Standard » (type de culture, nombre de milieu, broyage ou non, broyeur, sonicateur, etc.)

Par ailleurs, la notion de PCR positive n'est pas synonyme systématiquement de sepsis mais seulement de détection d'ADN bactérien. En effet, plusieurs études relatent ce cas de figure. Dans l'étude MICROBIOS I de Bémer et al.(5), les échantillons de deux patients étaient positifs à *S. aureus* et *L. monocytogenes* par PCR et négatifs en culture. Ces patients avaient été traités pour une IOAP liées à ces bactéries plusieurs mois plus tôt. La persistance de l'ADN à partir de bactéries non viables plusieurs mois après la guérison clinique reste possible. De même, Ehrlich et al, ont rapporté la présence de multiples pathogènes parodontaux à la fois dans les genoux des patients souffrant d'arthroplasties ou de descellement aseptique par la technologie (PCR)-electron spray ionization (ESI)-time of flight (TOF)-mass spectrometry (MS) (PCR-ESI/MS) (97)(98). Ils supposaient que ces bactéries se soient localisées dans le genou lors de décharge bactériémique sans pour autant être responsable d'une infection. L'équipe de Patel a étudié la PCR-ESI/MS sur des sonicats de prothèses et des liquides articulaires en la comparant à la culture. Greenwood et al ont travaillé sur les sonicats de 431 patients (152 souffraient d'une infection prothétique) (101).

Les sensibilités et spécificités étaient respectivement de 77,6 et 93,5 % pour la PCR-ESI/MS et de 69,7 et 99,3 %, pour la culture. Melendez et al. ont mené une étude rétrospective sur 103 liquides articulaires et retrouvaient des chiffres similaires avec 81 % de sensibilité et 95% de spécificité pour le diagnostic de l'IOAP par PCR-ESI/MS (100). Quelques-uns des patients avec un descellement aseptique avaient un signal PCR-ESI/MS positif et avaient des antécédents d'infection. Ceci suggère que l'ADN microbien peut persister dans le liquide synovial après guérison, et par conséquent, sa détection par PCR ne peut pas toujours indiquer une infection persistante.

Zegaer et al. ont mené une étude sur 44 prélèvements ostéo-articulaires per-opératoires en pratiquant sur ces échantillons, une culture conventionnelle, une PCR 16S et des PCR spécifiques (99). Les méthodes de PCR n'ont pas permis de faire le diagnostic. La PCR 16S était totalement inutile pour l'identification bactérienne, bien qu'elle détectait l'ADN bactérien dans de nombreux cas, il n'y avait pas d'identification du produit de PCR après séquençage. Ce problème pourrait être dû à la présence de plus d'une espèce bactérienne (y compris le micro-organisme pathogène), provoquée par la manipulation et le traitement des échantillons. Pour être efficace, la PCR universelle nécessite des échantillons contenant une souche bactérienne unique; sinon, l'identification après séquençage est impossible. Les PCR spécifiques ont montré de meilleurs résultats, mais les résultats étaient encore très discordants par rapport à ceux de la culture. Les auteurs concluent à une inefficacité des méthodes de biologie moléculaires. A l'inverse, Levy et al. conseillent de pratiquer systématiquement des méthodes de biologie moléculaire lorsque les cultures restent négatives. En première intention, ils recommandent une PCR 16S ainsi qu'une PCR spécifique *S. aureus* pour les infections de l'adulte et *K. kingae* pour les infections de l'enfant. En deuxième intention, une PCR 18S pourrait être réalisée à la recherche d'une infection fongique (78).

Une antibiothérapie est parfois débutée avant d'avoir pu réaliser des prélèvements pré- et per-opératoires, (29 % des patients (5)). Dans ces contextes particuliers, l'utilisation de méthodes de biologie moléculaire conserve alors tout son intérêt.

En pratique quotidienne, une question clé demeure : la notion de méticillino-résistance. Ainsi, il est donc nécessaire de disposer de coffret avec de bonne performance

pour la détection de cette résistance. Les technologies existantes telles que GeneXpert<sup>®</sup> (100 % de sensibilité pour les SARM et un peu moins bonne pour les SCNRM) ou BD max<sup>®</sup> montrent d'excellentes performances (102). Grâce à la version 1, la PCR Curetis<sup>®</sup> a permis une détection d'uniquement 6,45 % des cas. Nous avons tenté d'expliquer ce médiocre résultat par deux hypothèses. La première est la réalisation d'une analyse par PCR Curetis<sup>®</sup> en rétrospectif. Les échantillons ont été conservés entre deux et cinq ans au congélateur à -80°C. Nous savons que le gène *bla<sub>mecA</sub>* se situe sur un élément génétique mobile : la cassette SCC<sub>mec</sub>. Sa stabilité dans le temps, dans cet environnement complexe qu'est le broyat, pourrait expliquer certains résultats négatifs, après des cycles de congélation/décongélation (103). La deuxième hypothèse est un manque de sensibilité de la technique Curetis, ceci a été confirmé par les meilleurs résultats observés avec la nouvelle version (V2). En effet, parmi les 37 échantillons passés en V2, 13 étaient positifs, soit 35,1 % de détection *versus* 6,45 % pour la V1. Par ailleurs, les prélèvements du CHU de Poitiers ont été analysés dans le cadre d'une Thèse de fin d'étude afin de mettre en place la détection de la méticillino-résistance par PCR. Pour toutes les bactéries phénotypiquement résistantes à la méticilline, le gène *mecA* était retrouvé par PCR à partir des broyats. Ceci conforte donc notre seconde hypothèse.

Une des limites des PCR spécifiques développées (tests commerciaux ou maison) est de se focaliser sur la détection d'une liste restreinte de pathogènes comme précédemment évoqué. Cazanave et al. ont mis au point une PCR multiplexe maison avec de bonnes performances mais trop peu précise (85). En effet, elle ne permettait pas d'obtenir un diagnostic à l'espèce. L'avantage du panel Curetis<sup>®</sup> est qu'il contient les principaux pathogènes responsables d'IOAP. Il détecte également des pathogènes émergents dans les IOA tel que *F. magna* (32) et ce système est le seul à détecter *P. acnes*, à ce jour. Seulement 8 % des échantillons étaient positifs à des bactéries non incluses dans le panel Curetis<sup>®</sup>. A noter que cela concernait principalement des streptocoques (n=15) et *C. striatum* (n=4). Il serait intéressant de les ajouter au panel ainsi que l'entérobactérie *S. marcescens*. A l'inverse, nous comprenons aisément, qu'en raison de leur faible implication dans les IOAP, les espèces *B. cereus*, *C. canimorsus* et *L. monocytogenes* n'ont pas été incluses dans le panel. L'automate ne différencie pas les différents types de SCN, alors que nous savons que *Staphylococcus lugdunensis* a un pouvoir pathogène plus important que *Staphylococcus capitis*, par exemple (104). Enfin, *Staphylococcus caprae* n'est pas présent dans le panel, alors que c'est un pathogène émergent dans les infections osseuses (105). La version 3 de la cartouche

contiendra plus de pathogènes mais également plusieurs PCR 16S ciblant les différentes boucles du gène afin de tout de même détecter un signal pour les bactéries, non incluses dans le panel.

Ce kit dispose du marquage CE mais est en continuel développement avec des adaptations, en partie, liées aux résultats de notre étude. Au départ, par exemple, nous avons observé un excès de sensibilité de la PCR détectant *K. pneumoniae* avec le premier automate. Après une seconde analyse de ces échantillons, *K. pneumoniae* n'était plus retrouvée. Ces 450 échantillons ont été analysés avec la version 1 (V1) de la technologie Curetis®. A la fin de l'étude, la version 2 a été mise sur le marché et nous avons pu la tester. Nous avons décidé de tester cette nouvelle version avec tous les échantillons disponibles négatifs pour le gène *bla<sub>mecA</sub>* alors qu'un staphylocoque résistant à la méticilline avait été retrouvé en culture. Nous avons inclus quelques échantillons positifs en culture et négatifs en Curetis®. Des améliorations notables ont été observées concernant la détection de *S. aureus*, des SCN, de *P. acnes*, du gène *bla<sub>mecA</sub>* (35,1 % de détection), ainsi que le nombre d'échec de chambres de PCR, en net recul (8,7 %).

## Conclusions - Perspectives

Il n'existe pas de méthode standard pour le diagnostic des IOAP. La méthode par culture avec de bonnes conditions pré-analytiques de broyage a montré des très bonnes performances (5). La contribution des méthodes de biologie moléculaire de façon routinière reste à définir.

Cette étude est la première évaluant la PCR Curetis® Unyvero sur un effectif de patients et un nombre d'échantillons aussi important. Elle a permis de mettre en évidence les faiblesses de cette technologie concernant la détection des bactéries notamment quand l'inoculum bactérien est faible, y compris pour les pathogènes les plus souvent retrouvés dans les IOAP (*S. aureus*, SCN) (29). De même, la détection de la méticillino-résistance reste médiocre ce qui constitue pourtant un point crucial.

En cas de prélèvements réalisés lors d'infections aiguës, hématogènes ou chez des patients sans antibiothérapie, la culture avec de bonnes conditions pré-analytique (broyage) et analytiques (milieu de culture et durée d'incubation) (49) semble suffire en première intention. De plus, la culture possède l'avantage de procurer du matériel vivant permettant de réaliser une étude complète des résistances bactériennes et si besoin des études épidémiologiques.

A l'inverse, lors d'infections chroniques, si les patients ont été opérés sous antibiotiques ou lors d'infections complexes discutées en RCP, d'autres techniques telles que la biologie moléculaire (PCR 16S ou PCR Curetis®) conservent un intérêt. L'avantage de la PCR Curetis® par rapport à la PCR 16S est sa simplicité à mettre en œuvre, son faible temps technique (15 minutes) et sa facilité d'accréditation. En revanche, dans un contexte contraint économiquement, son coût demeure important.

Nous avons pu voir que les performances de cette technique ne sont pas optimales mais des améliorations ont déjà été conduites et d'autres sont en cours. En effet, la société Curetis® va bientôt commercialiser une nouvelle génération de cartouche améliorée, en intégrant la détection du gène de l'ARN 16S, ceci permettra de pallier aux inconvénients d'une PCR multiplexe contenant un panel non exhaustif. Ainsi, en cas de détection de l'ARN 16S, une technique classique par PCR 16S pourra être réalisée puis un séquençage permettant

l'identification du pathogène en cas d'infection monomicrobienne.

A l'avenir, une étude pour évaluer en prospectif cette conduite diagnostique (Figure 32) et la nouvelle génération de cartouche pourrait être mise en place, notamment en intégrant la PCR multiplexe et la sonication des prothèses.

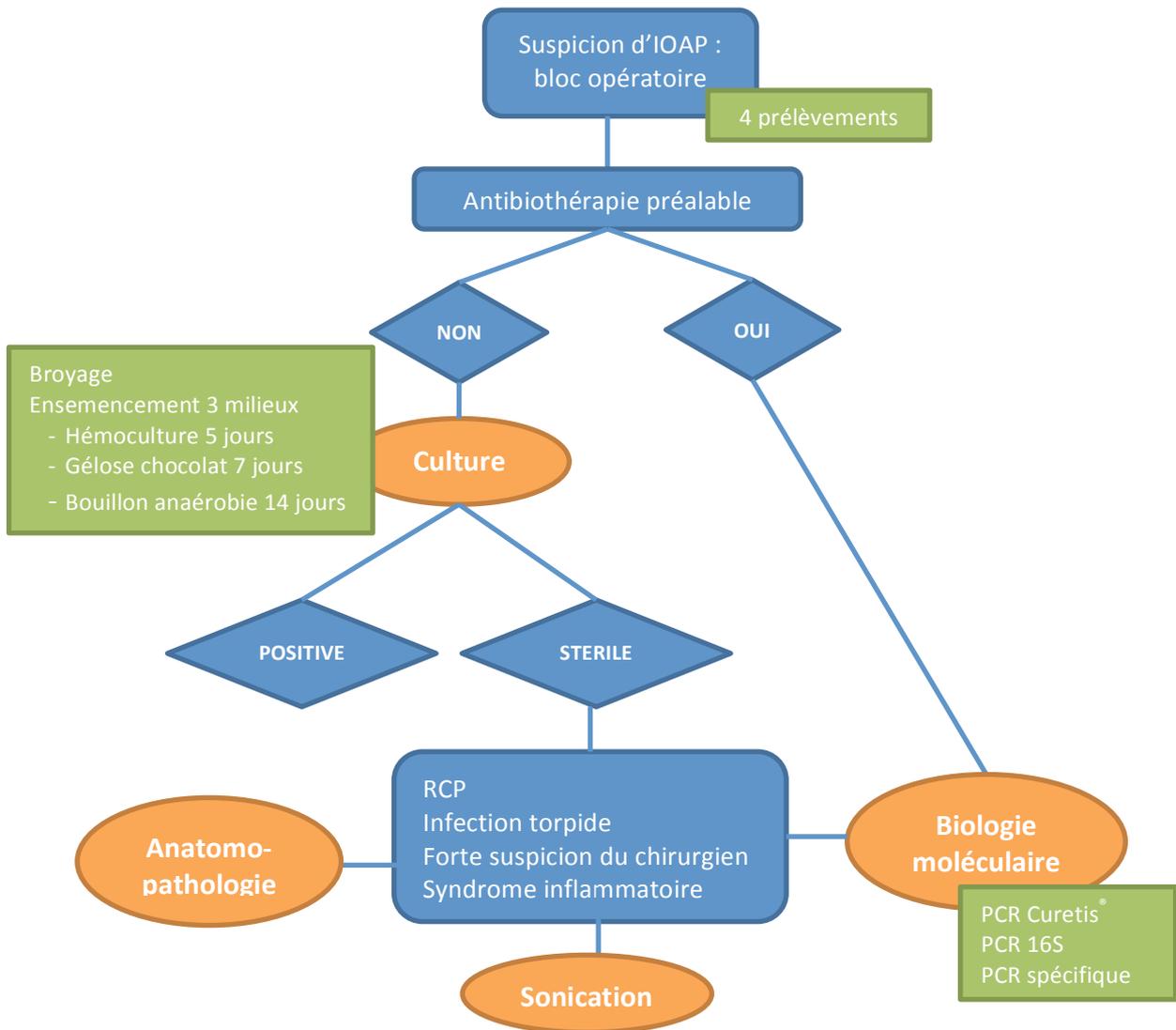


Figure 32 : Proposition d'arbre décisionnel pour le diagnostic microbiologique des IOAP.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Trampuz A, Widmer AF. Infections associated with orthopedic implants. *Curr Opin Infect Dis.* 2006 Aug;19(4):349–56.
2. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-Joint Infections. *N Engl J Med.* 2004 Oct;351(16):1645–54.
3. Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am.* 2007 Apr;89(4):780–5.
4. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Executive Summary: Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2013 Jan ;56(1):1–10.
5. Bémer P, Plouzeau C, Tande D, Léger J, Giraudeau B, Valentin AS, et al. Evaluation of 16S rRNA gene PCR sensitivity and specificity for diagnosis of prosthetic joint infection: a prospective multicenter cross-sectional study. *J Clin Microbiol.* 2014 Oct;52(10):3583–9.
6. Trampuz A, Steinrücken J, Clauss M, Bizzini A, Furustrand U, Uçkay I, et al. New methods for the diagnosis of implant-associated infections. *Rev Médicale Suisse.* 2010 Apr 7;6(243):731–4.
7. Portillo ME, Salvadó M, Trampuz A, Siverio A, Alier A, Sorli L, et al. Improved diagnosis of orthopedic implant-associated infection by inoculation of sonication fluid into blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2015 May;53(5):1622–7.
8. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of Removed Hip and Knee Prostheses for Diagnosis of Infection. *N Engl J Med.* 2007 Aug;357(7):654–63.
9. Portillo ME, Salvadó M, Trampuz A, Plasencia V, Rodriguez-Villasante M, Sorli L, et al. Sonication versus vortexing of implants for diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* 2013 Feb;51(2):591–4.

10. Allais E. Diagnostic bactériologique des infections ostéo-articulaires : apport d'une nouvelle technique basée sur la technologie des puces à ADN. Lyon: Université Claude Bernard; 2010.
11. Marín M, Garcia-Lechuz JM, Alonso P, Villanueva M, Alcalá L, Gimeno M, et al. Role of Universal 16S rRNA Gene PCR and Sequencing in Diagnosis of Prosthetic Joint Infection. *J Clin Microbiol.* 2012 Mar 1;50(3):583–9.
12. Mandal S, Berendt AR, Peacock SJ. *Staphylococcus aureus* bone and joint infection. *J Infect.* 2002 Apr;44(3):143–51.
13. Klein RS. Joint infection, with consideration of underlying disease and sources of bacteremia in hematogenous infection. *Clin Geriatr Med.* 1988 May;4(2):375–94.
14. Bernard L. Mécanismes physiopathologiques des infections sur matériel orthopédique. *Rev Rhum.* 2006 Apr;73(4):327–31.
15. Gaudin A, Amador Del Valle G, Hamel A, Le Mabecque V, Miegerville A-F, Potel G, et al. A new experimental model of acute osteomyelitis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rabbit. *Lett Appl Microbiol.* 2011 Mar;52(3):253–7.
16. Cordero-Ampuero J, de Dios M. What are the risk factors for infection in hemiarthroplasties and total hip arthroplasties? *Clin Orthop.* 2010 Dec;468(12):3268–77.
17. Berbari EF, Hanssen AD, Duffy MC, Steckelberg JM, Ilstrup DM, Harmsen WS, et al. Risk Factors for Prosthetic Joint Infection: Case-Control Study. *Clin Infect Dis.* 1998 Nov 1;27(5):1247–54.
18. Grimpel E, Cohen R. Epidemiology and physiopathology of osteoarticular infections in children (newborns except). *Arch Pédiatrie Organe Off Societe Fr Pédiatrie.* 2007 Oct;14 Suppl 2:S81–5.
19. Gutierrez K. Bone and joint infections in children. *Pediatr Clin North Am.* 2005 Jun;52(3):779–94, vi.
20. Speziale P, Pietrocola G, Rindi S, Provenzano M, Provenza G, Di Poto A, et al.

Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future Microbiol.* 2009 Dec;4(10):1337–52.

21. Wright JA, Nair SP. Interaction of staphylococci with bone. *Int J Med Microbiol IJMM.* 2010 Feb;300(2-3):193–204.

22. Crémieux A-C, Dumitrescu O, Lina G, Vallee C, Côté J-F, Muffat-Joly M, et al. Panton-valentine leukocidin enhances the severity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* rabbit osteomyelitis. *PloS One.* 2009;4(9):7204.

23. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008 Jan;52(1):13–22.

24. Direction générale de l'offre de soins (DGOS). Centres de référence interrégionaux pour la prise en charge des Infections Ostéo-Articulaires complexes. [Sante.gouv.fr](http://Sante.gouv.fr).

25. Direction générale de l'offre de soins (DGOS). Instruction DGOS/PF2/2010/466 du 27 décembre 2010 relative au dispositif de prise en charge des infections ostéo-articulaires complexes. [Sante.gouv.fr](http://Sante.gouv.fr).

26. CRIOGO. Centre de Référence Interrégional pour la prise en charge des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest. [www.criogo.fr](http://www.criogo.fr).

27. Ochsner PE, Borens O, Bodler P-M, Broger I, Eich G, Ferry T, et al. Infections ostéo-articulaires Fondements, prophylaxie, diagnostic et traitement. 1er édition française. Groupe d'experts infections ostéo-articulaires de la Société Suisse d'Orthopédie et de Traumatologie et de la Société Suisse d'Infectiologie; 2015.

28. HAS. Prothèse de hanche ou de genou : diagnostic et prise en charge des infections dans le mois suivant l'implantation. 2014 Mar.

29. Tande AJ, Patel R. Prosthetic Joint Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Apr;27(2):302–45.

30. Patel A, Pavlou G, Mújica-Mota RE, Toms AD. The epidemiology of revision total knee and hip arthroplasty in England and Wales: a comparative analysis with projections for

the United States. A study using the National Joint Registry dataset. *Bone Jt J*. 2015 Aug;97-(8):1076–81.

31. Aubin GG, Portillo ME, Trampuz A, Corvec S. *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: from acne to implant-infections, from phylotype to resistance. *Médecine Mal Infect*. 2014 Jun;44(6):241–50.
32. Levy P-Y, Fenollar F, Stein A, Borrione F, Raoult D. *Finegoldia magna*: a forgotten pathogen in prosthetic joint infection rediscovered by molecular biology. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2009 Oct 15;49(8):1244–7.
33. Cataldo MA, Petrosillo N, Cipriani M, Cauda R, Tacconelli E. Prosthetic joint infection: Recent developments in diagnosis and management. *J Infect*. 2010 Dec;61(6):443–8.
34. Zimmerli W, Lew PD, Waldvogel FA. Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect. *J Clin Invest*. 1984 Apr;73(4):1191–200.
35. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs*. 2005 Nov;28(11):1062–8.
36. Zoubos AB, Galanakos SP, Soucacos PN. Orthopedics and biofilm – what do we know? A review. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2012 Jun 1;18(6):89–96.
37. Zimmerli W, Moser C. Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 Jul;65(2):158–68.
38. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Apr;4(4):295–305.
39. Tande AJ, Osmon DR, Greenwood-Quaintance KE, Mabry TM, Hanssen AD, Patel R. Clinical Characteristics and Outcomes of Prosthetic Joint Infection Caused by Small Colony Variant Staphylococci. 2014 Sep;5(5).
40. Crémet L, Broquet A, Brulin B, Jacqueline C, Dauvergne S, Brion R, et al. Pathogenic

potential of *Escherichia coli* clinical strains from orthopedic implant infections towards human osteoblastic cells. *Pathog Dis*. 2015 Nov;73(8):ftv065.

41. Sendi P, Zimmerli W. Challenges in periprosthetic knee-joint infection. *Int J Artif Organs*. 2011 Sep;34(9):947–56.

42. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF), Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales (CMIT), Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique (GPIP), Société Française d'Anesthésie et de Réanimation (SFAR), Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (SOFOT), Société Française d'Hygiène Hospitalière (SFHH), et al. Recommendations for clinical practice. Osteo-articular infection therapy according to materials used (prosthesis, implants, osteosynthesis). *Médecine Mal Infect*. 2009 Oct;39(10):745–74.

43. Morawietz L, Classen R, Schröder JH, Dynybil C, Perka C, Skwara A, et al. Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol*. 2006 Jun;59(6):591–7.

44. Krenn V, Morawietz L, Perino G, Kienapfel H, Ascherl R, Hassenpflug GJ, et al. Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract*. 2014 Dec;210(12):779–86.

45. Kashima TG, Inagaki Y, Grammatopoulos G, Athanasou NA. Use of chloroacetate esterase staining for the histological diagnosis of prosthetic joint infection. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2015 May;466(5):595–601.

46. Parvizi J, Zmistowski B, Berbari EF, Bauer TW, Springer BD, Della Valle CJ, et al. New Definition for Periprosthetic Joint Infection: From the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. *Clin Orthop*. 2011 Nov;469(11):2992–4.

47. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2013 Jan;56(1):1–25.

48. Parvizi J, Gehrke T, Chen AF. Proceedings of the International Consensus on

Periprosthetic Joint Infection. *Bone Jt J.* 2013 Nov;95:1450–2.

49. Bémer P, Léger J, Tandé D, Plouzeau C, Valentin AS, Jolivet-Gougeon A, et al. How many samples and how many culture media to diagnose a Prosthetic Joint Infection: A clinical and microbiological prospective multicenter study. *J Clin Microbiol.* 2015 Dec 4;
50. Bjerkan G, Witso E, Nor A, Viset T, Loseth K, Lydersen S, et al. A comprehensive microbiological evaluation of fifty-four patients undergoing revision surgery due to prosthetic joint loosening. *J Med Microbiol.* 2012 Apr 1;61:572–81.
51. Illiaquer M, Corvec S, Touchais S, Boutoille D, Asseray N, Juvin M-E, et al. Anaerobes isolated from bone and joint infections and their susceptibility to antibiotics. *J Infect.* 2012 Nov;65(5):473–5.
52. Trampuz A, Hanssen AD, Osmon DR, Mandrekar J, Steckelberg JM, Patel R. Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. *Am J Med.* 2004 Oct;117(8):556–62.
53. Dinneen A, Guyot A, Clements J, Bradley N. Synovial fluid white cell and differential count in the diagnosis or exclusion of prosthetic joint infection. *Bone Jt J.* 2013 Apr;95-(4):554–7.
54. Chimento GF, Finger S, Barrack RL. Gram stain detection of infection during revision arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br.* 1996 Sep;78(5):838–9.
55. Johnson AJ, Zywiell MG, Stroh DA, Marker DR, Mont MA. Should gram stains have a role in diagnosing hip arthroplasty infections? *Clin Orthop.* 2010 Sep;468(9):2387–91.
56. Font-Vizcarra L, García S, Martínez-Pastor JC, Sierra JM, Soriano A. Blood culture flasks for culturing synovial fluid in prosthetic joint infections. *Clin Orthop.* 2010 Aug;468(8):2238–43.
57. Roux A-L, Sivadon-Tardy V, Bauer T, Lortat-Jacob A, Herrmann J-L, Gaillard J-L, et al. Diagnosis of prosthetic joint infection by beadmill processing of a periprosthetic specimen. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Mar;17(3):447–50.

58. Bottner F, Wegner A, Winkelmann W, Becker K, Erren M, Götze C. Interleukin-6, procalcitonin and TNF-alpha: markers of peri-prosthetic infection following total joint replacement. *J Bone Joint Surg Br.* 2007 Jan;89(1):94–9.
59. Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, Cameron A, Schiller K, Parvizi J. Diagnosing Periprosthetic Joint Infection: Has the Era of the Biomarker Arrived? *Clin Orthop Relat Res.* 2014 Mar 4;472(11):3254–62.
60. Ettinger M, Calliess T, Kielstein JT, Sibai J, Brückner T, Lichtinghagen R, et al. Circulating Biomarkers for Discrimination Between Aseptic Joint Failure, Low-Grade Infection, and High-Grade Septic Failure. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2015 Aug 1;61(3):332–41.
61. Jenny J-Y, Adamczewski B, De Thomasson E, Godet J, Bonfait H, Delaunay C, et al. Can the presence of an infection be predicted before a revision total hip arthroplasty? Preliminary study to establish an infection score. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2016 Feb 10;
62. Marmor S, Bauer T, Desplaces N, Heym B, Roux A-L, Sol O, et al. Multiplex antibody detection for the non-invasive genus-level diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* 2016 Feb;JCM.02885–15.
63. Drago L, Romanò CL, Mattina R, Signori V, De Vecchi E. Does dithiothreitol improve bacterial detection from infected prostheses? A pilot study. *Clin Orthop.* 2012 Oct;470(10):2915–25.
64. Drago L, Signori V, De Vecchi E, Vassena C, Palazzi E, Cappelletti L, et al. Use of dithiothreitol to improve the diagnosis of prosthetic joint infections. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 2013 Nov;31(11):1694–9.
65. Scorzolini L, Lichtner M, Iannetta M, Mengoni F, Russo G, Panni AS, et al. Sonication technique improves microbiological diagnosis in patients treated with antibiotics before surgery for prosthetic joint infections. *New Microbiol.* 2014 Jul;37(3):321–8.
66. Bogut A, Niedźwiadek J, Koziół-Montewka M, Strzelec-Nowak D, Blacha J, Mazurkiewicz T, et al. Sonication as a diagnostic approach used to investigate the infectious etiology of prosthetic hip joint loosening. *Pol J Microbiol Pol Tow Mikrobiol Pol Soc*

Microbiol. 2014;63(3):299–306.

67. Portillo ME, Salvadó M, Alier A, Martínez S, Sorli L, Horcajada JP, et al. Advantages of sonication fluid culture for the diagnosis of prosthetic joint infection. *J Infect.* 2014 Jul;69(1):35–41.
68. Shen H, Tang J, Wang Q, Jiang Y, Zhang X. Sonication of explanted prosthesis combined with incubation in BD bactec bottles for pathogen-based diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* 2015 Mar;53(3):777–81.
69. Jordan RW, Smith NA, Saithna A, Sprowson AP, Foguet P. Sensitivities, specificities, and predictive values of microbiological culture techniques for the diagnosis of prosthetic joint infection. *BioMed Res Int.* 2014;2014:180416.
70. Minassian AM, Newnham R, Kalimeris E, Bejon P, Atkins BL, Bowler ICJW. Use of an automated blood culture system (BD BACTEC™) for diagnosis of prosthetic joint infections: easy and fast. *BMC Infect Dis.* 2014;14:233.
71. Berbari EF, Marculescu C, Sia I, Lahr BD, Hanssen AD, Steckelberg JM, et al. Culture-negative prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2007 Nov 1;45(9):1113–9.
72. Schäfer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2008 Dec 1;47(11):1403–9.
73. Peel TN, Cole NC, Dylla BL, Patel R. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry and diagnostic testing for prosthetic joint infection in the clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015 Mar;81(3):163–8.
74. Thomin J, Aubin GG, Foubert F, Corvec S. Assessment of four protocols for rapid bacterial identification from positive blood culture pellets by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (Vitek® MS). *J Microbiol Methods.* 2015 Aug;115:54–6.
75. François Denis, Marie-Cécile Ploy, Christel Martin, Edouard Bingen, Roland Quentin.

Bactériologie médicale : techniques usuelles. 2e éd. Masson.

76. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarski EB, Fox AJ. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol.* 2000 May;38(5):1747–52.
77. Lévy P-Y, Fenollar F. The role of molecular diagnostics in implant-associated bone and joint infection. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Dec;18(12):1168–75.
78. Levy P-Y, Fournier P-E, Fenollar F, Raoult D. Systematic PCR Detection in Culture-negative Osteoarticular Infections. *Am J Med.* 2013 Dec;126(12):1143.25–1143.
79. Dubouix-Bourandy A, de Ladoucette A, Pietri V, Mehdi N, Benzaquen D, Guinand R, et al. Direct detection of *Staphylococcus* osteoarticular infections by use of Xpert MRSA/SA SSTI real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2011 Dec;49(12):4225–30.
80. Titécat M, Loïez C, Senneville E, Wallet F, Dezèque H, Legout L, et al. Evaluation of rapid *mecA* gene detection versus standard culture in staphylococcal chronic prosthetic joint infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012 Aug;73(4):318–21.
81. Lourtet-Hascoëtt J, Bicart-See A, Félicé MP, Giordano G, Bonnet E. Is Xpert MRSA/SA SSTI real-time PCR a reliable tool for fast detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in periprosthetic joint infections? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015 Sep;83(1):59–62.
82. Valour F, Blanc-Pattin V, Freydière A-M, Bouaziz A, Chanard E, Lustig S, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistance in bone and joint infection samples: evaluation of the GeneXpert MRSA/SA SSTI assay. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014 Mar;78(3):313–5.
83. Plouzeau C. Performance des PCR staphylocoque et *mecA* dans les infections ostéo-articulaires sur prothèse (IOAP). Communications Orales presented at: 2ème Congrès National des CRIOAC; 2015 Apr 9; Lille.
84. Vandercam B, Jeumont S, Cornu O, Yombi J-C, Lecouvet F, Lefèvre P, et al. Amplification-based DNA analysis in the diagnosis of prosthetic joint infection. *J Mol Diagn*

JMD. 2008 Nov;10(6):537–43.

85. Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Karau MJ, Schmidt SM, Urena EOG, et al. Rapid Molecular Microbiologic Diagnosis of Prosthetic Joint Infection. *J Clin Microbiol*. 2013 Jul;51(7):2280–7.
86. Portillo ME, Salvadó M, Sorli L, Alier A, Martínez S, Trampuz A, et al. Multiplex PCR of sonication fluid accurately differentiates between prosthetic joint infection and aseptic failure. *J Infect*. 2012 Dec;65(6):541–8.
87. Kim H, Kim J, Ihm C. The usefulness of multiplex PCR for the identification of bacteria in joint infection. *J Clin Lab Anal*. 2010 Jan 1;24(3):175–81.
88. Prove-it Sepsis [Internet]. Mobidiag. Available from: <http://old.mobidiag.com>.
89. Trouillet-Assant S, Valour F, Mouton W, Martins-Simões P, Lustig S, Laurent F, et al. Methicillin-susceptible strains responsible for postoperative orthopedic infection are not selected by the use of cefazolin in prophylaxis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016 Mar;84(3):266–7.
90. Hischebeth GTR, Randau TM, Buhr JK, Wimmer MD, Hoerauf A, Molitor E, et al. Unyvero i60 implant and tissue infection (ITI) multiplex PCR system in diagnosing periprosthetic joint infection. *J Microbiol Methods*. 2016 Feb;121:27–32.
91. Borde JP, Häcker GA, Guschl S, Serr A, Danner T, Hübner J, et al. Diagnosis of prosthetic joint infections using UMD-Universal Kit and the automated multiplex-PCR Unyvero i60 ITI® cartridge system: a pilot study. *Infection*. 2015 May 29;1–10.
92. Rodriguez Sevilla G, Prieto-Borja L, Blanco A, Cimas D, Fernandez-Roblas R, Gaeda I, et al. Evaluation of a new multiplex PCR assay of the sonication implant for the diagnosis of prosthetic joint infection. 2015 Apr 27; ESCMID Copenhagen, Denmark.
93. Babič MN, Zalar P, Ženko B, Schroers H-J, Džeroski S, Gunde-Cimerman N. *Candida* and *Fusarium* species known as opportunistic human pathogens from customer-accessible parts of residential washing machines. *Fungal Biol*. 2015 Mar;119(2-3):95–113.

94. Jakobs O, Schoof B, Klatte TO, Schmidl S, Fensky F, Guenther D, et al. Fungal Periprosthetic Joint Infection in Total Knee Arthroplasty: A Systematic Review. *Orthop Rev.* 2015 Mar .
95. Hischebeth GTR, Wimmer MD, Molitor E, Seifert H, Gravius S, Bekeredjian-Ding I. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* reaches a new frontier: prosthetic hip joint infection. *Infection.* 2015 Feb;43(1):95–7.
96. Grenier Y, Miri N, Herrmann J-L, Gaillard J-L, Roux A-L, Rottman M. Molecular analysis of pooled bead-milled intraoperative samples from periprosthetic joint infections using Curetis' Unyvero i60 ITI. 2016 Apr 9; ESCMID Amsterdam, Nederland.
97. Ehrlich GD, Hu FZ, Sotereanos N, Sewicke J, Parvizi J, Nara PL, et al. What role do periodontal pathogens play in osteoarthritis and periprosthetic joint infections of the knee? *J Appl Biomater Funct Mater.* 2014;12(1):13–20.
98. Jacovides CL, Kreft R, Adeli B, Hozack B, Ehrlich GD, Parvizi J. Successful identification of pathogens by polymerase chain reaction (PCR)-based electron spray ionization time-of-flight mass spectrometry (ESI-TOF-MS) in culture-negative periprosthetic joint infection. *J Bone Joint Surg Am.* 2012 Dec 19;94(24):2247–54.
99. Zegaer BH, Ioannidis A, Babis GC, Ioannidou V, Kossyvakis A, Bersimis S, et al. Detection of bacteria bearing resistant biofilm forms, by using the universal and specific PCR is still unhelpful in the diagnosis of periprosthetic joint infections. *Infect Dis.* 2014;1:30.
100. Melendez DP, Uhl JR, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Sampath R, Patel R. Detection of Prosthetic Joint Infection by Use of PCR-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Applied to Synovial Fluid. *J Clin Microbiol.* 2014 Jun 1;52(6):2202–5.
101. Greenwood-Quaintance KE, Uhl JR, Hanssen AD, Sampath R, Mandrekar JN, Patel R. Diagnosis of prosthetic joint infection by use of PCR-electrospray ionization mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2014 Feb;52(2):642–9.
102. Widen R, Healer V, Silbert S. Laboratory evaluation of the BD MAX MRSA assay. *J Clin Microbiol.* 2014 Jul;52(7):2686–8.

103. Patrice Courvalin, Roland Leclercq, Édouard Bingen. ANTIBIOGRAMME. 3ème Edition. ESKA; 2012.
104. Sampathkumar P, Osmon DR, Cockerill FR. Prosthetic joint infection due to *Staphylococcus lugdunensis*. Mayo Clin Proc. 2000 May;75(5):511–2.
105. D' Ersu J, Aubin GG, Mercier P, Nicollet P, Bémer P, Corvec S. Characterization of *Staphylococcus caprae* Clinical Isolates Involved in Human Bone and Joint Infections, Compared with Goat Mastitis Isolates. J Clin Microbiol. 2016 Jan;54(1):106–13.

**Vu, le Président du jury,**

Dr Nathalie CAROFF

**Vu, le Directeur de thèse,**

Dr Stéphane CORVEC

**Vu, le Directeur de l'UFR,**

Dr Virginie Ferré

---

**Nom - Prénoms :** MALANDAIN Damasie, Agnès, Augustine

**Titre de la thèse :** Evaluation d'une PCR multiplexe combinée pour la détection rapide des bactéries directement à partir des prélèvements ostéo-articulaires broyés.

---

**Résumé de la thèse :**

Les Infections Ostéo-Articulaires sur Prothèses (IOAP) sont responsables d'une morbi-mortalité importante et leur nombre ne cesse d'augmenter. Leur prise en charge demeure complexe et tout particulièrement le diagnostic microbiologique. De nouvelles techniques de diagnostic de biologie moléculaire arrivent sur le marché. Nous avons étudié les performances d'une de ces techniques : la PCR multiplexe combinée Curetis<sup>®</sup>, en la comparant à deux autres techniques existantes la culture optimisée, considérée comme le « Gold Standard » et la PCR ARN 16S.

Quatre cent quatre-vingt quatre prélèvements per-opératoires de natures variées (251 patients) ont été inclus dans sept centres différents, il s'agissait de prothèses de hanche, de genou, d'épaule et de coude.

Des taux de concordance de 58,1 % et de 70,1 % ont été observés respectivement avec la culture et la PCR ARN 16S. Cette technique montre un manque de sensibilité lorsque l'inoculum bactérien est faible mais peut être intéressante lorsque les patients ont reçu une antibiothérapie préalable. Un arbre décisionnel pour le diagnostic microbiologique des IOAP incluant les différentes méthodes existantes a été proposé.

---

**MOTS CLÉS :**

INFECTIONS OSTÉO-ARTICULAIRES SUR PROTHESE - PCR MULTIPLEXE - CURETIS<sup>®</sup>

---

**JURY PRÉSIDENT :**

Madame le Pr. Nathalie CAROFF, Professeur de Bactériologie Faculté de Pharmacie – Nantes

**ASSESEURS :**

M. François GOUIN, Professeur de Chirurgie Orthopédique Faculté de Médecine – Nantes

M. David BOUTOILLE, Professeur de Maladies Infectieuses et Tropicales Faculté de Médecine – Nantes

M. Pascale BEMER, Praticien Hospitalier de Bactériologie CHU – Nantes

M. Aurélie GUILLOUZOUIC, Praticien Hospitalier de Bactériologie CHU – Nantes

M. Stéphane CORVEC, Maître de Conférences de Bactériologie Faculté de Médecine – Nantes

---

**Adresse de l'auteur :** 72 rue Bicoquet 14000 CAEN