

Faculté de Pharmacie

Année 2020

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 16 octobre 2020

Par Sophie Gad

Né(e) le 15 avril 1993 à Pau

Apport de la PCR multiplexe Unyvero ITI dans le diagnostic microbiologique des infections ostéo-articulaires

Thèse dirigée par le Professeur Véronique DUBOIS

Examineurs :

M^{me}. le Pr Sylvie ROGEZ, PU-PH, CHU de Limoges.....Présidente

M^{me}. le Pr Cécile BEBEAR, PU-PH, CHU de Bordeaux.....Juge

M^{me}. le Dr Bertille-Marie DE-BARBHEYRAC, MCU-PH, CHU de Bordeaux.....Juge

M^{me}. le Pr Véronique DUBOIS, PU-PH, CHU de Bordeaux..... Juge et Directrice

M. le Dr Frédéric-Antoine DAUCHY, PH, CHU de BordeauxMembre invité



Faculté de Pharmacie

Année 2020

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 16 octobre 2020

Par Sophie Gad

Né(e) le 15 avril 1993 à Pau

**Apport de la PCR multiplexe Unyvero ITI dans le diagnostic
microbiologique des infections ostéo-articulaires**

Thèse dirigée par le Professeur Véronique DUBOIS

Examineurs :

M^{me}. le Pr Sylvie ROGEZ, PU-PH, CHU de Limoges.....Présidente
M^{me}. le Pr Cécile BEBEAR, PU-PH, CHU de Bordeaux.....Juge
M^{me}. le Dr Bertille-Marie DE-BARBÉYRAC, MCU-PH, CHU de Bordeaux.....Juge
M^{me}. le Pr Véronique DUBOIS, PU-PH, CHU de Bordeaux..... Juge et Directrice
M. le Dr Frédéric-Antoine DAUCHY, PH, CHU de BordeauxMembre invité

Liste des enseignants

Le 1^{er} septembre 2019

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	HÉMATOLOGIE
JOST Jérémy	PHARMACIE CLINIQUE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BÉGAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTRÔLE DU MÉDICAMENT

BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CHEMIN Guillaume	BIOCHIMIE
CLÉDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSÉE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FABRE Gabin	SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET INGÉNIERIE APPLIQUÉE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LAVERDET Betty	PHARMACIE GALÉNIQUE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
PASCAUD-MATHIEU Patricia	PHARMACIE GALÉNIQUE – BIOMATÉRIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

BOUDOT Clotilde

MICROBIOLOGIE
(du 01/09/2018 au 31/08/2020)

MARCHAND Guillaume

CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
(du 01/09/2019 au 31/08/2020)

PROFESSEURS EMERITES :

DREYFUSS Gilles (jusqu'au 31/03/2020)

Remerciements

A Madame le Professeur Sylvie Rogez,

Pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect ainsi que de ma reconnaissance.

A Madame le Professeur Véronique Dubois,

Je vous suis très reconnaissante de m'avoir proposé ce travail et d'avoir dirigé cette thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée, votre disponibilité, votre patience, le partage de vos connaissances, vos encouragements et votre accompagnement au cours de ce travail ainsi que pendant mes semestres effectués dans le laboratoire de bactériologie. Soyez assurée de mon profond respect et de ma plus grande reconnaissance.

A Madame le Professeur Cécile Bébéar,

Votre participation en tant que membre du jury est pour moi un grand privilège. Je vous remercie pour la confiance que vous avez placée en moi, notamment au cours de mes semestres d'internat dans votre service. Veuillez trouver dans ce travail toute ma gratitude et mon profond respect.

A Madame le Docteur Bertille-Marie De-Barbeyrac,

Pour avoir aimablement accepté de participer à ce jury de thèse. Je vous remercie pour vos enseignements qui ont su me donner goût à la bactériologie, votre bienveillance et votre sympathie. Soyez assurée que votre participation à ce jury est pour moi un grand honneur.

A Monsieur le Docteur Frédéric-Antoine Dauchy,

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'être membre de ce jury et je vous prie de trouver ici l'expression de toute ma considération et de mon profond respect.

A tous les biologistes qui m'ont transmis leur savoir au cours de mon internat.

A Marie-Cécile Ploy, Olivier Barraud, Fabien Garnier, Christian Martin, Nadia Hidri, Sophie Alain, Sébastien Hantz, Jérôme Darreyre merci de m'avoir initiée à la microbiologie, au CHU de Limoges, là où toute l'histoire a commencé.

A Sabine Pereyre, Olivia Peuchant, Emilie Bessede, Sylvie Vacher pour le partage de votre savoir et pour m'avoir transmis votre passion pour la bactériologie.

A Nicolas Lechevalier, Jean-Philippe Vial, Christine Mouton et Marie-Lise Bats pour votre pédagogie.

A Ghizlane Belmedhi, pour ta joie de vivre et nos fous rires, Brigitte Roche, Stéphanie Mimouni et Stéphanie Bez pour vos connaissances et votre confiance.

A David pour tout ce que tu me transmets chaque jour, pour ton génie, mais aussi merci pour ton humour, nos fous rires (chocaoouuu !!!!!) et ta folie.

A Anne, je ne te remercie jamais assez pour l'immensité de tes connaissances, ta grande pédagogie, la personne brillante que tu es, toute ta bienveillance, sans oublier ton humour et ta sympathie. Merci pour tout ce que tu m'as appris et toute ta passion que tu m'as transmise.

Aux secrétaires et techniciens,

A toute l'équipe du laboratoire d'Arcachon, Christine, Rosa, Marie-France, Anita, Fabienne L., Fabienne M., Sandrine, Marie-No, Estelle, Marianne, Magalie, Jessica, Isabelle, sans oublier Josy et Valérie. Un grand merci pour votre accueil si chaleureux, votre bienveillance et votre gentillesse.

A l'équipe du laboratoire de Langon, merci pour votre sympathie et votre humour que vous apportez dans le labo chaque jour.

A tout le labo de Bactériologie de Bordeaux mais plus particulièrement à Mathilde, Mallorie et Paupau. Merci les filles pour votre soutien, pour nos potins et tous ces bons moments passés à vos côtés.

A tous les autres techniciens du CHU de Limoges et de Haut-Lévêque avec qui j'ai partagé mes semestres d'internat.

A tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse,

Aux infectiologues du service des maladies infectieuses de Pellegrin pour votre participation à l'inclusion des patients.

Merci à tous les internes actuellement dans le service de bactériologie pour votre implication dans la collection des échantillons et la réalisation des tests.

A mes co-internes,

A Léa, Caro et nos inoubliables soirées limougeaudes et sans qui le club des LDP n'aurait jamais existé ! Merci pour votre amitié et votre soutien à toute épreuve !

A Constance (bibou), mon retour en bactério n'aurait jamais été le même sans toi. A ce binôme de choc en bactério, nos moments de tic et tac à danser et courir dans les couloirs, à nos fous rires, à notre complicité !

A nos longues après-midis passées dans le BDI, café et sucreries avec Caro, Léa, Chacha, Maxime, Mouaffak, Charlotte, Julie et tous ceux que j'oublie.

A tous mes autres co-internes, Nathalie, Sarrah, Claire, VE, Laure, Hélène, Marine, les Chacha parce qu'il y en a 3, Ludivine, Claire, Mylène, Blandine, Maxime, Pauline, Xavier, FX, Thibaut, Ghanou et tous ceux que j'oublie.

A mes amis,

Camille, plus de 10 ans après et rien n'a changé, parce que comme tu le sais « on est collées !!! ». Les inséparables, nos débuts à se maquiller comme des poupées, nos fous rires, notre complicité, ton soutien à tout moment.

Sokhna, merci pour tous ces moments que l'on a passés depuis le lycée, pour ta gentillesse, ton grand cœur, et ta naïveté qui ne cesse de me faire sourire.

Chacha, mon gros ou plutôt grand chacha !!! Merci pour ton humour, pour toutes ces années de folie et d'amitié.

A Chacha (teuteu), Vic, Clément, Xav, Baptiste, Benjamin, JB, aux filles de la fac (Laure, Célia, Alix, Gaby), à Geogeo, Marin.

A ma famille,

A ma sœur Charlotte ou encore Cha, Chaton, Taton. A notre complicité sans nom, à ta patience, et à tout l'amour que tu m'apportes chaque jour.

A mes parents, Maman et Papa pour vos encouragements et votre compréhension sans conditions. Merci de m'avoir accompagnée pendant toutes mes études, merci pour tout ce que vous faites pour nous, merci pour votre inconditionnel amour.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Introduction	15
I. GENERALITES.....	17
I.1. Classification et définitions des infections ostéo-articulaires	17
I.1.1. Définitions.....	17
I.1.2. Classification	17
I.2. Physiopathologie des IOA.....	18
I.2.1. Voies de l'infection.....	18
I.2.2. Physiopathologie	18
I.3. Epidémiologie des IOA.....	22
I.3.1. Facteurs favorisants	22
I.3.2. Microorganismes impliqués	22
I.4. Critères diagnostiques des IOA.....	24
I.4.1. Clinique.....	24
I.4.2. Radiologique.....	25
I.4.3. Arguments biologiques (hors microbiologie)	27
I.4.4. Critères diagnostiques	28
I.5. Diagnostic microbiologique	30
I.5.1. Prélèvements.....	30
I.5.1.1. Prélèvements préopératoires	30
I.5.1.2. Prélèvements peropératoires	31
I.5.1.3. Autres prélèvements	31
I.5.2. Transport	31
I.5.3. Ensemencement.....	31
I.5.4. Examen direct.....	33
I.5.5. Culture	34
I.6. Examen anatomopathologique	36
I.7. Biologie moléculaire	36
I.7.1. PCR universelle	36
I.7.2. PCR spécifique	37
I.7.3. PCR multiplexe	38
I.7.3.1. PCR multiplexe « maison ».....	38
I.7.3.2. PCR mutiplexes commercialisées.....	39
I.8. Traitement	46
I.8.1. Traitement chirurgical	46
I.8.2. Traitement médical	47
II. OBJECTIFS	52
III. MATERIELS ET METHODES.....	53
III.1. Patients	53
III.2. Protocole	53
III.2.1. Prélèvements.....	53
III.2.2. Culture	53
III.2.3. PCR Unyvero ITI	54
III.3. Données recueillies	55
III.4. Analyse statistique	55
IV. RESULTATS	56

IV.1. Patients	56
IV.2. Culture	58
IV.3. PCR multiplexe Unyvero ITI.....	59
V. DISCUSSION	64
Conclusion	68
Références bibliographiques	70
VI. Annexes.....	77
Serment De Galien	82

Table des illustrations

Figure 1 : Structure anatomique des os longs	19
Figure 2 : Physiopathologie de l'ostéomyélite	20
Figure 3 : Formation du biofilm	21
Figure 4 : Radiographie d'une ostéomyélite	26
Figure 5 : Radiographie d'une infection sur prothèse articulaire	27
Figure 6 : Broyeur-homogénéiseur Ultra-Turrax (A) et flacon comportant des billes mécaniques (B).....	32
Figure 7 : Culture de matériel avant (A) et après sonication (B).....	32
Figure 8 : <i>Small colony variants</i> d'un staphylocoque à coagulase négative.....	35
Figure 9 : Préparation et présentation de la cassette FilmArray.....	40
Figure 10 : Présentation des modules de l'automate Unyvero	42
Figure 11 : Cassette Unyvero ITI	42
Figure 12 : Représentation des différentes étapes de la préparation de l'échantillon à la visualisation des résultats	43
Figure 13 : Chambres indépendantes de PCR (intérieur de la cassette de réaction)	43
Figure 14 : Réseau des CRIOAC en France	49
Figure 15 : Comparaison des résultats de la PCR Unyvero avec la culture des échantillons du groupe des infections prothétiques.....	60
Figure 16 : Comparaison des résultats de la PCR Unyvero avec la culture des échantillons du groupe des ostéites.....	62

Table des tableaux

Tableau 1 : [Classification de Tsukayama]	18
Tableau 2 : [Principaux microorganismes retrouvés dans les infections sur matériel précoces selon la HAS 2014]	24
Tableau 3 : [Proposition par Parvizi <i>et al.</i> de seuils des marqueurs de l'inflammation]	28
Tableau 4 : [Critères diagnostiques des recommandations dans l'infection sur matériel]	29
Tableau 5 : [Score proposé par Parvizi <i>et al.</i> des critères mineurs à partir des critères modifiés MSIS]	30
Tableau 6 : [Recommandations du nombre de prélèvements peropératoires dans les IOA sur matériel]	31
Tableau 7 : [Critères cytologiques des liquides articulaires]	33
Tableau 8 : [Performances analytiques du test Xpert [®] MRSA/SA dans le diagnostic des IOA]	37
Tableau 9 : [Performances analytiques de la PCR multiplexe « maison » de Cazanave <i>et al.</i>]	39
Tableau 10 : [Panel de détection de la cassette Unyvero ITI]	41
Tableau 11 : [Résumé des performances analytiques de la cassette Unyvero ITI]	45
Tableau 12 : [Recommandations antibiothérapie probabiliste des infections ostéo-articulaires sur matériel selon la SPILF et la HAS] (23)(28)	48
Tableau 13 : [Recommandations de traitements des IOA après documentation bactériologique] (23)(70)	50
Tableau 14 : [Caractéristiques des échantillons et des patients appartenant au groupe des infections sur prothèse]	57
Tableau 15 : [Caractéristiques des échantillons et des patients appartenant au groupe des ostéites]	58
Tableau 16 : [Résultats des cultures microbiologiques des échantillons du groupe des infections de prothèse]	58
Tableau 17 : [Résultats des cultures microbiologiques des échantillons du groupe des ostéites]	59
Tableau 18 : [Concordance des résultats de la PCR Unyvero et de la culture des échantillons du groupe des infections prothétiques]	60
Tableau 19 : [Comparaison des performances diagnostiques de la PCR Unyvero avec la culture chez les patients appartenant au groupe des infections prothétiques]	61
Tableau 20 : [Concordance des résultats de la PCR Unyvero et de la culture des échantillons du groupe des ostéites]	62
Tableau 21 : [Comparaison de la détection des gènes de résistance en PCR Unyvero avec les résultats de l'antibiogramme]	63

Introduction

Selon les données du programme de médicalisation des systèmes d'information, 28 453 patients ont été recensés pour une infection ostéo-articulaire en France en 2008 (1). Ces infections sont peu fréquentes cependant elles peuvent être responsables de complications sévères nécessitant de multiples reprises chirurgicales. Elles représentent un groupe hétérogène de pathologies réunissant les arthrites septiques, les ostéites, les spondylodiscites et les infections ostéo-articulaires sur matériel prothétique.

Actuellement, le diagnostic microbiologique par la culture standard reste le gold standard. L'identification bactérienne et la réalisation d'un antibiogramme sont essentielles pour la mise en place d'une antibiothérapie adaptée. Cependant, cette méthode de référence se heurte à certaines limites, parmi lesquelles une durée de culture prolongée, de 14 jours. En effet, certaines bactéries peu virulentes responsables principalement d'infections ostéo-articulaires, en présence de matériel, nécessitent plusieurs jours d'incubation pour leur mise en évidence. Cette technique peut être mise à défaut lorsque les patients sont exposés à une antibiothérapie préalable. La sensibilité de la culture standard s'avère parfois insuffisante compte tenu du nombre élevé de patients infectés dont les prélèvements demeurent stériles. D'après Trampuz *et al.*, les cultures de liquide synovial et tissu périprothétique présenteraient une sensibilité respectivement de 77% et 88% dans le diagnostic des infections prothétiques (2).

Les outils de biologie moléculaire actuellement mis à disposition semblent prometteurs mais souvent imparfaits. En effet, la PCR universelle est une technique lourde non applicable en routine, sujette à de nombreux résultats faussement positifs liés à l'ubiquité de l'ADN bactérien (3).

La PCR multiplexe Unyvero ITI présente le panel de détection le plus étendu parmi les PCR multiplexes disponibles à ce jour. Elle permet la détection simultanée, en 5 heures, de 85 principaux pathogènes impliqués dans les infections ostéo-articulaires (dont les Staphylocoques à coagulase négative et des germes anaérobies comme le *Cutibacterium acnes*) et la mise en évidence de 17 gènes de résistance aux antibiotiques. Cette technique automatisée présente comme principal intérêt un gain de temps significatif dans le diagnostic microbiologique. En ce sens, la PCR multiplexe pourrait permettre de diminuer la durée de l'antibiothérapie probabiliste à large spectre ainsi que la durée d'hospitalisation.

Afin d'évaluer les performances diagnostiques de la PCR Unyvero, nous avons choisi de nous concentrer sur deux catégories de patients dans cette étude : ceux présentant des infections prothétiques, ainsi qu'un petit groupe de patients atteints d'ostéites.

La première partie de ce travail constitue un rappel bibliographique des données épidémiologiques, de la physiopathologie, des critères diagnostiques et de la prise en charge thérapeutiques des infections prothétiques et des ostéites. La deuxième partie présente les résultats de la PCR multiplexe Unyvero ITI en comparaison avec ceux de la culture microbiologique, ainsi que l'intérêt de cette technique moléculaire dans le diagnostic des infections ostéo-articulaires.

I. GENERALITES

I.1. Classification et définitions des infections ostéo-articulaires

I.1.1. Définitions

Le terme d'infections ostéo-articulaires (IOA) regroupe plusieurs entités cliniques. On distingue classiquement (4)(5) :

- L'arthrite septique sur os natif qui correspond à l'infection de l'articulation par une bactérie.
- L'ostéite désignant les infections des os. La voie de contamination permet de distinguer (6):
 - o L'ostéomyélite qui est la conséquence de la diffusion d'un germe par voie hémotogène. Elle siège principalement au niveau de la métaphyse ou de l'épiphyse au contact des cartilages de croissance.
 - o Les ostéites post-traumatiques ou post-chirurgicales liées à l'inoculation directe du microorganisme. Elles sont dites aiguës si elles surviennent moins d'un mois après la chirurgie et chroniques au-delà de ce délai.
 - o L'ostéite du pied diabétique dont la contamination est le plus souvent par contiguïté à partir d'une plaie cutanée
- La spondylodiscite infectieuse qui correspond à l'infection d'un ou plusieurs disques intervertébraux ou de deux vertèbres adjacentes.
- L'infection ostéo-articulaire sur matériel prothétique ou d'ostéosynthèse qui appartient au groupe des IOA complexes.

I.1.2. Classification

Les IOA sont classées selon différents critères : le caractère aiguë ou chronique ; le site anatomique ; la présence ou l'absence de matériel ; l'origine communautaire ou liée aux soins et la voie de contamination (4).

Concernant les infections sur prothèse, il n'existe pas de classification universelle. Les infections post-opératoires sont habituellement classées selon le délai d'apparition des manifestations cliniques après la chirurgie. Les délais varient selon les différentes sociétés savantes (Infectious Diseases Society of America (IDSA), Société de Pathologie Infectieuse de la Langue Française (SPILF), Musculoskeletal Infection Society (MSIS)). Selon la SPILF, une infection sur prothèse post-opératoire est définie comme :

- précoce si elle survient dans le premier mois après la chirurgie

- retardée si elle apparaît entre le 2^{ème} et le 6^{ème} mois après la chirurgie
- tardive au-delà du 6^{ème} mois

La classification la plus connue est celle de Tsukayama (Tableau 1)(7). Elle distingue :

- les infections post-opératoires précoces survenant dans le mois suivant la pose de prothèse
- les infections post-opératoires chroniques tardives qui se déroulent plus d'un mois après l'intervention
- les infections d'origine hématogène
- et les infections méconnues, initialement considérées comme un descellement aseptique mécanique et dont les cultures bactériologiques des prélèvements peropératoires sont positifs.

Tableau 1 : [Classification de Tsukayama]

Type d'infection	Critère
Post-opératoire précoce	< 1 mois après l'intervention
Post-opératoire tardive	> 1 mois après l'intervention
Hématogène	Contexte de bactériémie
Prélèvements peropératoires positifs	Absence de signes septiques

I.2. Physiopathologie des IOA

I.2.1. Voies de l'infection

La dissémination du microorganisme au niveau du site ostéo-articulaire peut se faire par voie hématogène au cours d'une bactériémie ou par inoculation directe du germe par effraction cutanée. Celle-ci peut être accidentelle ou iatrogène, médicale ou chirurgicale, à la suite d'une plaie pénétrante, d'une ponction articulaire, d'une infiltration, d'une arthroscopie ou d'une arthrographie. La contamination par contiguïté constitue également une des voies de l'infection à partir d'un foyer septique voisin (infection de la peau et des tissus mous telle qu'une dermohypodermite bactérienne, un abcès des parties molles, une bursite septique) (4)(5).

I.2.2. Physiopathologie

Le tissu osseux présente la particularité d'être richement vascularisé. Les artères nutritives de l'os s'organisent en capillaires artériels (Figure 1). Une obstruction des capillaires terminaux

liée à un traumatisme ou une insuffisance circulatoire peut entraîner rapidement une nécrose de l'os. Dans ce cas, le tissu devient une zone propice à la multiplication bactérienne (8).

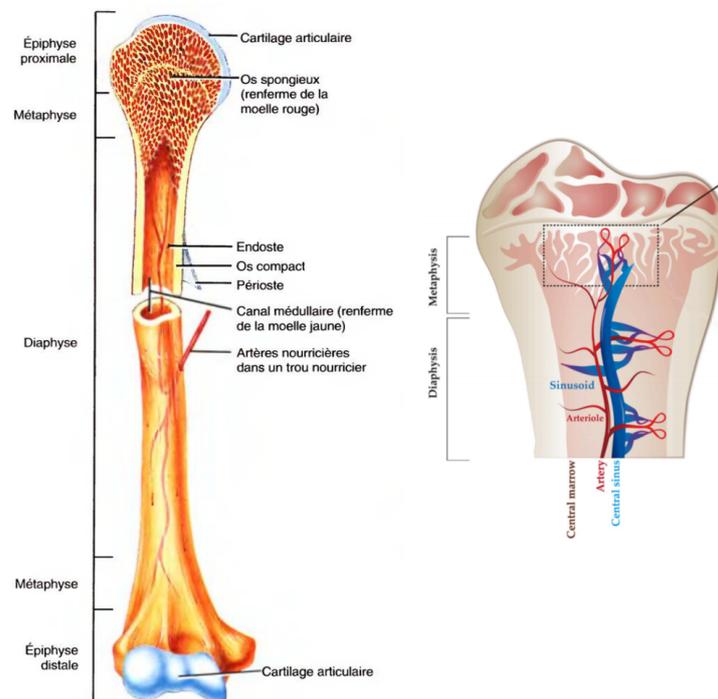


Figure 1 : Structure anatomique des os longs

Source : Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate hematopoiesis de Itkin *et al.* (9)

- Ostéite et ostéomyélite

L'ostéomyélite aiguë est fréquemment rencontrée chez l'enfant et l'adolescent. Elle survient après une bactériémie dont la porte d'entrée est le plus souvent cutanée. Les ostéites post-traumatiques survenant après une inoculation directe du microorganisme à partir de la flore cutanée ou de l'environnement ou post-chirurgicales peuvent atteindre tous les os. L'ostéomyélite de l'enfant se localise généralement au niveau de la métaphyse des os longs. La riche vascularisation métaphysaire et le ralentissement du flux sanguin favorisent la multiplication bactérienne. L'afflux de polynucléaires neutrophiles et de macrophages au site de l'infection conduit à une réaction inflammatoire locale. Ces acteurs de l'immunité produisent des cytokines pro-inflammatoires responsables de l'activation des ostéoclastes et d'une ostéolyse. La diffusion de l'infection en direction du périoste entraîne un décollement de celui-ci et la formation d'un abcès sous-périosté fistulisant à la peau (Figure 2). En l'absence de traitement, la thrombose des artères nourricières, par le processus inflammatoire, s'accompagne de la formation de zones de nécrose et de séquestres osseux (5)(10)(11). Les segments osseux dépourvus en apport sanguin vont se séparer pour former les séquestres. L'évolution de l'infection vers la chronicité, rare chez l'enfant, plus fréquente chez l'adulte, est

caractérisée par la persistance du microorganisme au sein de micro-cavités et l'extension de l'infection aux tissus mous adjacents (10)(12).

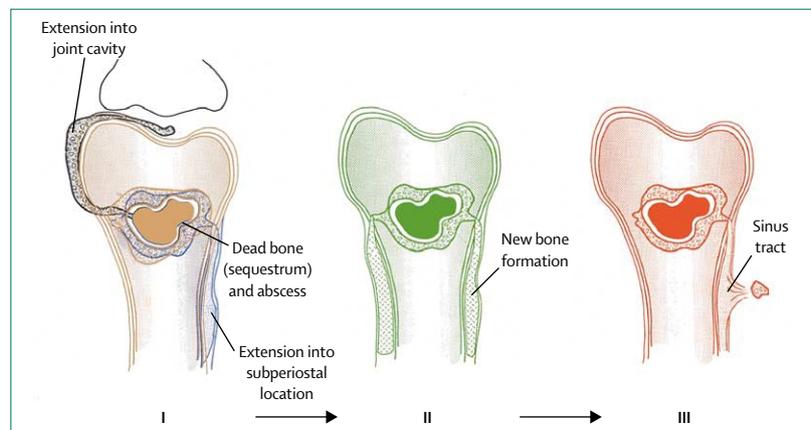


Figure 2 : Physiopathologie de l'ostéomyélite

Source : Osteomyelitis de Lew *et al.* (11)

- IOA sur prothèse

Les IOA sur matériel prothétique peuvent survenir par inoculation directe du microorganisme au moment de la chirurgie ou immédiatement après celle-ci, ou par contamination à partir des tissus voisins. Une infection superficielle du site opératoire peut secondairement infecter le matériel mis en place. Plus rarement, la contamination de la prothèse peut survenir à partir d'un foyer infectieux situé à distance par diffusion hématogène (13)(14)(15). Après contact du pathogène avec la surface de l'implant, le microorganisme colonise le matériel en place. Un faible inoculum suffit pour établir une infection. La mise en place du processus infectieux est favorisée par deux mécanismes : la persistance de la greffe bactérienne et l'altération du système macrophagique.

- Persistance de la greffe bactérienne

L'adhérence du microorganisme au contact du matériel implanté constitue la première étape de l'infection. Certains microorganismes, comme le *Staphylococcus aureus*, ont la capacité d'interagir avec la fibronectine, la fibrine et le collagène qui recouvrent les surfaces métalliques des biomatériaux en produisant des adhésines bactériennes (*fibronectin-binding protein*). Celles-ci ont une grande affinité pour les tissus vivants et inertes et vont interagir avec ces protéines de l'hôte adsorbées sur le matériel. Puis, la production de *slime* par les bactéries va conduire à stabiliser définitivement l'adhérence. Certaines souches sécrètent cette substance polysaccharidique qui permet la constitution du biofilm au sein duquel les bactéries se développent. A l'intérieur de cette structure, les microorganismes ont un métabolisme ralenti en raison des conditions nutritives médiocres, mais les espèces présentes sont capables

d'effectuer des modifications métaboliques nécessaires à leur survie. En effet, les bactéries enchâssées dans cette structure réduisent leur cinétique de multiplication et entrent en phase de croissance lente appelée phase stationnaire. Ces modifications peuvent se traduire par une diminution de la taille des colonies appelées *small colony variant* (SCV) en particulier chez les staphylocoques. Ces sous-populations émergentes de variants en microcolonies peuvent modifier leurs caractéristiques biochimiques, comme diminuer l'expression de la catalase chez certains staphylocoques. Certaines modifications métaboliques se traduisent également par une diminution de la pénétration des antibiotiques. Mais la diminution de l'efficacité des antimicrobiens est aussi en partie liée au ralentissement de la multiplication des bactéries qui entrent en phase de quiescence. A partir d'une certaine densité bactérienne, un réseau de communication intercellulaire appelé *quorum sensing* se met en place. Quand certaines conditions environnementales deviennent défavorables, des cellules appelées planctoniques et dont la sensibilité aux antibiotiques bactéricides reste intacte, se détachent du biofilm. Ce relargage permet l'extension de la colonisation du matériel et la colonisation de matériel inerte ou des tissus voisins sains (Figure 3). La formation du biofilm constitue un facteur de virulence qui participe à la chronicité de l'infection. En effet, à l'intérieur de celui-ci, les bactéries sont protégées des antimicrobiens et du système immunitaire de l'hôte (14)(15)(16)(17).

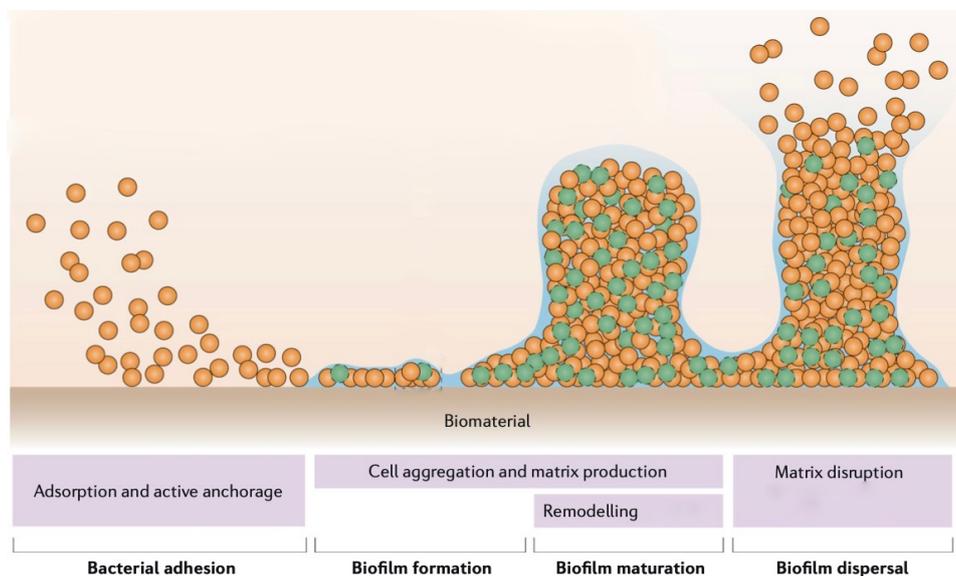


Figure 3 : Formation du biofilm

Source : Implant infections : adhesion, biofilm formation and immune evasion de Arciola *et al.* (18)

- Altération du système macrophagique

Dans le mois suivant la pose de la prothèse, la libération de radicaux libres oxygénés et de médiateurs de l'inflammation comme l'interleukine-1 (IL-1), le *Tumor Necrosis Facteur- α* (TNF- α) et l'interféron- γ (INF- γ) sont responsables d'une augmentation de la vascularisation au sein

des tissus osseux et prothétiques. La présence du matériel entraîne une diminution des défenses immunitaires locorégionales stabilisant l'adhérence bactérienne. L'altération du chimiotactisme, de la phagocytose et de l'activité bactéricide des polynucléaires neutrophiles et des macrophages participe à la colonisation de la prothèse (14). Ce climat pro-inflammatoire et l'inhibition des cellules macrophagiques favorisent l'adhérence bactérienne (15)(16).

I.3. Epidémiologie des IOA

Les IOA natives ou sur prothèse sont rares, mais 6,2% d'entre elles entraînent un séjour en réanimation, avec une mortalité hospitalière estimée à 0,5% de la mortalité hospitalière globale (1). Selon les données du programme de médicalisation des systèmes d'information (PMSI) de 2008, la prévalence globale des IOA était estimée, en 2008, à 54,6 pour 100 000 habitants. Dans 19,3% des cas, elles nécessitaient une réhospitalisation ce qui constituait un coût élevé (1).

L'ostéomyélite, plus fréquente chez l'enfant que chez l'adulte, représentait 10 nouveaux cas sur 100 000 habitants par an en France en 2008 (1).

Le taux d'infection sur prothèse, dans les deux premières années postopératoires après un premier remplacement articulaire, est généralement inférieur à 1% dans les prothèses de hanche et d'épaule, inférieur à 2% dans les prothèses de genou et inférieur à 9% dans les prothèses de coude (15). Cependant après une chirurgie de révision, le taux d'infection est généralement plus élevé, jusqu'à 40% (19). Aussi, les articulations prothétiques sont à risque d'infections toute la durée de la vie puisqu'elles sont exposées, au décours d'une bactériémie, par une diffusion hématogène (19).

I.3.1. Facteurs favorisants

Les IOA surviennent plus fréquemment chez les hommes (sexe ratio H/F= 1,54) de plus de 60 ans. L'âge moyen global des cas détectés des IOA est 63,1 ans (1). Les facteurs de risque majoritairement en cause dans ces infections sont l'obésité, le diabète, les troubles vasculaires périphériques, les affections des parties molles (plaies, ulcères), l'éthylisme chronique, la toxicomanie, l'immunodépression et la polyarthrite rhumatoïde (1).

I.3.2. Microorganismes impliqués

Les IOA sont monomicrobiennes dans 59% des cas et les bactéries les plus fréquemment responsables de ces infections sont des cocci Gram positif avec le *S. aureus* comme principal pathogène (20). Les microorganismes les plus souvent isolés sont les *Staphylococcus spp* dont le *S. aureus* et les staphylocoques à coagulase négative (SCN), puis les bacilles à Gram négatif et les entérocoques.

- Ostéite et ostéomyélite

Chez le diabétique, les ostéites sont polymicrobiennes dans 30% des cas avec une association fréquente de streptocoques, d'entérobactéries et de germes anaérobies (6)(12). Dans les ostéomyélites de l'enfant, *S. aureus* et *Kingella kingae* sont les deux principaux pathogènes impliqués. Les streptocoques bêta-hémolytiques, notamment *Streptococcus pyogenes*, le pneumocoque et l'*Haemophilus influenzae* b sont aussi responsables d'infections osseuses de l'enfant. Ces deux dernières bactéries sont moins souvent rencontrées ces dernières années en raison de la vaccination. Dans le cas particulier de la drépanocytose, l'ostéomyélite est principalement due à des bactéries du genre *Salmonella*. Chez les enfants en contact avec des animaux domestiques ou vivant dans un environnement rural, des bactéries atypiques comme *Coxiella burnetii*, *Bartonella spp*, *Brucella spp* peuvent être mises en évidence (21)(22).

- IOA sur prothèse

Les IOA sur matériel sont diagnostiquées, dans 74 à 90 % des cas, dans les trois premiers mois suivant la pose de la prothèse (23). Les microorganismes isolés dans les infections prothétiques et les IOA natives sont sensiblement les mêmes, avec une fréquence plus importante des SCN en présence de matériel (20)(24). En effet, certaines bactéries de la flore cutanée deviennent virulentes en présence de matériel étranger de par leur capacité à adhérer aux surfaces inertes et à produire du biofilm (13).

Les bactéries isolées diffèrent en fonction du moment de l'infection. Les infections post-opératoires précoces, se déroulant dans le mois suivant la chirurgie, impliquent dans 60% des cas le *S. aureus* ou des bacilles aérobies Gram négatifs, et sont le plus souvent monomicrobiennes. Ces microorganismes virulents sont probablement responsables de l'apparition précoce des symptômes.

Les infections post-opératoires tardives, liées à l'inoculation peropératoire de bactéries de la flore cutanée, sont associées à l'implantation de microorganismes peu virulents comme les SCN, les entérocoques ou *Cutibacterium acnes*. En effet, *C. acnes* est la bactérie anaérobie la plus fréquemment isolée dans les infections sur prothèse, en particulier de l'épaule (25)(26). Les bactéries virulentes ; *S. aureus*, les streptocoques bêta-hémolytiques et les entérobactéries ; sont aussi responsables d'infections d'origine hématogène survenant au cours d'une bactériémie (13)(14)(17)(23)(27).

Ainsi, en présence de matériel, toute bactérie isolée est potentiellement pathogène comme celles appartenant à des genres rares tels que *Brucella*, *Pasteurella*, *Listeria*, *Haemophilus* ou *Campylobacter* (Tableau 2). Dans 10% des cas, les IOA sur matériel sont polymicrobiennes (28). Selon les études, 7 à 35% des infections sur prothèse présentent une culture négative (13).

Tableau 2 : [Principaux microorganismes retrouvés dans les infections sur matériel précoces selon la HAS 2014]

Micro-organismes	% en fonction des études
<i>Staphylococcus</i>	75-88%
- <i>S. aureus</i>	42-55%
- SASM	27-37.7%
- SARM	8-26%
- SCN	21-48%
Bacilles à Gram négatif	14-39%
- Entérobactéries	7-32%
- <i>Acinetobacter spp</i>	0.5-3.9%
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.3-12%
Streptococcus	19.5%
- <i>Streptococcus spp</i>	3-6.5%
- <i>Enterococcus spp</i>	12-16%
<i>Corynebacterium spp</i>	2-19.5%
Anaérobies	8%
Mycobactéries	Exceptionnellement décrits
Levures	
Groupe HACEK (<i>Haemophilus, Kingella, Aggregatibacter, Capnocytophaga, Eikenella</i>)	

I.4. Critères diagnostiques des IOA

I.4.1. Clinique

- Ostéite et ostéomyélite

Dans l'ostéite de l'adulte, les signes locaux tels qu'une fistule ou une tuméfaction inflammatoire douloureuse sont principalement rencontrés. Dans les formes chroniques, la fièvre est rarement présente (6). Chez l'enfant, le diagnostic de l'ostéomyélite est avant tout clinique et se traduit par un début brusque avec des douleurs métaphysaires du fémur et du tibia le plus souvent, une impotence fonctionnelle, de la fièvre élevée et parfois une altération de l'état général (4)(7)(21). L'ostéomyélite peut être associée à une arthrite qui se caractérise par un épanchement articulaire douloureux à la mobilisation (29).

- IOA sur prothèse

Les arguments cliniques en faveur d'une infection postopératoire précoce sont : (4)(23)(28)

- un écoulement purulent, une inflammation, une nécrose ou une désunion de la cicatrice
- une impotence fonctionnelle

- une douleur
- des signes généraux présents de manière inconstante (fièvre, frissons)
- la présence d'une fistule plus ou moins productive signant l'infection

Les infections postopératoires survenant à distance de la pose de la prothèse peuvent être évoquées par l'existence d'une douleur, d'un descellement radiologique ou la présence d'une fistule affirmant l'infection (23).

En cas d'apparition de signes d'infection après un long intervalle de temps après la pose de la prothèse, il est recommandé de rechercher un foyer infectieux à distance pouvant être responsable d'une infection prothétique d'origine hématogène (23).

I.4.2. Radiologique

- Ostéite et ostéomyélite

Le diagnostic de première intention des ostéites repose sur la radiologie osseuse. Elle permet de visualiser les anomalies de la structure osseuse 15 à 21 jours après le début de l'infection. Dans l'ostéomyélite de l'enfant, l'échographie permet de confirmer le diagnostic, de rechercher un abcès sous-périosté et de guider une ponction éventuelle (29) (Figure 4). La tomодensitométrie permet l'analyse des parties fines osseuses et de mettre en évidence les séquestres osseux. L'IRM est l'examen clé permettant de détecter précocement l'inflammation des tissus mous et osseux (30). La scintigraphie osseuse, qui présente une sensibilité de 90 à 100 %, peut être utilisée dans le diagnostic des ostéites. Sa faible spécificité peut être améliorée par une scintigraphie aux leucocytes marqués. Elle consiste à extraire et marquer les globules blancs du patient qui en l'absence d'infection, ne s'accumulent pas dans l'os (4)(6).



Figure 4 : Radiographie d'une ostéomyélite

Source : ECN Pilly (4)

Abcès intra-osseux (flèches), ostéocondensation (astérisques), réactions périostées (têtes de flèches)

- IOA prothétique

En cas d'infection post-opératoire précoce ou d'origine hémotogène, la place de l'imagerie est restreinte. L'échographie peut être réalisée pour rechercher un épanchement intra-articulaire et guider une ponction articulaire (23)(28). Dans le premier mois suivant la pose de prothèse, l'analyse radiologique ne permet pas la mise en évidence d'anomalies évoquant une infection périprothétique (28).

En cas d'infection post-opératoire tardive, la radiologie conventionnelle est l'examen recommandé en première intention. Cet examen d'imagerie, normal dans la moitié des cas, présente une faible sensibilité de 14% et une spécificité de 70% (23). Les principaux signes radiologiques détectables sont la présence d'un liseré périprothétique, d'appositions périostées, des zones d'ostéolyse et de séquestres osseux (23)(Figure 5).

Le scanner avec injection de produit de contraste iodé est recommandé en deuxième intention. Il permet de visualiser la structure osseuse et l'analyse des parties molles. En cas de suspicion d'infection articulaire, l'absence d'épanchement intra-articulaire a une valeur prédictive négative de 96% (23). La scintigraphie osseuse couplée à une scintigraphie marquée aux polynucléaires est recommandée en troisième intention. La sensibilité de l'imagerie utilisant des radio-isotopes est de 81 à 97% et sa spécificité de 89 à 100% (4). L'utilisation de l'IRM n'est pas recommandée en raison de la possibilité d'artéfacts liés à la présence de matériel (23)(28).



Figure 5 : Radiographie d'une infection sur prothèse articulaire

Source : ECN Pilly (4)

Ostéolyse (astérisque), descellement prothétique (flèches) et appositions périostées (têtes de flèches)

I.4.3. Arguments biologiques (hors microbiologie)

- Ostéite

L'ostéite ne présente le plus souvent pas de syndrome inflammatoire biologique (4). Dans les infections aiguës, les marqueurs sériques de l'inflammation tels que la protéine C réactive (CRP) et la vitesse de sédimentation (VS) augmentent dans les heures suivant l'infection (11)(31). La CRP est habituellement normale ou modérément élevée dans les ostéites chroniques (6).

- IOA prothétique

Les infections sur prothèse post-opératoires précoces ou d'origine hématogène peuvent présenter un syndrome inflammatoire biologique (4). La SPILF recommande de suivre la cinétique de la CRP dans le mois suivant l'implantation de la prothèse (23). Dans le cas des infections post-opératoires tardives, il est préconisé de doser la VS et la CRP seulement en présence d'arguments évoquant une infection prothétique (23). La CRP sérique étant un marqueur de l'inflammation systémique non spécifique de l'infection, la mesure de la CRP dans le liquide synovial témoigne de l'état local (32). Sa concentration synoviale, plus précise que celle mesurée dans le sérum, augmente dans les infections prothétiques aiguës et

chroniques mais aussi dans les arthrites inflammatoires non infectieuses (32)(33). Cependant, certains microorganismes à pousse lente, comme le *C. acnes*, n'entraînent pas d'augmentation de la VS et de la CRP. Des études ont montré l'augmentation du taux de D-Dimères dans les infections locales et systémiques par l'activation de la fibrinolyse et par conséquent l'intérêt de son dosage dans les infections prothétiques (34)(35).

Ces précédents marqueurs de l'inflammation n'étant pas spécifiques des infections prothétiques, la recherche de l'alpha-défensine dans le liquide synovial peut être réalisée. En effet, il s'agit d'un peptide antimicrobien, libéré par les polynucléaires neutrophiles activés, qui détruit les agents pathogènes en s'intégrant dans leurs membranes cellulaires (36)(37). Son avantage par rapport aux autres marqueurs réside dans sa grande spécificité diagnostique (36)(37).

La leucocyte estérase, enzyme sécrétée par les polynucléaires neutrophiles peut aussi être détectée par une bandelette colorimétrique dans le liquide synovial (38). Sa concentration reflète le nombre de polynucléaires neutrophiles dans l'articulation infectée. La recherche de la leucocyte estérase présente l'avantage d'être un test simple rapide et spécifique (37)(38).

Parvizi *et al.* ont défini des seuils, pour les marqueurs de l'inflammation lors des infections aiguës et chroniques récapitulés dans le Tableau 3 ci-dessous (35)(Tableau 3).

Tableau 3 : [Proposition par Parvizi *et al.* de seuils des marqueurs de l'inflammation]

	Chronique (> 90 jours)	Aigue (< 90 jours)
CRP sérique (mg/dL)	1,0	10
D-Dimères sériques (ng/mL)	860	860
VS (mm/h)	30	-
CRP synoviale (mg/L)	6,9	6,9
Alpha-défensine synoviale (rapport signal/seuil)	1,0	1,0

I.4.4. Critères diagnostiques

Les sociétés savantes (SPILF, IDSA, MSIS) ont établi des critères, pour le diagnostic des IOA sur matériel, récapitulés dans le Tableau 4 ci-dessous. Les critères MSIS ont été modifiés par Parvizi *et al.*, en y intégrant les nouveaux marqueurs biologiques et le calcul d'un score permettant de conclure à une infection prothétique (35)(Tableau 5).

Tableau 4 : [Critères diagnostiques des recommandations dans l'infection sur matériel]

	SPILF (23)		IDSA (20)		MSIS modifiés (35)(39)	
	Preuve définitive	Argument en faveur	Preuve définitive	Argument en faveur	Preuve définitive	Argument en faveur
Fistule au contact de la prothèse	X		X		X	
Pus dans l'articulation ou au contact de la prothèse	X		X			X
Inflammation des tissus périprothétiques à l'anatomopathologie				X		X
3 prélèvements positifs peropératoires ou 2 peropératoires et 1 préopératoire avec même bactérie de flore cutanée	X					
2 prélèvements positifs peropératoires ou 1 peropératoire et 1 préopératoire avec même bactérie de la flore cutanée			X			
1 prélèvement positif avec 1 bactérie pathogène	X		X			
2 prélèvements positifs avec 1 même bactérie					X	
1 prélèvement positif						X
CRP et/ou D-Dimères augmenté(es)						X
VS augmentée						X
Augmentation GB dans le liquide synovial ou LE						X
%PNN synovial élevés						X
CRP synoviale augmentée						X
Alpha-défensine synoviale positive						X

GB : Globules blancs PNN : Polynucléaires neutrophiles

CRP : Protéine C réactive VS : vitesse de sédimentation LE : leucocyte estérase

Tableau 5 : [Score proposé par Parvizi *et al.* des critères mineurs à partir des critères modifiés MSIS]

Diagnostic préopératoire		Score	Décision
Sérum	CRP ou D-Dimères augmenté(s)	2	≥ 6 : infecté 2-5 : possiblement infecté 0-1 : non infecté
	VS augmentée	1	
Synovial	Leucocytes ou LE augmenté(es)	3	
	Alpha-défensine positive	3	
	%PNN augmenté	2	
	CRP augmentée	1	
Diagnostic peropératoire*		Score	
Histologie positive		3	≥ 6 : infecté 4-5 : peu concluant ≤ 3 : non infecté
Pus dans l'articulation ou au contact de la prothèse		3	
1 culture positive		2	

*Pour les patients dont les critères préopératoires ne sont pas concluants

CRP : Protéine C réactive VS : vitesse de sédimentation LE : leucocyte estérase PNN : polynucléaires neutrophiles

Les sociétés savantes n'ont pas défini de critères concernant le diagnostic des ostéites. Celui-ci s'appuie sur les différents éléments cliniques, radiologiques et biologiques précédemment cités.

I.5. Diagnostic microbiologique

I.5.1. Prélèvements

Les prélèvements doivent être réalisés après une fenêtre thérapeutique de minimum 15 jours (23)(28)(40).

I.5.1.1. Prélèvements préopératoires

Une ponction de liquide articulaire, éventuellement radioguidée peut être effectuée dans des conditions d'asepsie chirurgicale. Des flacons d'hémocultures aérobie et anaérobie peuvent être ensemencés avec le liquide ponctionné afin d'en augmenter la sensibilité ou lorsque le délai d'acheminement au laboratoire est long. Pour prévenir la coagulation, une partie du liquide prélevé peut être mis dans un tube hépariné ou citraté (40). En absence d'épanchement liquidien, une biopsie au true-cut peut être réalisée (23)(40). Il n'est pas préconisé

d'écouvillonner une cicatrice même désunie ou un orifice d'une fistule exposant au risque de contamination par la flore cutanée (23)(40).

I.5.1.2. Prélèvements peropératoires

Il est recommandé de réaliser plusieurs prélèvements peropératoires à des sites anatomiques différents macroscopiquement pathologiques. Leur nombre varie selon les sociétés savantes (Tableau 6). En effet, un faible nombre de prélèvements diminue la sensibilité diagnostique et un grand nombre de prélèvements expose au risque de contaminants. Les prélèvements peuvent être liquides (pus, liquide de ponction) ou solide (tissu osseux, tissu de granulation, tissu d'interposition, ou autre tissu suspect) (23). Dans les infections sur matériel, la mise en culture de la prothèse, des vis, des tiges ou du ciment présenterait une meilleure sensibilité que la culture du tissu périprothétique (41).

Tableau 6 : [Recommandations du nombre de prélèvements peropératoires dans les IOA sur matériel]

	SPILF (23)	IDSA (20)	MSIS (39)
Nombre de prélèvements peropératoires	5	3 à 6	3 à 5

I.5.1.3. Autres prélèvements

La réalisation d'hémocultures périphériques est indiquée, dans le diagnostic des IOA sur prothèse, même en l'absence de signes généraux d'infection (28). Elles sont essentielles dans le diagnostic de l'ostéomyélite, en particulier chez l'enfant. Dans ce cas, en raison de l'atteinte le plus souvent hématogène, une bactériémie est presque toujours associée à l'atteinte osseuse (22)(29).

Des prélèvements divers peuvent être envoyés au laboratoire afin de rechercher d'éventuels foyers primitifs (valvulaires, digestifs, dentaires, ORL, urogénitaux, cutanés) (40).

I.5.2. Transport

Les prélèvements doivent être placés dans des contenants stériles et parvenir au laboratoire, à température ambiante, dans les 2 heures. Des milieux de transports peuvent être utilisés pour permettre la survie des bactéries fragiles notamment des anaérobies (40).

I.5.3. Ensemencement

Les prélèvements sont techniqués sous un poste de sécurité microbiologique de type II (PSM II), avec des gants et du matériel à usage unique. Le Référentiel en microbiologie Médicale

(Rémic) recommande de vortexer et broyer les prélèvements solides grâce à flacons contenant des billes (Figure 6)(40). Ce broyage mécanique permet la libération efficace des bactéries enchâssées dans le biofilm (17).



Figure 6 : Broyeur-homogénéiseur Ultra-Turrax (A) et flacon comportant des billes mécaniques (B)

Source : Bactériologie médicale (8)

La sonication peut être utilisée pour la culture à partir du matériel d'ostéosynthèse (40). Les ultrasons permettent de libérer les bactéries présentes dans le biofilm sans en altérer leur viabilité (41). Selon l'étude de Portillo *et al.*, la sonication réduirait de 39% à 19% le nombre d'infections sur prothèse à culture négative (27). La culture du liquide de sonication permettrait un diagnostic plus rapide de l'infection sur matériel que celle des tissus périprothétiques (27). En effet, les bactéries incluses dans le biofilm à la surface de l'implant seraient détachées grâce à la sonication de manière plus efficace que le broyage (Figure 7)(42). De façon similaire, d'après Trampuz *et al.*, les cultures de liquide soniqué présenteraient une sensibilité supérieure (78,5%) à celle des tissus périprothétiques (60,8%) et du liquide synovial (56,3%) ; avec des spécificités comparables comprises entre 98,1 et 99,2% (41).

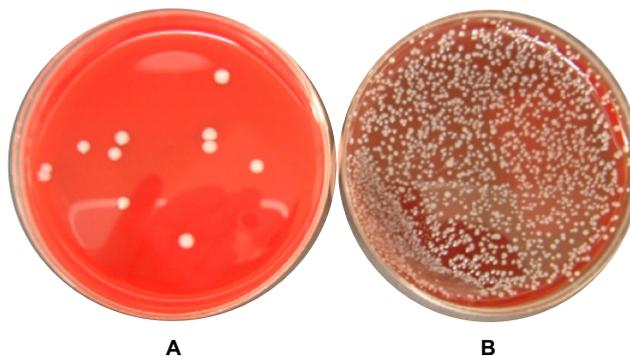


Figure 7 : Culture de matériel avant (A) et après sonication (B)

Source : Infections associées aux implants orthopédiques de Carsenti-Dellamonica (42)

I.5.4. Examen direct

L'examen direct comporte une coloration de Gram permettant de détecter les microorganismes présents, et de quantifier, de manière semi-quantitative, les polynucléaires neutrophiles. Cet examen présente une faible sensibilité de 6%, mais une grande spécificité de 99% (40).

La numération des leucocytes dans le liquide articulaire permet de distinguer une arthrite mécanique, d'une arthrite inflammatoire ou septique. Dans l'arthrite septique, le nombre de leucocytes est généralement supérieur à 10 000/mm³ voire 50 000/mm³ avec plus de 90% de polynucléaires neutrophiles (40)(43) (Tableau 7). La recherche des cristaux permet de mettre en évidence les arthrites microcristallines (goutte, chondrocalcinose). La présence de bactéries à la coloration de Gram et une formule leucocytaire avec une majorité de polynucléaires neutrophiles sont des arguments en faveur d'une arthrite septique.

D'après Trampuz *et al.*, dans les IOA sur prothèse, le nombre de leucocytes est généralement supérieur à 1700/mm³ avec plus de 65% de polynucléaires neutrophiles (2). En effet, ces seuils sont nettement inférieurs en présence de matériel probablement en lien avec la plus faible virulence des microorganismes en cause, et la présence du biofilm (2) (Tableau 7). Selon Ghanem *et al.*, le seuil de leucocytes pourrait être abaissé à 1100/mm³ (90,7% de sensibilité et 88,1% de spécificité) avec plus de 64% de polynucléaires neutrophiles (95% de sensibilité et 94,7% de spécificité) (44). D'autres seuils ont été définis par Parvizi *et al.* pour la cytologie du liquide synovial dans les IOA prothétiques en fonction de la chronicité de l'atteinte (35)(Tableau 7).

Tableau 7 : [Critères cytologiques des liquides articulaires]

	Arthrite septique native (40)	Infection sur prothèse (2)(35)
Numération leucocytaire	> 10 000/mm ³	> 1 700/mm ³ (Se 94% Sp 88%) <u>MSIS modifiés</u> > 3 000/mm ³ (chronique >90j) > 10 000/mm ³ (aigue <90j)
%Polynucléaires neutrophiles	> 90 %	> 65 % (Se 97% Sp 98%) <u>MSIS modifiés</u> > 80 % (chronique >90j) > 90 % (aigue <90j)

I.5.5. Culture

Le Rémic recommande l'ensemencement des prélèvements préopératoires et peropératoires sur des milieux gélosés riches afin de permettre la croissance des bactéries exigeantes et des milieux liquides pour les bactéries à croissance lente ou présentes en faible quantité (40). Les cultures doivent être conservées pendant une durée de 14 jours minimum. En effet, l'incubation prolongée des cultures favorise la mise en évidence des germes de croissance ralentie et anaérobies. Selon l'étude de Portillo *et al.*, la culture du liquide de sonication permet d'augmenter la sensibilité à 77%, après une semaine d'incubation, et à 81% après deux semaines d'incubation (27). Selon le Rémic, il est recommandé de mettre en culture les prélèvements sur une gélose au sang sous CO₂ en aérobiose, une gélose chocolat sous CO₂, une gélose au sang en anaérobiose et un bouillon de type schaedler ou coeur-cervelle. Il est préconisé de repiquer les milieux liquides après 7 jours d'incubation minimum pour permettre la pousse des bactéries à croissance lente (45). Les flacons d'hémoculture éventuellement ensemencés nécessitent, selon le Rémic, une incubation prolongée de 14 jours (40).

Dans les infections sur prothèse, les travaux de Zimmerli *et al.* montrent une sensibilité des cultures comprise entre 65 et 94 %, celle-ci augmentant avec le nombre de prélèvements (15). Trampuz *et al.* démontrent aussi une amélioration de la sensibilité de la culture des tissus périprothétiques de 50% à 72,7% lorsque respectivement deux et au moins 5 échantillons sont mis en culture (41).

- Lecture des cultures

La Société française de microbiologie (SFM) recommande la lecture des cultures en milieux gélosés précocement à J1, J2 puis entre J5 et J10, ainsi que l'observation régulière des bouillons d'enrichissement jusqu'à J14 (40). La présence d'une bactérie se traduit alors par un trouble du milieu liquide. Les cultures prolongées en milieu liquide présentent un intérêt pour l'identification des bactéries à croissance lente, en particulier pour les anaérobies tels que *C. acnes*, et pour les prélèvements polymicrobiens. La SFM préconise la réalisation d'une identification et un antibiogramme sur chaque colonie ayant des aspects différents en culture (40). En effet, les sous-populations de colonies « *small colony variant* » appartenant à la même espèce bactérienne, mais ne présentent pas forcément le même profil de résistance aux antibiotiques (Figure 8).

Pour les souches de staphylocoques isolées, il est recommandé de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des glycopeptides, ainsi que de rechercher la présence du gène *mecA* ou l'expression de la PLP2a (40). En cas d'utilisation thérapeutique des bêta-lactamines, de la rifampicine ou de la lévofloxacine il est recommandé pour les souches de streptocoques de tester leur sensibilité par la méthode de détermination des CMI

(23)(40). La recherche du mécanisme de résistance aux macrolides est recherchée pour une utilisation thérapeutique de la clindamycine. En effet, les souches exprimant le mécanisme de résistance MLSb (Macrolide-Lincosamide-Streptogramine b) inducible exposent à un risque de sélection de mutants constitutifs résistants (46).

Toute souche isolée d'un prélèvement d'origine ostéo-articulaire doit être conservées à -20 ou -80°C pendant une durée minimale de 3 ans (40).

- Interprétation

L'interprétation est complexe et multidisciplinaire puisqu'elle dépend du contexte clinique, de la cytologie, des espèces identifiées, de la nature et du nombre de prélèvements positifs.

Dans le cas d'une infection aiguë de l'os, l'examen direct est le plus souvent positif à la coloration de Gram. Le diagnostic microbiologique est rapidement établi avec des cultures monomorphes positives en 24 à 48h.

Les IOA chroniques, en particulier sur prothèse sont diagnostiquées plus tardivement en raison de la faible quantité de germes présents. L'examen direct est rarement positif, les cultures se positivent après une longue période d'incubation, parfois seulement en milieu liquide. Le caractère atypique des colonies rend l'interprétation difficile en particulier la présence de microcolonies de croissance ralentie ainsi que le caractère polymorphique (perte de pigmentation, perte de l'hémolyse) d'une même espèce avec des antibiogrammes différents, mais présentant le même génotype après analyse en champs pulsé (Figure 8) (8)(40).

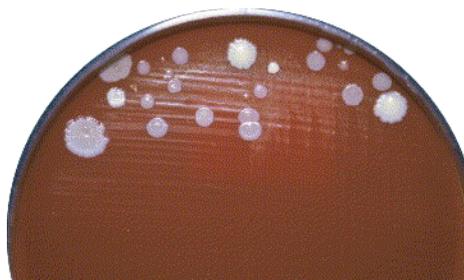


Figure 8 : *Small colony variants* d'un staphylocoque à coagulase négative

Source : Bactériologie des infections ostéo-articulaires chez l'adulte, Desplaces (45)

Dans les IOA prothétiques, le nombre de prélèvements positifs et le caractère pathogène de l'espèce identifiée permettent de différencier une infection d'une contamination (Tableau 4).

Une culture négative n'exclut pas une infection et peut être la conséquence d'une infection décapitée, d'une infection à bas bruit ou de la présence de germes à croissance difficile (40).

I.6. Examen anatomopathologique

L'examen anatomopathologique des tissus périopératoires (biopsies osseuses, tissus périprothétiques) présente d'excellentes sensibilité (>80%) et spécificité (>90%) (15). La quantification des polynucléaires neutrophiles des tissus osseux et de la synoviale constitue un des éléments diagnostiques de l'infection sur prothèse (20)(23)(39). L'analyse anatomopathologique permet de plus d'orienter le diagnostic vers une infection fongique ou à mycobactéries.

I.7. Biologie moléculaire

L'utilisation de la biologie moléculaire peut, dans certains cas, apporter une information supplémentaire par rapport à la culture microbiologique dans le diagnostic des IOA. Elle présente comme avantage la mise en évidence du pathogène chez des patients suspects d'infection, préalablement exposés à un traitement antibiotique, ou dont les prélèvements sont stériles en culture.

I.7.1. PCR universelle

La PCR de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S peut être utilisée pour le diagnostic des IOA. En effet, ce gène code pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal qui est commun à toutes les bactéries. Le séquençage du gène amplifié et la comparaison de la séquence à une banque de données permettent l'identification du germe.

Différents auteurs ont comparé les résultats de la culture du liquide synovial à la biologie moléculaire. Selon Fihman *et al.*, la sensibilité de la PCR est nettement inférieure à celle de la culture dans les infections sur prothèse (53,8%) par rapport aux IOA sans matériel (88,2%) (47). Les bactéries piégées dans le biofilm pourraient être à l'origine d'une mauvaise détection en PCR et en culture. Une autre hypothèse à l'origine de la mauvaise sensibilité des techniques moléculaires serait le volume de l'échantillon utilisé, nettement inférieur à celui mis en culture (48). Les résultats de Bémer *et al.* montrent une excellente spécificité (95,5%) avec une sensibilité médiocre (73,3%), en particulier pour la détection du *C. acnes* souvent en cause dans les infections prothétiques (49).

De plus, dans les infections polymicrobiennes l'alignement des séquences ne permet pas l'identification correcte des germes. Ces résultats ne sont pas en faveur d'une utilisation en routine, de cette technique lourde, nécessitant plusieurs jours de manipulations, pour le diagnostic des infections des os et des articulations.

La PCR universelle présente plusieurs limites telles que la nécessité d'une étape supplémentaire de séquençage pour l'identification du germe ainsi que des difficultés

d'interprétation dans les infections polymicrobiennes. De plus, elle génère des faux positifs liés à l'ubiquité de l'ADN bactérien (3).

I.7.2. PCR spécifique

Le manque de sensibilité de la PCR universelle dans le diagnostic des IOA, a conduit à la mise au point de techniques spécifiques d'espèces. *S. aureus* étant le principal germe en cause, des PCR « maison » ou des kits commercialisés ont été utilisés pour permettre sa détection.

Le test Xpert® MRSA/SA, mis au point par Cepheid, comporte la détection du *S. aureus* grâce à des amorces spécifiques du gène *spa* codant pour la protéine A staphylococcique, de la méticillino-résistance par amplification du gène *mecA* et de la cassette chromosomique *SSCmec*. Ce test a fait l'objet de plusieurs études sur divers prélèvements peropératoires (liquide synovial, biopsies osseuses et tissus périprothétiques) dans le diagnostic des IOA. Les sensibilités (87,1 à 100%) et spécificités (95,3 à 100%) observées étaient nettement supérieures à celle de la PCR 16S (50)(51)(52) (Tableau 8). Dans ces études, plusieurs échantillons présentaient des résultats positifs en biologie moléculaire, alors que les cultures étaient négatives. D'après les auteurs, ces résultats discordants pouvaient provenir de la contamination de l'échantillon au moment de la manipulation, amenant à des faux positifs, ou de la présence de bactéries non viables laissant suggérer que les techniques de PCR spécifiques étaient plus sensibles que la culture standard (50)(51). Concernant la détection de la méticillino-résistance, le test Xpert® MRSA/SA présentait une excellente sensibilité (94,4 à 100%) et spécificité (98,3 à 100%) (50)(51)(52).

Tableau 8 : [Performances analytiques du test Xpert®MRSA/SA dans le diagnostic des IOA]

	Etude	Nombre d'échantillons/ patients	<i>S. aureus</i>		SASM		SARM	
			Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp
Dubouix <i>et al.</i> (50)	Prospective	135 échantillons 105 patients	100%	100%	100%	98,3%	100	100
Valour <i>et al.</i> (51)	Rétrospective	91 échantillons 76 patients	94,4%	100%	94,4%	100%	100%	100%
Titécat <i>et al.</i> (52)	Prospective	104 échantillons 30 patients	87,1%	100%	-	-	-	-

Se : sensibilité Sp : spécificité

SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

Dans le cadre de l'ostéomyélite de l'enfant, des PCR spécifiques *K. kingae* ont été mises au point (53). En effet, il s'agit de la première bactérie responsable des atteintes ostéo-articulaires de l'enfant de moins de 4 ans (54). Ce pathogène exigeant, nécessite le plus souvent, l'utilisation des techniques de biologie moléculaire pour sa mise en évidence (22)(29). En effet, l'étude rétrospective de Yagupski *et al.* révèle 99,6% des échantillons positifs en PCR pour *K. kingae* contre seulement 18,7% en culture (55).

I.7.3. PCR multiplexe

I.7.3.1. PCR multiplexe « maison »

Cazanave *et al.* ont développé une PCR "maison" capable de détecter les 10 principaux germes en cause dans les IOA prothétiques. Cette technique de PCR en temps réel, spécifique de genre ou d'espèce, permet une détection rapide des infections polymicrobiennes. Elle présente aussi comme intérêt, par rapport à la PCR 16S, la diminution du taux de faux positifs liés à la contamination des échantillons et des réactifs.

Les résultats de Cazanave *et al.* mettent aussi en évidence une meilleure sensibilité de la PCR sur le liquide de sonication, par rapport à la culture microbiologique (56)(Tableau 9). Cette technique de PCR « maison » a également été utilisée par deux autres équipes, afin de comparer la sensibilité de la PCR, par rapport à la culture, sur le liquide synovial et le tissu périprothétique. Les sensibilités observées sont nettement inférieures à la culture concernant le liquide synovial (55,6%) et le tissu périprothétique (15,6%)(3)(57)(Tableau 9). En effet, Melendez *et al.*, ont émis plusieurs hypothèses concernant les faibles performances de la PCR sur le liquide synovial (3). Dans cette étude rétrospective, le stockage prolongé ainsi que les cycles de congélation/décongélation des échantillons, ont pu entraîner une dégradation de l'ADN. La discordance des résultats pourrait aussi provenir d'une mauvaise lyse de la paroi bactérienne, notamment des cocci Gram positifs, les plus fréquemment responsables des IOA (3). De plus, le tissu périprothétique ne semble pas être l'échantillon idéal, probablement en lien avec la physiopathologie de l'infection sur prothèse (3)(57). En effet, les germes enchâssés dans le biofilm à la surface de l'implant, sont présents en faible quantité, et inégalement répartis dans le tissu environnant. Le faible volume utilisé en biologie moléculaire pourrait amener à une erreur d'échantillonnage responsable de résultats faussement négatifs (3).

Cette technique a pour inconvénient de ne pas permettre la détection des principaux gènes de résistances impliqués, notamment ceux responsables de la résistance à la méticilline des staphylocoques.

Tableau 9 : [Performances analytiques de la PCR multiplexe « maison » de Cazanave *et al.*]

	Cazanave <i>et al.</i> (56)		Melendez <i>et al.</i> (3)		Ryu <i>et al.</i> (57)	
	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp
Culture liquide synovial	66,3%	96,9%	76,1%	97,4%	72,1%	96,4%
PCR liquide synovial			55,6%	91,8%		
Culture liquide sonication	72,9%	98,3%	82,1%	98,6%	76,7%	100%
PCR liquide sonication	77,1%	97,9%			78,3%	100%
Culture tissu périprothétique	82,6%* 70,1%**	84,5%* 97,9%**	81,9%*	88,2%*	69,8%**	100%**
PCR tissu périprothétique					15,6%	96,8%

* toute culture tissulaire positive

** ≥ 2 cultures tissulaires positives

Se : sensibilité Sp : spécificité

I.7.3.2. PCR multiplexes commercialisées

Plusieurs sociétés ont commercialisé différents kits pour la détection, par PCR multiplexe, des principaux pathogènes responsables des IOA, associée à la mise en évidence de certains gènes de résistance.

- FilmArray® BJI (Bone and Joint Infection) - Biofire

Le test FilmArray® BJI est un système automatisé fermé qui met en évidence certaines bactéries impliquées dans les IOA, les levures du genre *Candida* et quelques gènes de résistance (Figure 9). L'automate réalise une PCR "nichée" ou "nested PCR" qui se déroule en 2 étapes. La première PCR est une réaction multiplexe qui amplifie toutes les cibles du panel, puis la deuxième PCR amplifie chaque cible individuellement grâce à un couple d'amorces spécifiques. L'intérêt du test est sa rapidité, puisqu'il permet d'obtenir un résultat en 1h. Les premiers travaux de Monteix *et al.* démontrent des résultats comparables à ceux de la culture standard (58). Néanmoins, le panel ne permet pas l'identification des SCN, hormis *S. lugdunensis*, et du *C. acnes* fréquemment impliqués dans les IOA, en particulier sur matériel. Concernant la résistance aux antibiotiques, le panel ne permet pas de mettre en évidence la sensibilité à la clindamycine, souvent utilisée comme anti-staphylocoque. L'étude préliminaire de Monteix *et al.* souligne aussi le manque de sensibilité pour la détection des gènes *mecA/C*.

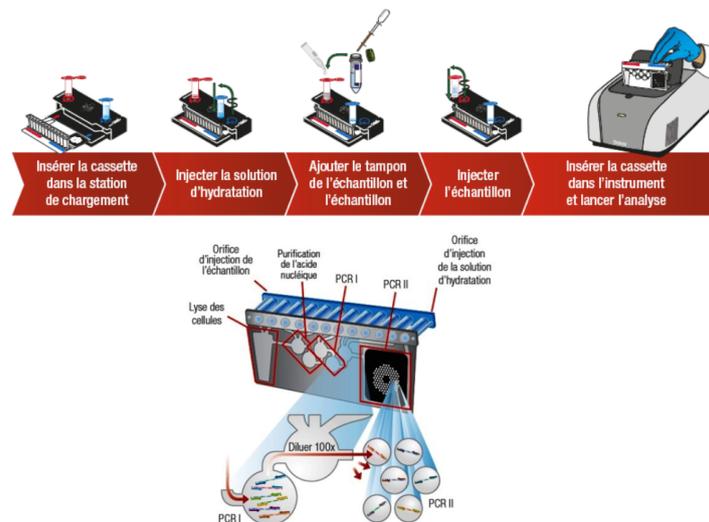


Figure 9 : Préparation et présentation de la cassette FilmArray

- Prove-it® Bone and Joint - Mobidiag

Le test Prove-it® Bone and Joint utilise la technique des puces à ADN. Il s'agit d'une PCR multiplexe à large spectre, combinée à une hybridation sur sonde, ciblant plus de 60 espèces bactériennes. Ce test présente de très bonne sensibilité (82%) et spécificité (74%) dans le diagnostic de l'infection sur prothèse, en particulier chez les patients ayant reçu une antibiothérapie dans les jours précédents le prélèvement (59). En effet, la sensibilité diagnostique serait supérieure à celle de la culture chez les patients sous antibiothérapie (59). Cependant, le panel ne permet pas la détection du *C. acnes*, fréquemment en cause dans les IOA prothétiques. Par contre, une adaptation thérapeutique rapide est possible par la mise en évidence du caractère résistant à la méticilline des staphylocoques, grâce à la détection du gène *mecA*. Néanmoins, le gène *mecC* n'ayant pas été inclus dans le panel, de rares souches de staphylocoques résistantes aux bêta-lactamines pourraient ne pas être perçues.

- Unyvero® Implant & Tissue Infection (ITI) - Curetis

Présentation :

Le panel Unyvero ITI contient les réactifs nécessaires à la détection des principaux pathogènes impliqués dans les infections des implants et des tissus (Tableau 10). Cette cassette couvre les 85 principaux microorganismes en cause dans ces infections, dont des espèces anaérobies comme le *C. acnes*. De plus, le kit permet la mise en évidence de 17 gènes de résistances aux antibiotiques. Une paire d'amorces universelles est incluse dans la cassette, avec comme couverture, 75,2% des séquences cibles procaryotes selon le fournisseur.

Tableau 10 : [Panel de détection de la cassette Unyvero ITI]

GROUPE	PATHOGENE	RESISTANCE	MARQUEUR
BACTERIE UNIVERSELLE			
BACTERIE GRAM POSITIVE	<i>Staphylococcus aureus</i>	MACROLIDES/LINCOSAMIDES	<i>ermA</i>
	Staphylocoques à coagulase négative ¹		<i>ermC</i>
	<i>Streptococcus spp.</i> ²	OXACILLINE/METHICILLINE	<i>mecA</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		<i>mecC</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	GLYCOPEPTIDES	<i>vanA</i>
	<i>Streptococcus pyogenes/dysgalactiae</i>		<i>vanB</i>
	<i>Granulicatella adjacens</i>	AMINOGLYCOSIDES	<i>aac(6'')/aph(2'')</i>
	<i>Abiotrophia defectiva</i>		<i>aacA4</i>
	<i>Enterococcus spp.</i> ³	CEPHALOSPORINES 3RD GENERATION	<i>ctx-M</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>			
CORYNEBACTERIE	<i>Corynebacterium spp.</i> ⁴	CARBAPENEMES	<i>imp</i>
ENTEROBACTERIE	<i>Escherichia coli</i>		<i>kpc</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex ⁵		<i>ndm</i>
	<i>Enterobacter aerogenes</i>		<i>oxa-23</i>
	<i>Proteus spp.</i> ⁶		<i>oxa-24/40</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>oxa-48</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>		<i>oxa-58</i>
	<i>Klebsiella variicola</i>		<i>vim</i>
	<i>Citrobacter freundii/koseri</i>		
BACTERIA NON FERMENTANT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	<i>Acinetobacter baumannii</i> complexe ⁷		
ANAEROBIES	<i>Cutibacterium acnes</i>		
	<i>Fingoldia magna</i>		
	<i>Bacteroides fragilis</i> groupe ⁸		
CHAMPIGNONS	<i>Candida spp.</i>		
	<i>Candida albicans</i>		
	<i>Candida tropicalis</i>		
	<i>Candida glabrata</i>		
	<i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>C. krusei</i>)		

¹ Incluant *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*

² Incluant *S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. sanguinis*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. gordonii*

³ Incluant *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. raffinosus*

⁴ Incluant *C. jeikeium*, *C. belfanti*, *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. aurimucosum*

⁵ Incluant *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*

⁶ Incluant *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. penneri*, *P. hauseri*

⁷ Incluant *A. baumannii*, *A. oleivorans*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii*

⁸ Incluant *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. uniformis*

L'automate Unyvero est composé de 3 modules : l'Unyvero Lysator permettant la lyse de l'échantillon, l'Unyvero Analyzer, où se déroule les étapes de purification, d'amplification et de détection de l'ADN, et l'Unyvero Cockpit qui est un écran permettant la visualisation des résultats (Figure 10). Il permet l'obtention rapide d'un résultat, en 4 à 5 heures, avec seulement 5 minutes de manipulation.



Figure 10 : Présentation des modules de l'automate Unyvero

Protocole :

L'échantillon est transféré dans l'Unyvero Sample Tube contenant les réactifs nécessaires à la lyse. Celle-ci dure 30 minutes et fait intervenir plusieurs mécanismes :

- une lyse mécanique grâce aux billes de verre
- une lyse chimique par le tampon spécifique
- une lyse enzymatique faite par la protéinase K
- et une lyse thermique liée aux modifications de la température.

L'Unyvero Sample Tube et l'Unyvero Master Mix Tube sont alors transférés dans la cassette de réaction contenant tous les réactifs nécessaires à l'extraction, la purification et l'amplification de l'ADN (amorces marquées par fluorescence, tampon d'hybridation, tampon de lavage et oligonucléotides) (Figure 11).



Figure 11 : Cassette Unyvero ITI

L'analyse moléculaire se fait en trois étapes dont la première repose sur l'extraction de l'ADN de l'échantillon, grâce à une colonne de silice. Puis l'extrait est amplifié par une réaction de PCR multiplexe en point final. La cassette est constituée de 8 chambres indépendantes dans lesquelles se produit l'amplification et l'hybridation de l'ADN (Figure 13). Chaque chambre contient une matrice sur laquelle sont fixées les sondes complémentaires des séquences recherchées. La détection de l'ADN se fait au moment de la phase d'hybridation des amplicons sur la matrice, par mesure optique de la fluorescence. Un contrôle interne, correspondant à un gène de synthèse sans homologie significative avec les séquences connues, est inclus dans la cassette. Ce contrôle interne est amplifié dans chaque chambre de PCR et hybridé sur chaque matrice.

Cet automate est un système fermé dans lequel toutes les étapes, exceptée la lyse de l'échantillon, sont réalisées à l'intérieur de la cassette permettant de limiter le risque de contamination (Figure 12).



Figure 12 : Représentation des différentes étapes de la préparation de l'échantillon à la visualisation des résultats



Figure 13 : Chambres indépendantes de PCR (intérieur de la cassette de réaction)

Performances du test

- Données du fournisseur

Le seuil de détection évalué par le fournisseur varie en fonction des pathogènes allant de 10^4 à 10^8 UFC/mL. En fonction du germe isolé, la sensibilité a été évaluée entre 50 et 100% et la spécificité entre 91,7 et 100%. La PCR universelle de l'automate présente une sensibilité et une spécificité respectivement évaluées à 79,9% et 92,5%.

L'étude de la résistance aux antibiotiques n'a été faite que sur 30 souches de *S. aureus* concernant le gène *mecA*. La sensibilité est excellente (100%) et la spécificité de 86% en raison de la présence de 3 faux positifs en PCR *mecA*.

- Données de la littérature

Les tests Unyvero ITI ont été utilisés par différentes équipes qui témoignent d'une excellente spécificité (94 à 100%) et d'une sensibilité variable (34,2 à 81,6%)(60)(61)(62)(63)(64)(65) (Tableau 11). Cette grande spécificité traduit le faible nombre de faux positifs habituellement retrouvés en biologie moléculaire. Les sensibilités varient en fonction de la nature de l'échantillon utilisé, du prétraitement éventuel par la sonication, ainsi que de la version du test utilisé. En effet, la deuxième version du kit avait pour but d'élargir le panel de germes détectés ainsi que d'améliorer les performances analytiques. Les sensibilités observées étaient supérieures avec l'utilisation de la deuxième version de la cassette (73 et 81,6%)(63)(65).

Le pourcentage de concordance avec la culture standard été compris entre 58 et 82% en fonction des études (63)(66)(67)(68). Cependant, dans l'étude de Borde *et al.* exposant des résultats concordants avec la culture microbiologique dans 82% des cas, une grande partie des échantillons sélectionnés étaient négatifs en culture (66). Zannoli *et al.* ont mis en évidence des résultats similaires entre les deux techniques en utilisant une plus grande quantité de résultats positifs.

Les études dans la littérature avaient pour principales indications les infections de prothèse articulaire. Lafeuille *et al.* ont étendu l'utilisation du kit à l'ensemble des IOA et ont montré les meilleurs résultats en terme de sensibilité. Ceci peut être en lien avec la physiopathologie des IOA sur matériel : les modifications métaboliques des bactéries et la faible charge bactérienne nécessaire pour induire une infection de la prothèse. En effet, plusieurs équipes ont démontré l'importance de l'effet inoculum dans la détection de l'ADN bactérien (62)(67)(68).

Tableau 11 : [Résumé des performances analytiques de la cassette Unyvero ITI]

	Etude, application	Echantillons	Version test	Se/Sp	Concordance
Borde <i>et al.</i> (2015) (66)	Prospective Monocentrique IPJ	28 patients 79 échantillons (tissu périprothétique)	Version 1		82%
Hischebeth <i>et al.</i> (2016) (60)	Prospective Monocentrique IPJ	31 patients 3 – 5 échantillons/ patients (liquide articulaire, liquide sonication)	Version 1	Se 66,7% LA 55,6% LS 50% Sp 100%	
Prieto-Borja <i>et al.</i> (2017) (61)	Prospective Monocentrique IPJ	68 patients 88 échantillons (liquide sonication)	Version 1	Se 60,5% Sp 98%	
Lafeuille <i>et al.</i> (2017) (63)	Rétrospective Monocentrique Tout type IOA	40 patients 40 échantillons	Version 2	Se 81,6% Sp 98,7%	62%
Villa <i>et al.</i> (2017) (62)	Prospective Monocentrique IPJ	47 patients 53 échantillons (liquide synovial, implants traités au DDT, tissu périprothétique)	Version 1	Se 34,2%	
Renz <i>et al.</i> (2017) (64)	Prospective Monocentrique IPJ	111 patients (liquide sonication)	Version 1	Se 51%* Se 53%** Sp 94%	
Malandain <i>et al.</i> (2018) (67)	Rétrospective Multicentrique IPJ	239 patients 450 échantillons (os, tissu périprothétique, liquide synovial)	Version 1 et 2		58%
Zannoli <i>et al.</i> (2019) (68)	Rétrospective Monocentrique IPJ	45 patients 45 échantillons (implants soniqués ou traités au DDT)	Version 2		79%
Aamot <i>et al.</i> (2019) (65)	Prospective Monocentrique IPJ	15 patients 72 échantillons (tissu périprothétique)	Version 2	Se 73%	

*performances cliniques (tout pathogène détecté) ** performances analytiques (pathogène inclus dans le panel)

DDT : dithiothreitol Se : sensibilité Sp : spécificité

LA : liquide articulaire LS : liquide de sonication IPJ : Infection articulaire prothétique

I.8. Traitement

L'objectif principal du traitement des infections ostéo-articulaires est d'éradiquer les microorganismes responsables de l'infection, ainsi que de restaurer la fonction articulaire lorsqu'une prothèse est mise en place.

I.8.1. Traitement chirurgical

- Ostéite

La chirurgie est employée dans l'ostéite de l'adulte lorsque les tissus sont bien vascularisés. Elle consiste en l'excision complète de la zone infectée, le comblement de la cavité de résection et la couverture cutanée (23). Elle peut aussi faire intervenir une phase de reconstruction, appelée ostéosynthèse, lorsque la structure osseuse est fragilisée (23). Si le membre infecté ne peut être conservé, l'amputation est indiquée en particulier chez le diabétique souffrant de microangiopathies sévères (12). Dans les cas d'ostéites avec présence de matériel, celui-ci est conservé si l'infection est mineure. Le retrait du matériel est recommandé dans les infections majeures avec un écoulement purulent associé à une ostéolyse (23).

Chez l'enfant, le traitement nécessite rarement une intervention chirurgicale Elle peut être utile pour drainer un abcès, en cas de choc septique secondaire à une infection disséminée à *S. aureus* porteur de la toxine de Panton-Valentine, ou si l'évolution clinique est défavorable sous antibiothérapie (29)(31)(69).

- IOA sur prothèse

Dans les infections sur prothèse, le traitement chirurgical est le plus souvent indiqué, excepté chez les patients très fragiles ou âgés.

La conservation du matériel est envisagée dans les infections hématogènes dans les 3 premières semaines après le début des symptômes, ou dans les infections post-opératoires précoces. Le traitement consiste en une arthrotomie avec synovectomie et un lavage de l'articulation. L'excision de la zone infectée doit être large, jusqu'au tissu sain vascularisé (14)(23)(28)(29)(70). L'éradication de l'infection dépend de la précocité de la prise en charge. En effet, le taux de réussite varie entre 46 et 85% selon les études (71)(72).

Dans les infections chroniques, l'ablation de l'implant suivi d'une reconstruction est préconisée. Le changement de la prothèse peut être pratiqué en une ou deux étapes. Le remplacement du matériel en un temps, c'est-à-dire l'ablation de la prothèse infectée puis la mise en place du nouvel implant, permet une meilleure récupération fonctionnelle. Le changement en deux temps est envisagé lorsque les patients sont opérés à de multiples reprises, lorsqu'une reconstruction osseuse est nécessaire, si le diagnostic bactériologique est

inconnu ou si le germe ou le profil de sensibilité est complexe. Cette prise en charge en deux étapes implique la dépose de la prothèse, la réalisation de prélèvements peropératoires, la mise en place d'une antibiothérapie probabiliste secondairement adaptée à la culture, et la réimplantation du nouveau matériel après un délai variable de quelques semaines à quelques mois. Un ciment imprégné d'antibiotique, appelé entretoise ou espaceur, permettant une diffusion locale au niveau de la zone infectée, peut être placé entre le temps de dépose et de repose de la prothèse (14)(23)(14)(13)(12)(11)(70). Dans certains cas où la réimplantation du nouveau matériel n'est pas envisageable, la résection des tissus infectés avec l'ablation définitive de la prothèse est employée. En dernier recours, l'amputation est réservée aux patients ayant échoués aux autres options de traitement (23)(70).

I.8.2. Traitement médical

Une antibiothérapie est toujours mise en place dans les IOA afin de contrôler l'infection. L'efficacité du traitement est dépendante du microorganisme et de son profil de sensibilité, du geste chirurgical avec une excision complète des tissus infectés et de l'état immunitaire et local du patient.

Le choix de l'antibiotique doit tenir compte de sa diffusion osseuse. La rifampicine, les fluoroquinolones, l'acide fusidique, la clindamycine et la fosfomycine sont des molécules caractérisées par une bonne pénétration dans l'os (4)(73)(74). Bien que les tétracyclines bénéficient d'une diffusion osseuse satisfaisante, elles sont rarement utilisées en raison de leur inactivation par l'hydroxyapatite présente dans la structure osseuse (74). Les bêta-lactamines, le cotrimoxazole, les glycopeptides et les aminosides offrent une plus faible pénétration dans l'os (4)(73)(74). Dans une même famille d'antibiotique, les concentrations osseuses varient en fonction des molécules. En effet, les concentrations osseuses de la céfazoline sont supérieures à celle de l'oxacilline. Le linézolide et la daptomycine, utilisés hors AMM dans les infections à *Staphylococcus spp.* résistants aux bêta-lactamines présentent des bonnes concentrations osseuses (23)(73).

Une association d'antibiotiques, si possible bactéricides, par voie intraveineuse est recommandée en traitement initial (23). Un relai par voie orale peut être secondairement envisagé si l'antibiotique possède une bonne biodisponibilité et diffusion osseuse. Le traitement *per os* dépend aussi de l'observance du patient et de sa tolérance digestive.

La durée totale de traitement varie en fonction de l'atteinte. Dans les IOA sur matériel, la durée de l'antibiothérapie recommandée est de 6 à 12 semaines selon la SPILF, 12 semaines pour les staphylocoques et 4 à 6 semaines pour les autres pathogènes selon l'IDSA (23)(70). Dans les ostéites chroniques de l'adulte post-chirurgicales ou post-traumatiques et dans

l'ostéomyélite de l'enfant, il n'existe pas de consensus définissant la durée du traitement qui dure généralement plusieurs semaines (21)(29)(69).

- Ostéomyélite

Chez l'enfant, il n'existe pas de recommandations thérapeutiques concernant l'ostéomyélite. Les molécules utilisées dans le traitement anti-staphylococcique sont généralement l'oxacilline, la céfazoline, le céfamandole, l'amoxicilline-acide-clavulanique, les céphalosporines de troisième génération, la fosfomycine, la clindamycine ou la vancomycine chez les espèces résistantes aux bêta-lactamines. En cas de choc septique avec une souche exprimant la toxine PVL, une association vancomycine-clindamycine est recommandée. Le céfamandole ou l'amoxicilline sont indiqués dans les infections à *K. kingae*. L'amoxicilline reste la molécule de choix dans les infections documentées à streptocoque bêta-hémolytique ou à pneumocoque (21)(29)(31)(69).

- Ostéite chronique de l'adulte et IOA sur matériel

La mise en place d'une antibiothérapie probabiliste est recommandée avant l'obtention des résultats bactériologiques (Tableau 12) (23)(28).

Tableau 12 : [Recommandations antibiothérapie probabiliste des infections ostéo-articulaires sur matériel selon la SPILF et la HAS] (23)(28)

Traitement probabiliste (IV)
<u>Par ordre de préférence</u>
- Pipéracilline-Tazobactam + Vancomycine
- Cefotaxime/Ceftriaxone + Vancomycine
- Imipénème/Méropénème + Vancomycine
- Cefotaxime/Ceftriaxone + Fosfomycine

Après documentation microbiologique, le traitement mis en place pourra être adapté en fonction du germe et de son profil de résistance selon les recommandations (Tableau 13). L'étude menée par Zimmerli *et al.* est la première à avoir montré l'efficacité des quinolones en association à la rifampicine dans les IOA périprothétiques (75). En effet, la rifampicine et les fluoroquinolones ont une action antibiofilm (13)(72). Bien que le linézolide et la daptomycine n'aient pas l'AMM en France dans le traitement des IOA, ces antibiotiques sont utilisés et recommandés par les sociétés savantes américaines dans les infections à *Staphylococcus spp.* méticillino-résistants (23)(69)(70). La daptomycine a montré un taux de réussite élevée associée à la chirurgie dans l'éradication des staphylocoques résistants aux bêta-lactamines en alternative aux glycopeptides, en particulier chez les patients souffrant d'insuffisance rénale

chronique (76). Sa bonne diffusion osseuse permet d'obtenir des concentrations élevées au site de l'infection, et elle présente également l'avantage d'exercer une action sur le biofilm (77). Le linézolide présente comme intérêt une très bonne biodisponibilité par voie orale permettant un relai *per os* (78).

La HAS recommande de demander un avis auprès d'un centre spécialisé, tel que les centres de référence des IOA complexes (CRIOAC), pour les IOA présentant des microorganismes particuliers, des profils de résistance complexes, des infections polymicrobiennes ou fongiques (28). En effet, le réseau des CRIOAC est un dispositif national, regroupant 24 centres en France, qui vise à améliorer la prise en charge des IOA et notamment la gestion des IOA complexes (Figure 14).



Figure 14 : Réseau des CRIOAC en France

Dans certains cas, une antibiothérapie suppressive peut être mise en place chez des patients infectés inopérables, avec une prothèse non descellée, et dont la documentation bactérienne est connue. Elle consiste à maintenir un traitement antibiotique par voie orale pendant une durée indéterminée, afin d'inhiber la prolifération bactérienne autour de la prothèse (23).

Tableau 13 : [Recommandations de traitements des IOA après documentation bactériologique] (23)(70)

	SPILF	IDSA
Staphylococcus méticillinosensibles	<p style="text-align: center;">IV</p> <p>Oxacilline/Cloxacilline/Céfazoline +Gentamicine/Rifampicine</p> <p><u>Allergie pénicilline :</u></p> <p>Clindamycine*/Vancomycine/Téicoplanine + Gentamicine/Rifampicine Vancomycine/Téicoplanine + Acide fusidique</p> <p style="text-align: center;">Relai VO</p> <p>Rifampicine + Ofloxacine/Péfloxacine/Ciprofloxacine/Lévofloxacine** Rifampicine + Acide fusidique Rifampicine + Clindamycine* Ofloxacine/Péfloxacine/Ciprofloxacine/Lévofloxacine** + Acide fusidique Clindamycine* + Acide fusidique Rifampicine + Cotrimoxazole</p>	<p style="text-align: center;">Traitement initial</p> <p>Nafcilline sodique*** IV /Céfazoline IV /Ceftriaxone IV + Rifampicine VO</p> <p><u>Alternative :</u></p> <p>Vancomycine IV /Daptomycine IV /Linézolide IV/VO + Rifampicine VO</p> <p style="text-align: center;">Relai VO</p> <p>Rifampicine + Ciprofloxacine/Lévofloxacine Rifampicine + Cotrimoxazole Rifampicine + Minocycline/Doxycycline Rifampicine + C1G (céfalexine)/Pénicilline anti-staphylocoque</p>
Staphylococcus méticillinorésistants	<p style="text-align: center;">IV</p> <p>Vancomycine/Téicoplanine + Rifampicine/Acide fusidique/Fosfomycine/Doxycycline Clindamycine* + Gentamicine puis Clindamycine* + Rifampicine</p> <p style="text-align: center;">Relai VO</p> <p>Rifampicine + Acide fusidique/Clindamycine*/Cotrimoxazole/Minocycline /Doxycycline/Linézolide**</p>	<p style="text-align: center;">Traitement initial</p> <p>Vancomycine IV + Rifampicine VO</p> <p><u>Alternative :</u> Linézolide IV/VO/Daptomycine IV + Rifampicine VO</p> <p style="text-align: center;">Relai VO</p> <p>Rifampicine + Ciprofloxacine/Lévofloxacine/Cotrimoxazole/Minocycline/Doxycycline/ C1G (céfalexine)/Pénicilline anti-staphylocoque</p>
Streptocoques	<p style="text-align: center;">IV</p> <p>Amoxicilline + Gentamicine <u>Allergie pénicilline :</u> Clindamycine*/Céfazoline/Ceftriaxone + Gentamicine</p> <p style="text-align: center;">Relai VO</p> <p>Amoxicilline/Clindamycine*</p>	<p><u>Streptocoques béta-hémolytiques :</u> Pénicilline G IV/Ceftriaxone IV</p> <p><u>Alternative :</u> Vancomycine IV</p>

	SPILF	IDSA
Entérocoques	<p style="text-align: center;">IV</p> <p>Amoxicilline + Gentamicine puis Amoxicilline +/- Rifampicine <u>Allergie pénicilline</u> : Vancomycine/Téicoplanine + Gentamicine puis Vancomycine/Téicoplanine +/- Rifampicine</p> <p style="text-align: center;">Relai VO</p> <p>Amoxicilline +/- Rifampicine</p>	<p style="text-align: center;"><u>Sensible à la pénicilline</u> :</p> <p>Pénicilline G IV/Ampicilline IV +/- Aminocyclitol IV <u>Alternative</u> : Vancomycine IV/Daptomycine IV/Linézolid IV/VO +/- Aminocyclitol IV</p> <p style="text-align: center;"><u>Résistant à la pénicilline</u> :</p> <p>Vancomycine IV +/- Aminocyclitol IV <u>Alternative</u> : Linézolid IV/VO/Daptomycine IV +/- Aminocyclitol IV</p>
Bacilles Gram négatifs	<p style="text-align: center;">IV</p> <p>Ceftriaxone/Céfotaxime + Ciprofloxacine/Ofloxacine/Gentamicine <u>Entérobactéries résistantes</u> : Imipénème/Méropénème** + Gentamicine</p> <p style="text-align: center;">Relai VO</p> <p>Ofloxacine</p>	<p>Béta-lactamine IV/Ciprofloxacine VO</p> <p><u>Enterobacter spp</u> : Cefepime IV/Ertapénème IV <u>Alternative</u> : Ciprofloxacine VO/IV</p>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<p style="text-align: center;">IV</p> <p>Ceftazidime/Céfépime/Imipénème/Méropénème** + Amikacine/Tobramycine/Ciprofloxacine/Fosfomycine</p> <p style="text-align: center;">Relai VO</p> <p>Ciprofloxacine</p>	<p>Céfépime IV/Méropénème IV +/- Aminocyclitol IV <u>Alternative</u> : Ciprofloxacine IV/VO/Ceftazidime IV +/- Aminocyclitol IV</p>
Anaérobies Gram positifs	<p>Amoxicilline/Céfazoline/Ceftriaxone/Clindamycine <u>Allergie pénicilline</u> : Clindamycine</p>	<p><u>P. acnes</u> : Pénicilline G IV/Ceftriaxone IV <u>Alternative</u> : Clindamycine IV/VO/Vancomycine IV</p>
Anaérobies Gram négatif	<p>Clindamycine/Métronidazole/Amoxicilline-Acide clavulanique <u>Allergie pénicilline</u> : Clindamycine/Métronidazole</p>	

*Si érythromycine sensible **Utilisation hors AMM ***Pénicilline M

IV : voie veineuse VO : voie orale

II. OBJECTIFS

Le diagnostic microbiologique des infections ostéo-articulaires nécessite plusieurs jours d'incubation des milieux de culture en raison de la faible charge bactérienne, ainsi que de la fréquence des microorganismes à pousse lente. Selon les études, 7 à 39% des infections sur prothèse présentent des cultures négatives (13). L'avantage de l'automate Unyvero réside dans la rapidité du test de détection, permettant de raccourcir les délais de rendu des résultats bactériologiques. Les travaux de Aamot *et al.*, montrent des résultats encourageants en termes de sensibilité (73%) de la PCR multiplexe Unyvero dans le diagnostic des infections prothétiques (65).

L'objectif de l'étude a été d'évaluer les performances analytiques de l'automate et des réactifs Unyvero ITI chez deux populations de patients, atteints d'ostéite ou d'infection sur prothèse articulaire au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux. En effet, la dernière version de la cassette Unyvero ITI après amélioration des performances analytiques n'a pas fait l'objet de nombreux travaux dans les infections de prothèse. De plus, peu d'études précédemment réalisées ont étudié l'intérêt de la PCR multiplexe dans les ostéites.

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Patients

Les patients sélectionnés de novembre 2018 à avril 2019 puis de juillet 2020 à septembre 2020 provenaient des services de maladies infectieuses ou des services d'orthopédie du CHU de Bordeaux. Il s'agissait de patients suspects d'infection de prothèse ou d'ostéite.

- Critères d'inclusion

Les patients inclus dans l'étude étaient âgés de plus de 18 ans. Deux types de population ont été choisies pour la réalisation de la biologie moléculaire sur les échantillons cliniques. Le premier groupe réunissait des patients présentant des infections sur prothèse post-opératoires précoces et hémotogènes nécessitant un traitement chirurgical par lavage et débridement, ainsi que des infections post-opératoires tardives, prises en charge par un changement du matériel en une ou deux étapes. Un deuxième groupe comprenant des ostéites a été intégré dans cette étude. Les patients ont été sélectionnés soit par les infectiologues du CHU de Bordeaux, soit par une requête informatique permettant d'inclure les patients provenant des services de chirurgie orthopédique. La sélection des patients ainsi que le diagnostic final de l'infection ont été basés selon les critères MSIS modifiés de Parvizi *et al.* (35).

III.2. Protocole

III.2.1. Prélèvements

Les prélèvements peropératoires ont été effectués par les chirurgiens orthopédistes du CHU de Bordeaux au bloc opératoire, puis envoyés dans des flacons stériles au laboratoire de bactériologie. Le nombre de prélèvements variait de 3 à 9 par patients, et leur nature était diverse (biopsie osseuse, biopsie synoviale, tissu périprothétique, tissu autre, liquide articulaire, liquide synovial, liquide de lavage, liquide de drainage, pus, matériel). Des ponctions de liquide articulaire préopératoire réalisées dans le service de maladies infectieuses ont aussi été incluses dans l'étude.

III.2.2. Culture

- Ensemencement

Les prélèvements ont été ensemencés selon le protocole du laboratoire sous PSM II avec des gants et du matériel à usage unique. Après ajout de 5 à 9 mL d'eau physiologique, les biopsies de tissus mous ont été broyées mécaniquement dans des pots contenant des billes stériles grâce à l'Ultra Turrax® (IKA) pendant 30 secondes à puissance maximale. Les biopsies osseuses et le matériel, immergés dans l'eau physiologique ajoutée, ont été vortexés et

soniqués pendant 5 minutes. Les liquides n'ont pas été prétraités avant leur mise en culture. Les prélèvements ont étéensemencés sur des milieux riches gélosés : une gélose chocolat/polyvitalex (Oxoid), une gélose columbia au sang de cheval incubées en aérobie (Oxoid) sous CO₂, ainsi qu'une gélose schaedler au sang de monton+hémimine+vitamine K incubée en anaérobie (Oxoid), pendant 7 jours à 37°C. Deux milieux liquides, Brain Heart (Oxoid) et schaedler (Oxoid) ont été incubés pendant 14 jours afin de permettre la pousse des bactéries à croissance lente. Les liquides ponctionnés et directement mis dans des flacons d'hémoculture au bloc opératoire, ont été incubés dans les Bact/Alert® Virtuo® (Biomérieux) pendant 14 jours. L'examen direct, par une coloration de Gram à la recherche des bactéries et des polynucléaires neutrophiles, n'a été effectué qu'à la demande du clinicien.

- Lecture et interprétation

Les milieux de culture gélosés ont été observés quotidiennement jusqu'au 7^{ème} jour. Les bouillons dont la croissance bactérienne se traduit par un trouble du milieu, ont été observés tous les jours à partir du 7^{ème} jour, et repiqués sur des géloses en aérobie et en anaérobie lorsque ceux-ci étaient positifs. Chaque colonie d'aspect différent a été identifiée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Brucker) et antibiogrammée. Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés soit par la méthode de diffusion des disques sur des géloses Mueller-Hinton (Biorad) ou Mueller-Hinton-F au sang de cheval+NAD (Biorad) soit par la mesure des CMI en milieu liquide sur l'automate Phoenix (BD). Chaque isolat détecté a été conservé congelé à -20°C ou -80°C en fonction du germe identifié.

III.2.3. PCR Unyvero ITI

Les tests Unyvero ITI ont été fournis par la société Menarini et financés par le CRIOAC Grand Sud-Ouest.

Pour les patients sélectionnés, les prélèvements ont été conservés congelés à -20°C après la mise en culture. Les échantillons pour lesquels les cultures étaient négatives à J3 d'incubation ont été sélectionnés pour la réalisation de la PCR multiplexe Unyvero. Une fois les prélèvements décongelés, ceux-ci ont été poolés sous PSM II. Les biopsies osseuses et le matériel ont été choisis de préférence pour la PCR multiplexe par rapport aux liquides de ponction et aux tissus mous. En effet, d'après Cazanave *et al.*, les techniques de biologie moléculaire présenteraient une meilleure sensibilité lorsque celles-ci sont réalisées sur du liquide de sonication par rapport à du liquide synovial ou du tissu périprothétique (56). La technique de préparation de l'échantillon a ensuite été réalisée selon les recommandations du fournisseur. Sous PSM II avec des gants et du matériel à usage unique, 180 µL d'échantillon poolé a été transféré dans l'Unyvero Sample Tube. Ce dernier a été inséré dans le module Lysator pour permettre la lyse cellulaire. Puis, la cartouche ITI dans laquelle l'Unyvero Sample

Tube et l'Unyvero Master Mix Tube ont été préalablement placés, a été introduite dans la partie Analyser de l'automate qui effectue la purification, l'amplification et la détection de l'ADN. Le recueil des résultats a été fait 5 heures plus tard à partir de l'Unyvero Cockpit. Les résultats ont été communiqués aux cliniciens et inscrits dans le système informatique du laboratoire, Synergy, permettant leur visibilité dans les services cliniques, dans le dossier patient grâce au logiciel DxCare.

III.3. Données recueillies

Les informations concernant les patients inclus, les données cliniques et biologiques ont été recueillies grâce aux logiciels DxCare et Synergy accessibles par le portail du CHU de Bordeaux.

III.4. Analyse statistique

Les résultats de la PCR multiplexe Unyvero ITI ont été comparés avec la méthode de référence par la mesure des taux de tests concordants et discordants. La sensibilité (Se), la spécificité (Sp), la valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN) ont été déterminées pour le groupe de patients suspects d'infection prothétique à partir des critères MSIS modifiés (35).

IV. RESULTATS

Les résultats préliminaires, réalisés entre novembre 2018 et avril 2019, de ce travail, ont fait l'objet d'un poster présenté au congrès national des CRIOAC en octobre 2019.

IV.1. Patients

Dans cette étude, 24 patients ont été inclus pour une infection ostéo-articulaire. Parmi ceux-ci, 19 appartenaient au groupe des infections prothétiques (groupe 1) et 5 au groupe des ostéites (groupe 2). Ces deux populations ont, par la suite, été étudiées de manière indépendante. L'âge médian était respectivement de 72 ans et 40 ans dans les groupes 1 et 2 et le sexe ratio H/F variait de 1,1 à 4. Un total de 113 prélèvements ont été envoyés au laboratoire dont 2 ponctions de liquide articulaire préopératoire et 13 liquides articulaires, 36 biopsies osseuses, 55 biopsies tissulaires, 3 pus, 1 hématome et 1 matériel (vis) peropératoires (Tableau 14 et 15). Quatre patients appartenant au groupe des infections prothétiques avaient reçu une antibiothérapie dans les 15 jours précédents la réalisation des prélèvements. Parmi les patients suspects d'infection sur prothèse, 10 avaient été classés comme infectés et 8 non infectés au moment de la réalisation du/des prélèvement(s) sur la base des critères MSIS modifiés (35)(Annexe 2). Concernant les patients faisant partie du groupe des ostéites, 3 ont été classés comme infectés et 2 non infectés sur la base des critères radio-clinico-biologiques.

Tableau 14 : [Caractéristiques des échantillons et des patients appartenant au groupe des infections sur prothèse]

	Groupe 1 (n=19)
Données démographiques	
Age médian	72 [49-88]
Sexe ratio (H/F)	1,11
Nature prothèse (n)	
Hanche	8
Genou	8
Epaule	2
Cheville	1
Procédure prise en charge (n)	
Ponction préopératoire	2
Lavage	3
Changement 1 temps	4
Changement 2 temps	10
Dépose	3
Repose	7
Nature prélèvements (n)	90
Liquide articulaire préopératoire	2
Liquide articulaire	12
Biopsie osseuse	22
Tissu périprothétique	49
Pus	3
Hématome	1
Matériel	1
Antibiothérapie	
Patients (prélèvements réalisés après antibiothérapie)	4
Diagnostic final	
Infecté	10
Non infecté	8

Tableau 15 : [Caractéristiques des échantillons et des patients appartenant au groupe des ostéites]

	Groupe 2 (n=5)
Données démographiques	
Age médian	40 [27-71]
Sexe ratio (H/F)	4,00
Nature prélèvements (n)	23
Liquide articulaire	1
Biopsie osseuse	14
Biopsies tissulaires	6
Pus	2
Antibiothérapie	
Patients (prélèvements réalisés après antibiothérapie)	0
Diagnostic final	
Infecté	3
Non infecté	2

IV.2. Culture

- Groupe des infections prothétiques

Les échantillons envoyés pour une infection sur la prothèse, ont eu une culture microbiologique positive dans 32% des cas (Tableau 16). Les bactéries identifiées étaient pour la majorité des espèces du genre *Staphylococcus*, ainsi que deux bactéries anaérobies, *C. acnes* et *Clostridium perfringens* (Tableau 16). Aucune culture polymicrobienne n'a été observée parmi les patients sélectionnés.

Tableau 16 : [Résultats des cultures microbiologiques des échantillons du groupe des infections de prothèse]

Résultats culture	Microorganismes	Nombre
Monomicrobien	<i>S. aureus</i>	6
	<i>S. epidermidis</i>	1
	<i>S. lugdunensis</i>	2
	<i>C. acnes</i>	1
	<i>C. perfringens</i>	1
		1
Polymicrobien		0
Négatif		13

- Groupe des ostéites

Parmi les échantillons des patients atteints d'ostéites, les bactéries mises en évidence en culture étaient des espèces du genre *Staphylococcus*, et des bactéries Gram négatif (*P. mirabilis* et *P. aeruginosa*) (Tableau 17). Pour 3 des 5 patients sélectionnés, les cultures étaient positives dont 2 polymicrobiennes (Tableau 17). Les cultures des échantillons étaient stériles pour 2 des patients sélectionnés.

Tableau 17 : [Résultats des cultures microbiologiques des échantillons du groupe des ostéites]

Résultats culture	Microorganismes	Nombre
Monomicrobien	<i>S. aureus</i>	1
		1
Polymicrobien	<i>S. aureus</i> , <i>S. lugdunensis</i> <i>S. aureus</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	2
		1
		1
Négatif		2

IV.3. PCR multiplexe Unyvero ITI

- Groupe des infections prothétiques

Soixante-huit pourcent des patients (n=14) dont les cultures étaient négatives à J3, avaient une culture finale négative (Figure 15). Parmi ceux-ci, la PCR Unyvero était également négative dans 58% des cas (n=11) (Figure 15). Pour 32% des patients (n=6), les cultures initialement négatives se sont positivées entre J3 et J14 (Figure 15). La PCR Unyvero a retrouvé le même microorganisme pour un seul de ces patients. Le taux de concordance entre la culture microbiologique et la PCR était de 58% (Tableau 18). Concernant les résultats discordants, 5 patients dont les cultures finales étaient positives avaient des PCR retrouvées négatives (Figure 15). Un des germes non détectés par la PCR n'était pas inclus dans le panel du test (*Clostridium perfringens*) (Figure 15). Les autres bactéries, présentes en culture mais non détectées par la PCR, étaient pourtant incluses dans le panel du test. Pour deux patients infectés respectivement par *C. acnes* et *S. aureus*, la PCR n'a pas détectée ces bactéries probablement présentes en très faible quantité, puisqu'elles ont seulement été identifiées dans les milieux de culture liquides. Les deux autres germes décelés en culture (*S. epidermidis* et *S. lugdunensis*) ont été considérés comme des contaminations (Annexe 1). En effet, seul un prélèvement sur 4 et 5 respectivement était positif en culture. Ces patients ont été classés comme non infectés au moment de la repose de leur prothèse selon les critères MSIS (Annexe 2). De plus, ces patients étaient connus comme étant infectés, pour l'un par *Candida parapsilosis*, et pour l'autre par le même microorganisme (*S. epidermidis*) mais dont l'antibiogramme différait sur plusieurs antibiotiques (Annexe 1). Par ailleurs, la PCR a permis

la détection et l'identification d'un germe (*S. aureus* et *S. pyogenes/dysgalactiae*) chez des patients classés comme infectés mais ayant une culture stérile à J14 (Figure 15). Dans ces deux cas, les patients avaient été préalablement exposés à des antibiotiques avant la réalisation des prélèvements bactériologiques. En effet, le patient pour lequel la PCR était positive à *S. pyogenes/dysgalactiae* avait reçu de l'Amoxicilline, arrêtée 8 jours avant la prise en charge chirurgicale. Concernant l'autre PCR, positive à *S. aureus*, les prélèvements peropératoires ont été réalisés chez un patient en cours de traitement par Céfazoline et Lévofoxacine.

Tableau 18 : [Concordance des résultats de la PCR Unyvero et de la culture des échantillons du groupe des infections prothétiques]

		Résultats PCR Unyvero		Total
		Positif (n)	Négatif (n)	
Résultats Culture	Positif (n)	1	5	6
	Négatif (n)	2	11	13
Total		3	16	19

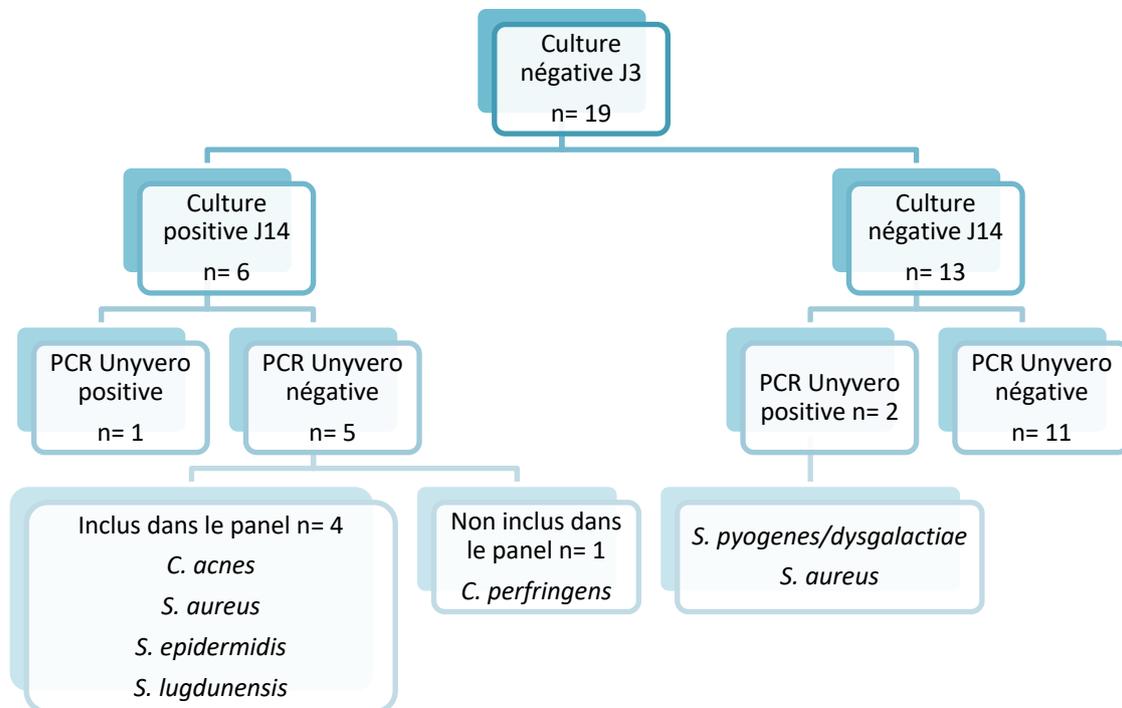


Figure 15 : Comparaison des résultats de la PCR Unyvero avec la culture des échantillons du groupe des infections prothétiques

- Performances diagnostiques du test

Les sensibilités observées de la culture et de la PCR multiplexe sont respectivement de 36% et 27% (Tableau 19). Cette différence est directement liée à la présence de résultats faussement négatifs en PCR Unyvero. Cette technique de diagnostic moléculaire semble présenter de meilleure spécificité (100%) et valeur prédictive positive (100%) que la méthode de référence (Sp 75% et VPP 67%) en raison de l'absence de résultats faussement positifs dans cette étude (Tableau 19).

Tableau 19 : [Comparaison des performances diagnostiques de la PCR Unyvero avec la culture chez les patients appartenant au groupe des infections prothétiques]

	Se (%)	Sp (%)	VPP (%)	VPN (%)
Culture	36	75	67	46
PCR Unyvero	27	100	100	50

Se : Sensibilité Sp : Spécificité

VPP : Valeur Prédictive Positive VPN : Valeur Prédictive Négative

- Groupe des ostéites

Parmi les 5 patients sélectionnés pour lesquels la culture était négative à J3, 3 d'entre eux avaient une culture finale stérile pour les échantillons testés en PCR (Figure 16). Pour 2 de ces patients, les PCR Unyvero réalisées sur ces échantillons sont restées négatives (Figure 16). Le taux de concordance observé chez cette catégorie de patients était ainsi de 40% (Tableau 20). Dans 2 cas, les cultures se sont positivées entre J3 et J14 (Figure 16). Les PCR effectuées pour ces 2 patients ont permis l'identification d'un germe supplémentaire (un SCN et un *Finegoldia magna*) (Figure 16). Pour ces 2 patients classés comme infectés, ces tests ont été considérés comme des vrais positifs. En effet, le *F. magna* étant un germe anaérobie de croissance difficile, la culture n'a pas pu permettre sa mise en évidence. Les cultures polymicrobiennes pour ce patient ont aussi pu masquer la présence de la bactérie en culture. Dans l'autre cas, le SCN a été retrouvé en culture dans les autres prélèvements (*S. lugdunensis*) (Annexe 3). Dans un cas, la PCR a signalé la présence d'un SCN chez un patient classé comme non infecté au moment des prélèvements dont les cultures sont restées stériles (Figure 16).

Tableau 20 : [Concordance des résultats de la PCR Unyvero et de la culture des échantillons du groupe des ostéites]

		Résultats PCR Unyvero			Total
		Positif monomicrobien (n)	Positif polymicrobien (n)	Négatif (n)	
Résultats Culture	Positif monomicrobien (n)	0	1	0	0
	Positif polymicrobien (n)	0	1	0	2
	Négatif (n)	1	0	2	3
Total		1	2	2	5

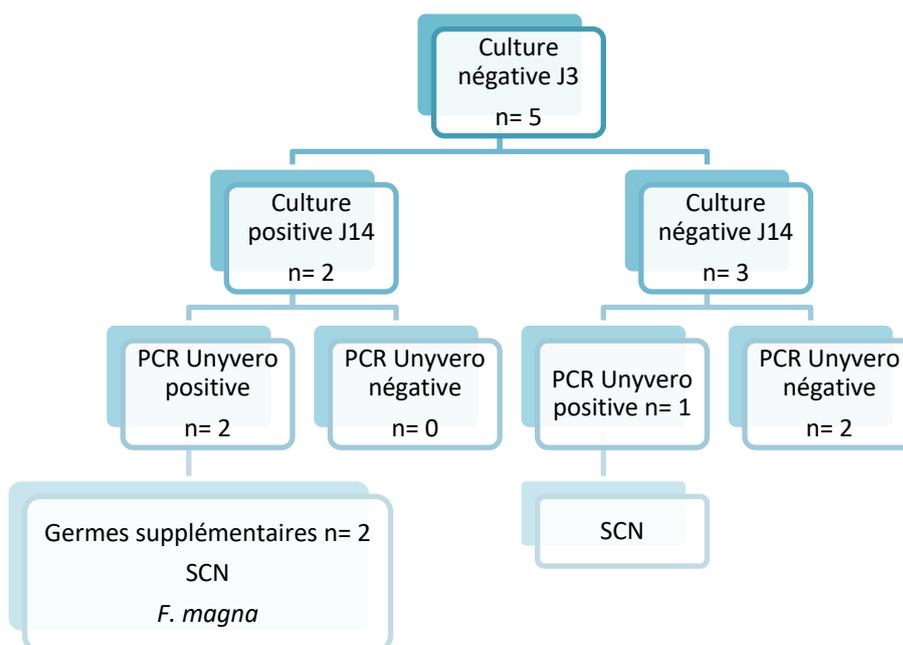


Figure 16 : Comparaison des résultats de la PCR Unyvero avec la culture des échantillons du groupe des ostéites

- Gènes de résistance aux antibiotiques

Concernant la détection du caractère résistant des Staphylocoques vis-à-vis de la méticilline, tous les tests étaient concordants avec l'antibiogramme (Tableau 21). La détection des gènes *erm* responsables du phénotype MLSb était comparable aux résultats obtenus en culture, dans 83% des cas (Tableau 21). Dans un cas, la détection des gènes *ermA* et *ermC* était négative chez un *S. epidermidis* ayant un phénotype MLSb inductible (Tableau 21).

Tableau 21 : [Comparaison de la détection des gènes de résistance en PCR Unyvero avec les résultats de l'antibiogramme]

Culture			PCR Unyvero
Germe	Méticilline	Macrolides	
<i>S. epidermidis</i>	S	MLSb inductible	SCN
<i>S. aureus</i>	S	S	Négatif
<i>S. epidermidis</i>	S	Efflux	Négatif
<i>S. lugdunensis</i>	S	S	Négatif
<i>S. aureus</i> <i>S. lugdunensis</i>	S S	S MLSb inductible	<i>S. aureus</i> SCN <i>ermA</i>

V. DISCUSSION

Le panel Unyvero ITI a été choisi dans cette étude pour sa détection étendue des 85 pathogènes les plus fréquemment impliqués dans les IOA, et sa capacité à détecter 17 gènes de résistance aux antibiotiques. Le test Unyvero représente le seul test actuellement sur le marché permettant l'identification du *C. acnes*, non disponible dans les kits FilmArray (Biomérieux) et Prove-it (Mobidiag) ainsi que d'un panel étendu de Staphylocoques à coagulase négative, fréquemment en cause dans les IOA en particulier en présence de matériel. Le système Unyvero présente aussi l'avantage de pouvoir détecter les gènes *ermA* et *ermC* responsables de la résistance à la clindamycine, utilisée comme anti-staphylocoque.

Parmi le groupe des infections prothétiques, la PCR multiplexe Unyvero ITI a montré une excellente spécificité (100%) par rapport à la culture standard (75%). Dans deux cas, la culture d'un seul échantillon a mis en évidence la présence d'un SCN considéré comme un résultat faussement positif chez des patients classés comme non infectés. Nos résultats témoignent de la diminution du nombre de faux positifs, habituellement fréquemment rencontrés en biologie moléculaire, notamment en PCR universelle. En effet, le risque de contamination est faible, grâce à la manipulation limitée de l'échantillon, ainsi qu'à l'automatisation de toutes les étapes de la PCR dans une même cartouche. Notre étude confirme la très bonne spécificité de la technique déjà démontrée dans la littérature (94 à 100%) (60)(61)(64).

Concernant les échantillons provenant de patients infectés au niveau de leur prothèse, le taux de concordance entre la PCR multiplexe et la culture était de 58%, ce qui est cohérent avec les études de la littérature (58-82%)(66)(67)(68)(79). Parmi les patients infectés selon les critères MSIS, une culture positive à *C. perfringens* n'a pas été détectée par la PCR. En effet, *C. perfringens* n'étant pas un germe habituellement retrouvé dans les IOA, il ne fait pas partie du panel Unyvero ITI (80). Deux patients infectés à *C. acnes* et *S. aureus* retrouvés dans plusieurs prélèvements en culture n'ont pas été détectés en PCR. Ces pathogènes étaient probablement en très faible quantité, puisqu'ils étaient seulement présents dans les bouillons d'enrichissement. Ces germes étaient probablement en dessous du seuil de détection de la technique (10^5 UFC/mL). Ces données démontrent l'impact de l'effet inoculum de l'agent pathogène, déjà décrit par Malandain *et al.* (67). Le faible volume d'échantillon utilisé en biologie moléculaire par rapport celui mis en culture, peut, en partie, être responsable de la diminution de la sensibilité de la technique. De plus, la répartition de la charge bactérienne est inégale au sein des liquides de sonication, des liquides articulaires et des tissus périprothétiques. Une erreur d'échantillonnage peut être à l'origine de résultats faussement négatifs en PCR. Le choix d'avoir poolé les échantillons peut, de plus, conduire à une diminution de la charge bactérienne par une dilution des échantillons positifs au sein des

échantillons négatifs. Dans des conditions idéales, tous les prélèvements de chaque patient auraient dû bénéficier d'un test Unyvero. Pour des raisons économiques (environ 350 euros/kit), nous avons décidé de pooler les échantillons afin de pouvoir inclure un plus grand nombre de patients (81).

Notre étude démontre une sensibilité diagnostique inférieure en PCR multiplexe (27%) par rapport à celle de la culture microbiologique (36%), ce qui confirme les données de sensibilités de la littérature allant de 34,2 à 73% en fonction des études (60)(61)(62)(64)(65)(79). Nous pouvons noter que nos résultats, en termes de sensibilité, se situent parmi les plus bas présentés dans la littérature. En effet, la stratégie de sélection des patients n'a pas été la même que celle choisie dans les précédents travaux. Nous avons choisi d'inclure les patients à J3 de culture négative, en raison de la plus grande fréquence de germes à pousse lente dans les infections prothétiques. En effet, les cultures nécessitent plusieurs jours d'incubation afin de mettre en évidence ces germes de croissance ralentie. Les infections post-opératoires précoces ou d'origine hématogène impliquent généralement des bactéries plus virulentes, dont les milieux de culture se positivent en moins de 48 heures. Les travaux réalisés par différents auteurs ne démontrent pas la supériorité de la PCR Unyvero effectuée à J0 par rapport à la méthode microbiologique de référence (61)(64)(67). En effet, la PCR multiplexe n'apporte pas d'informations supplémentaires dans le diagnostic des IOA impliquant des bactéries à croissance rapide, et dont la détection de certains gènes de résistance ne remplace pas la réalisation d'un antibiogramme qui reste le gold standard à ce jour. C'est pourquoi nous avons décidé d'inclure les patients suspects d'infection, dont les cultures ne permettaient pas une identification bactérienne à J3 d'incubation. Le principal intérêt de cette technique étant son gain de temps diagnostique significatif, puisqu'elle permet un résultat en 5h. La réalisation de la PCR multiplexe nous paraissait alors pertinente pour la détection des bactéries dont les cultures se positivent entre J3 et J14, afin de raccourcir le délai de rendu de résultat. En effet, Torres *et al.* ont démontré que l'utilisation de la PCR Unyvero permettait, par son diagnostic précoce, de raccourcir les séjours hospitaliers, et de ce fait de diminuer les coûts totaux par patients de 840 euros en moyenne par séjour (81). Le nombre de résultats positifs aurait sans doute été plus grand si les patients avaient été sélectionnés à J0, et de ce fait la sensibilité aurait été améliorée, et plus conforme à la littérature. En effet, les bactéries à croissance rapide, présentes en grande quantité et se positivant sur des milieux solides dans les 48h auraient certainement été décelées par l'automate comme le démontrent Malandain *et al.* (67). Nos résultats sont à confirmer par un plus grand nombre d'échantillons afin d'inclure davantage de cas positifs.

Parmi les résultats discordants, la PCR multiplexe a permis l'identification de bactéries, dans deux cas de vrais positifs (*S. aureus* et *S. pyogenes/dysgalactiae*). En effet, pour ces deux

patients, préalablement exposés aux antibiotiques, les cultures finales étaient stériles. Ces deux cas ont été confirmés, pour l'un d'entre eux indirectement par l'identification du même germe dans les hémocultures (*S. aureus*), et pour l'autre patient par une ponction de liquide articulaire préopératoire positive en PCR 16S à *S. dysgalactiae*. La PCR multiplexe Unyvero ITI a permis un diagnostic supplémentaire dans 11% des cas par rapport à la culture standard. Ce résultat est comparable à celui des travaux menés par Levy *et al.*, et dans lesquels la PCR universelle, réalisée pour des patients dont les cultures étaient négatives à J6 d'incubation, a apporté une identification bactérienne dans 9% des cas (82). Dans cette étude, l'utilisation combinée de la culture avec la PCR multiplexe amène la sensibilité à 55%. Cette technique de biologie moléculaire ne peut se substituer à la culture standard, elle permet de raccourcir les délais de prise en charge, et dans certains cas, elle améliore les performances diagnostiques en fournissant des informations supplémentaires.

Un faible nombre de patients atteints d'ostéite ont été inclus dans notre étude afin d'évaluer la pertinence de la PCR multiplexe dans cette indication. Dans deux cas, la PCR a identifié un germe supplémentaire par rapport à la culture (*F. magna* et SCN). Les ostéites étant fréquemment polymicrobiennes, l'utilisation de cette technique permet la mise en évidence rapide de tous les germes présents. Ce test est particulièrement intéressant pour la détection des microorganismes anaérobies qui nécessitent plusieurs jours d'incubation en culture. L'étude réalisée par Carrère *et al.* chez les ostéites du pied diabétique, atteste la supériorité de la PCR Unyvero dans l'identification des bactéries anaérobies (83).

Concernant la détection des gènes de résistance, le taux de concordance est de 100% quant à la méticillino-résistance. Cependant, tous les staphylocoques identifiés en PCR étaient sensibles à la méticilline. La capacité à détecter les staphylocoques résistants à la méticilline n'a pas pu être évaluée au cours de cette étude. Les données de Richarme *et al.* confirment cependant une excellente performance de la détection de la résistance à la méticilline, puisque deux staphylocoques méticillino-résistants avaient correctement été identifiés (*mecA*) (79). Dans notre étude, deux staphylocoques en culture présentaient une résistance aux macrolides (phénotype MLSb inducible pour l'un et MLSb constitutif pour l'autre). Dans un cas, la PCR n'a pas mis en évidence les gènes *ermA* ou *ermC*. Prieto-Borja *et al.*, signalent aussi une souche de *S. simulans* dont le phénotype MLSb constitutif mis en évidence en culture n'a pas été retrouvé en PCR (61). La cassette ITI contient dans son panel les deux gènes les plus fréquemment responsables du phénotype MLSb chez les staphylocoques (*ermA*, *ermC*), mais d'autres gènes *erm* sont aussi en cause dans la résistance aux macrolides-lincosamides-streptogramines (84). Chez les staphylocoques, l'expression du gène *ermB* est rarement et les gènes *ermY* et *erm33* exceptionnellement responsables du phénotype MLSb (84). Les

souches de staphylocoques discordantes quant au phénotype MLSb ont été conservées en vue d'une future analyse approfondie afin de rechercher le gène *erm* en cause.

Conclusion

Les infections ostéo-articulaires sont des pathologies rares, mais dont les conséquences fonctionnelles invalidantes peuvent amener à une réhospitalisation. Parmi les outils diagnostiques mis à disposition, aucun ne semble présenter des performances idéales. Les différents auteurs de la littérature ont démontré l'intérêt des tests Unyvero de par la précocité des résultats par rapport à la culture microbiologique. Grâce à son panel élargi, il permet la détection simultanée en 5 heures de nombreux pathogènes et de gènes de résistance.

Bien que la sensibilité observée soit imparfaite, la PCR multiplexe Unyvero présente tout de même des avantages séduisants. Cet outil de biologie moléculaire a fait preuve d'une excellente spécificité dans cette étude par rapport à la culture standard. L'automatisation de cette technique a contribué à la limitation du nombre de contaminants, habituellement rencontrés en biologie moléculaire. La PCR multiplexe Unyvero ne peut se substituer à la méthode de référence utilisée ce jour en microbiologie. Grâce à l'amélioration des techniques culturales (milieux d'enrichissement, sonication), la PCR paraît moins sensible pour déceler des germes présents en très faible quantité. De plus, la détection de certains gènes de résistance ne peut remplacer la réalisation d'un antibiogramme complet, permettant de mettre en évidence des phénotypes plus rare de résistance. Cependant, dans certains cas de cultures négatives, en particulier chez des patients exposés au préalable à des antibiotiques, cette technique apporte une identification bactérienne. Le kit Unyvero ITI a également su montrer sa capacité à détecter tous les microorganismes présents dans les infections polymicrobiennes. Ceci est particulièrement intéressant concernant les germes anaérobies, passant parfois inaperçus dans les milieux utilisés au laboratoire, en raison de leurs exigences culturales. Au cours de cette étude, nous avons montré une concordance parfaite quant à la détection de la méticillinorésistance. Les staphylocoques étant les principaux microorganismes responsables des infections ostéo-articulaires, la mise en évidence de leur sensibilité aux bêta-lactamines peut conduire à une adaptation thérapeutique précoce.

La PCR Unyvero ITI, réalisée à J3 de culture négative, semble se placer comme une méthode complémentaire à la culture microbiologique dans le diagnostic des infections ostéo-articulaires, grâce à sa précocité diagnostique et à l'apport d'une identification chez des patients exposés au préalable à un traitement antimicrobien. L'identification bactérienne précoce de la PCR multiplexe, constatée dans certains cas, permet la mise en place d'une antibiothérapie ciblée et la diminution de la durée d'hospitalisation.

Les nouvelles technologies innovantes de biologie moléculaire, telles que le séquençage haut débit, commencent à avoir des applications dans certains domaines. Des études récentes portant sur l'application du séquençage nouvelle génération (NGS) dans le diagnostic des

infections prothétiques ont été réalisées. D'après Wang *et al.*, le NGS serait fiable pour identifier les agents pathogènes en vue d'administrer un traitement ciblé (85). Toutefois, cet outil, bien qu'innovant n'a pas encore sa place en routine mais pourrait s'avérer prometteur dans le diagnostic des infections ostéo-articulaires.

Références bibliographiques

1. Grammatico-Guillon L. Surveillance hospitalière des infections ostéo-articulaires en France : analyse des données médico-administratives, PMSI 2008. 5 févr 2013; Bulletin épidémiologique hebdomadaire 4-5.
2. 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. *The American Journal of Medicine*. 15 oct 2004;117(8):556-62.
3. Melendez DP, Greenwood-Quaintance KE, Barbari EF, Osmon DR, Mandrekar JN, Hanssen AD, et al. Evaluation of a Genus- and Group-Specific Rapid PCR Assay Panel on Synovial Fluid for Diagnosis of Prosthetic Knee Infection. *J Clin Microbiol*. janv 2016;54(1):120-6.
4. Infections ostéo-articulaires (IOA) de l'adulte et de l'enfant. In: ECN Pilly 2018 - 5ième édition [Internet]. ALINÉA Plus. En ligne; (Maladies infectieuses et tropicales -Préparation ECN). Disponible sur: <https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/formation/ecn-pilly-2018/ecn-2018-ue6-153-nb.pdf>
5. Ghislain Aubin G, Corvec S. Épidémiologie et physiopathologie générale des infections ostéo-articulaires. *Revue Francophone des Laboratoires*. mars 2016;2016(480):25-31.
6. Ea HK, Zeller V, Lhotellier L, Ziza JM, Mamoudy P, Desplaces N. Ostéite chronique de l'adulte. Diagnostic et prise en charge. *Antibiotiques*. mai 2007;9(2):120-9.
7. Tsukayama DT, Estrada R, Gustilo RB. Infection after Total Hip Arthroplasty. A Study of the Treatment of One Hundred and Six Infections*: *The Journal of Bone & Joint Surgery*. avr 1996;78(4):512-23.
8. C. Isnard, V. Cattoir, F. Guérin. Infections ostéoarticulaires. In: *Bactériologie médicale - Techniques usuelles*. 3ième édition. Elsevier Masson;
9. Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, Schajnovitz A, Ramasamy SK, Kusumbe AP, et al. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate hematopoiesis. *Nature*. 21 avr 2016;532(7599):323-8.
10. Ader F, Salomon J, Perronne C, Bernard L. Origine de l'infection osseuse : endogène ou exogène ? Éléments de physiopathologie. *Médecine et Maladies Infectieuses*. nov 2004;34(11):530-7.
11. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet*. 24 juill 2004;364(9431):369-79.
12. Massin P, Legrand E, Cronier P, Chappard D, Audran M. Diagnostic et traitement des ostéomyélites chroniques de l'adulte à pyogène. /data/revues/11698330/00730004/06000846/ [Internet]. [cité 25 mai 2020]; Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/en/article/47217>
13. Tande AJ, Patel R. Prosthetic Joint Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 1 avr 2014;27(2):302-45.
14. Ziza J-M, Zeller V, Desplaces N, Mamoudy P. Infections sur prothèses articulaires : conditions du diagnostic et traitement. *Revue du Rhumatisme*. 1 avr 2006;73(4):337-44.

15. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 14 oct 2004;351(16):1645-54.
16. Ader F, Bernard L. Physiopathologie des infections sur matériel orthopédique. *La Presse Médicale.* avr 2005;34(7):533-6.
17. Trampuz A, Osmon DR, Hanssen AD, Steckelberg JM, Patel R. Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection. *Clin Orthop Relat Res.* sept 2003;(414):69-88.
18. Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(7):397-409.
19. Corvec S, Portillo ME, Pasticci BM, Borens O, Trampuz A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int J Artif Organs.* oct 2012;35(10):923-34.
20. Lipsky BA, Weigelt JA, Gupta V, Killian A, Peng MM. Skin, Soft Tissue, Bone, and Joint Infections in Hospitalized Patients: Epidemiology and Microbiological, Clinical, and Economic Outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol.* nov 2007;28(11):1290-8.
21. Milcent K, Guitton C, Koné-Paut I. Enquête nationale sur la prise en charge des ostéomyélites aiguës de l'enfant. *Archives de Pédiatrie.* 1 janv 2009;16(1):7-13.
22. Ferroni A. Épidémiologie et diagnostic bactériologique des infections ostéoarticulaires aiguës de l'enfant. *Archives de Pédiatrie.* 1 oct 2007;14:S91-6.
23. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF). Recommandations de pratique clinique - Infections ostéo-articulaires sur matériel (prothèse, implant, ostéosynthèse) [Internet]. En ligne; 2009. Disponible sur: https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/_documents/consensus/inf-osseuse-court.pdf
24. Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DWM, Simpson H, Peto TEA, et al. Prospective Evaluation of Criteria for Microbiological Diagnosis of Prosthetic-Joint Infection at Revision Arthroplasty. *Journal of Clinical Microbiology.* 1 oct 1998;36(10):2932-9.
25. Flurin L, Greenwood-Quaintance KE, Patel R. Microbiology of polymicrobial prosthetic joint infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 1 juill 2019;94(3):255-9.
26. Triffault-Fillit C, Ferry T, Laurent F, Pradat P, Dupieux C, Conrad A, et al. Microbiologic epidemiology depending on time to occurrence of prosthetic joint infection: a prospective cohort study. *Clinical Microbiology and Infection.* 1 mars 2019;25(3):353-8.
27. 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. *Journal of Infection.* 1 juill 2014;69(1):35-41.
28. HAS 2014. Prothèse de hanche ou de genou : diagnostic et prise en charge de l'infection dans le mois suivant l'implantation [Internet]. 2014. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2014-03/rbp_argumentaire_prothese_infectees_vd_.pdf
29. Ferry T, Lustig S, Laurent F, Gillet Y, Chidiac C, Valour F. Traitement des infections ostéo-articulaires. *Revue Francophone des Laboratoires.* 1 mars 2016;2016(480):61-7.

30. Mazur JM, Ross G, Cummings J, Hahn GA, McCluskey WP. Usefulness of magnetic resonance imaging for the diagnosis of acute musculoskeletal infections in children. *J Pediatr Orthop.* avr 1995;15(2):144-7.
31. Sonnen GM, Henry NK. Pediatric bone and joint infections. Diagnosis and antimicrobial management. *Pediatr Clin North Am.* août 1996;43(4):933-47.
32. Parvizi J, Jacovides C, Adeli B, Jung KA, Hozack WJ, Mark B, Coventry Award: Synovial C-reactive Protein: A Prospective Evaluation of a Molecular Marker for Periprosthetic Knee Joint Infection. *Clin Orthop Relat Res.* janv 2012;470(1):54-60.
33. Omar M, Ettinger M, Reichling M, Petri M, Guenther D, Gehrke T, et al. Synovial C-reactive protein as a marker for chronic periprosthetic infection in total hip arthroplasty. *The Bone & Joint Journal.* 1 févr 2015;97-B(2):173-6.
34. Shahi A, Kheir MM, Tarabichi M, Hosseinzadeh HRS, Tan TL, Parvizi J. Serum D-Dimer Test Is Promising for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection and Timing of Reimplantation. *J Bone Joint Surg Am.* 6 sept 2017;99(17):1419-27.
35. Parvizi J, Tan TL, Goswami K, Higuera C, Della Valle C, Chen AF, et al. The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *J Arthroplasty.* 2018;33(5):1309-1314.e2.
36. Wyatt MC, Beswick AD, Kunutsor SK, Wilson MJ, Whitehouse MR, Blom AW. The Alpha-Defensin Immunoassay and Leukocyte Esterase Colorimetric Strip Test for the Diagnosis of Periprosthetic Infection. *J Bone Joint Surg Am.* 15 juin 2016;98(12):992-1000.
37. Lee YS, Koo K-H, Kim HJ, Tian S, Kim T-Y, Maltentfort MG, et al. Synovial Fluid Biomarkers for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 20 déc 2017;99(24):2077-84.
38. Tischler EH, Cavanaugh PK, Parvizi J. Leukocyte esterase strip test: matched for musculoskeletal infection society criteria. *J Bone Joint Surg Am.* 19 nov 2014;96(22):1917-20.
39. 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 Relat Res.* nov 2011;469(11):2992-4.
40. Société Française de Microbiologie. Infections osseuses et articulaires. In: REMIC (Référentiel en microbiologie médicale). 5ième édition 2015.
41. 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 [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa061588>. 2009 [cité 23 févr 2020]. Disponible sur: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa061588?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov
42. Carsenti-Dellamonica H. Infections associées aux implants orthopédiques. *Antibiotiques.* 1 févr 2008;10(1):3-15.
43. Shirtliff ME, Mader JT. Acute Septic Arthritis. *Clin Microbiol Rev.* oct 2002;15(4):527-44.
44. Ghanem E, Parvizi J, Burnett RSJ, Sharkey PF, Keshavarzi N, Aggarwal A, et al. Cell count and differential of aspirated fluid in the diagnosis of infection at the site of total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* août 2008;90(8):1637-43.

45. Desplaces N. Bactériologie des infections ostéoarticulaires chez l'adulte. *Revue du Rhumatisme*. 1 févr 2006;73(2):129-35.
46. Société Française de Microbiologie. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [Internet]. 2020. Disponible sur: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/CASFM2020_Avril2020_V1.1.pdf
47. Fihman V, Hannouche D, Bousson V, Bardin T, Lioté F, Raskine L, et al. Improved diagnosis specificity in bone and joint infections using molecular techniques. *Journal of Infection*. déc 2007;55(6):510-7.
48. Bjerkan G, Witsø E, Nor A, Viset T, Løseth K, Lydersen S, et al. A comprehensive microbiological evaluation of fifty-four patients undergoing revision surgery due to prosthetic joint loosening. *Journal of Medical Microbiology*,. 2012;61(4):572-81.
49. 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*. oct 2014;52(10):3583-9.
50. 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*. déc 2011;49(12):4225-30.
51. 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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1 mars 2014;78(3):313-5.
52. 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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1 août 2012;73(4):318-21.
53. Ceroni D, Cherkaoui A, Ferey S, Kaelin A, Schrenzel J. *Kingella kingae* osteoarticular infections in young children: clinical features and contribution of a new specific real-time PCR assay to the diagnosis. *J Pediatr Orthop*. mai 2010;30(3):301-4.
54. Samara E, Spyropoulou V, Tabard-Fougère A, Merlini L, Valaikaite R, Dhouib A, et al. *Kingella kingae* and Osteoarticular Infections. *Pediatrics*. 2019;144(6).
55. Yagupsky P. Chapter 10 - Laboratory Detection of the Emergent Pathogen *Kingella kingae* in Children With Septic Arthritis. In: Kon K, Rai M, éditeurs. *The Microbiology of Skin, Soft Tissue, Bone and Joint Infections* [Internet]. Academic Press; 2017 [cité 27 mai 2020]. p. 153-66. (*Clinical Microbiology: Diagnosis, Treatments and Prophylaxis of Infections*; vol. 2). Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128110799000100>
56. Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Karau MJ, Schmidt SM, Gomez Urena EO, et al. Rapid Molecular Microbiologic Diagnosis of Prosthetic Joint Infection. *J Clin Microbiol*. juill 2013;51(7):2280-7.
57. Ryu SY, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Mandrekar JN, Patel R. Low sensitivity of periprosthetic tissue PCR for prosthetic knee infection diagnosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1 août 2014;79(4):448-53.

58. Monteix A. Preliminary Evaluation of the Developmet version of FilmArray Bone and Joint Infection (BJI) Panel : a fast way for the detection of bacteria and fungi in osteoarticular infections. Poster présenté à; 2017 avr 22; ESCMID.
59. Metso L, Mäki M, Tissari P, Remes V, Piiparinen P, Kirveskari J, et al. Efficacy of a novel PCR- and microarray-based method in diagnosis of a prosthetic joint infection. *Acta Orthop.* avr 2014;85(2):165-70.
60. 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.* févr 2016;121:27-32.
61. Prieto-Borja L, Rodriguez-Sevilla G, Auñon A, Pérez-Jorge C, Sandoval E, Garcia-Cañete J, et al. Evaluation of a commercial multiplex PCR (Unyvero i60®) designed for the diagnosis of bone and joint infections using prosthetic-joint sonication. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* avr 2017;35(4):236-42.
62. Villa F, Toscano M, De Vecchi E, Bortolin M, Drago L. Reliability of a multiplex PCR system for diagnosis of early and late prosthetic joint infections before and after broth enrichment. *International Journal of Medical Microbiology.* sept 2017;307(6):363-70.
63. Lafeuille E, Devriese F, Fourniols E, Jauréguiberry S, Aubry A. Apport du test moléculaire multiplex ITI G2 au diagnostic des infections ostéoarticulaires (IOA). *Médecine et Maladies Infectieuses.* juin 2017;47(4):S82.
64. Renz N, Feihl S, Cabric S, Trampuz A. Performance of automated multiplex PCR using sonication fluid for diagnosis of periprosthetic joint infection: a prospective cohort. *Infection.* 1 déc 2017;45(6):877-84.
65. Aamot HV, Johnsen BO, Skråmm I. Rapid diagnostics of orthopedic implant-associated infections using Unyvero ITI implant and tissue infection application is not optimal for *Staphylococcus* species identification. *BMC Res Notes [Internet].* 6 nov 2019 [cité 12 avr 2020];12. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6836655/>
66. 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.* 1 oct 2015;43(5):551-60.
67. Malandain D, Bémer P, Leroy AG, Léger J, Plouzeau C, Valentin AS, et al. Assessment of the automated multiplex-PCR Unyvero i60 ITI® cartridge system to diagnose prosthetic joint infection: a multicentre study. *Clinical Microbiology and Infection.* 1 janv 2018;24(1):83.e1-83.e6.
68. Zannoli S, Sambri A, Morotti M, Tassinari M, Torri A, Bianchi G, et al. Unyvero ITI® system for the clinical resolution of discrepancies in periprosthetic joint infection diagnosis. *Musculoskelet Surg.* 8 oct 2019;
69. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis.* 1 févr 2011;52(3):e18-55.
70. 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. *Clinical Infectious Diseases*. 1 janv 2013;56(1):e1-25.

71. Romanò CL, Manzi G, Logoluso N, Romanò D. Value of debridement and irrigation for the treatment of peri-prosthetic infections. A systematic review. *Hip Int*. août 2012;22 Suppl 8:S19-24.
72. Høiby N, Bjarsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect*. mai 2015;21 Suppl 1:S1-25.
73. Zeller V, Desplaces N. Antibiothérapie des infections ostéoarticulaires à pyogènes chez l'adulte : principes et modalités. /data/revues/11698330/00730002/05004564/ [Internet]. [cité 25 mai 2020]; Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/en/article/39327>
74. Carsenti-Etesse H. Critères microbiologiques et pharmacologiques du choix des antibiotiques dans le traitement des infections ostéo-articulaires. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1 août 1991;21(8):491-504.
75. Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. *JAMA*. 20 mai 1998;279(19):1537-41.
76. Chang Y-J, Lee MS, Lee C-H, Lin P-C, Kuo F-C. Daptomycin treatment in patients with resistant staphylococcal periprosthetic joint infection. *BMC Infect Dis* [Internet]. 29 nov 2017 [cité 1 juin 2020];17. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5707892/>
77. Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1 avr 2009;33(4):374-8.
78. Bassetti M, Vitale F, Melica G, Righi E, Di Biagio A, Molfetta L, et al. Linezolid in the treatment of Gram-positive prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother*. 1 mars 2005;55(3):387-90.
79. Richarme C. Performances analytiques et impact thérapeutique de la PCR multiplex Unyvero® ITI dans les infections ostéo-articulaires sur matériel. :84.
80. Stroud G, Vandiver JW. *Clostridium perfringens* as an unusual cause of a prosthetic joint infection following total knee arthroplasty. *IDCases*. 2020;20:e00789.
81. Torres C, Oyagüez I, Prieto L, Rodriguez G, Esteban J. Costs Analysis Of Pcr Unyverotm I60-Iti Technique For Detecting Microorganisms In Patients With Suspected Chronic Infection At Musculoskeletal Implants. *Value in Health*. 1 nov 2015;18(7):A351.
82. Levy P-Y, Fournier P-E, Fenollar F, Raoult D. Systematic PCR detection in culture-negative osteoarticular infections. *Am J Med*. déc 2013;126(12):1143.e25-33.
83. Carrère C. Évaluation du système Unyvero® ITI dans le cadre de la prise en charge des ostéites du pied chez le diabétique. 6 avr 2018;84.
84. Patrice Courvalin, Roland Leclercq. Macrolides-Lincosamides-Streptogramines. In: *Antibiogramme*. 3ième édition.

85. Wang C, Huang Z, Li W, Fang X, Zhang W. Can metagenomic next-generation sequencing identify the pathogens responsible for culture-negative prosthetic joint infection? *BMC Infect Dis.* 30 mars 2020;20(1):253.

VI. Annexes

Annexe 1. Caractéristiques des patients suspects d'infection prothétique, résultats des cultures et de la PCR mutiplexe Unyvero ITI.....	78
Annexe 2. Critères MSIS des patients suspects d'infection prothétique.....	80
Annexe 3. Caractéristiques des patients suspects d'ostéites, résultats des cultures et de la PCR mutiplexe Unyvero ITI.....	81

Patient	Sexe	Date de naissance	Diagnostic clinique	Procédure prise en charge	Antériorités	Antibiothérapie préalable	Culture				Unyvero		Diagnostic final	
							Date	Echantillon	Résultats	Métililine	Macrolides	Date positivité		Date
13	F	16/01/1947	Prothèse épaule	Lavage	Antériorités négatives	Non	Liquide articulaire		Négatif					
							Liquide articulaire		Négatif					
							Tissu	Périprothétique	Négatif					
							Tissu	Périprothétique	Négatif				17-aout	Négatif
							Tissu	Périprothétique	Négatif					
14	H	01/01/1959	Prothèse genou	Ponction préopératoire	Ponction 05/2020 <i>S. dysgalactiae</i>	Non	Liquide articulaire		Négatif					
							Liquide articulaire		Négatif					
15	H	22/03/1946	Prothèse genou	2 temps (repose)	Dépense <i>Candida parapsilosis</i>	Non	Tissu	Synoviale	Négatif	Sensible	Sensible	J14		
							Tissu	Synoviale	Négatif					
							Tissu	Synoviale	Négatif					
16	F	06/05/1954	Prothèse genou	2 temps (repose)	Dépense <i>C. striatum E. cloacae</i>	Non	Liquide articulaire		Négatif					
							Tissu	Synoviale	Négatif					
							Tissu	Synoviale	Négatif					
							Tissu	Membrane fémur	Négatif				20-aout	Négatif
							Tissu	Synoviale	Négatif					
17	H	07/02/1955	Prothèse hanche	2 temps (repose)	Lavage 04/2020 SAM5	Non	Tissu	Synoviale	Négatif					
							Tissu	Synoviale	Négatif					
							Tissu	Synoviale	Négatif					
							Tissu	Synoviale	Négatif					
18	F	05/11/1933	Prothèse genou	Lavage	Céfazoline Lévofloxacine		Liquide articulaire		Négatif					
							Tissu	Synoviale	Négatif					
							Tissu	Synoviale	Négatif					
							Tissu	Synoviale	Négatif					
							Tissu	Fausse membrane	Négatif					
19	F	17/02/1963	Prothèse hanche	2 temps (dépose)	Dépense précédente 02/2020 <i>C. acnes</i>	Non	Liquide articulaire		Négatif					
							Tissu	Synoviale	Négatif					
							Tissu	Synoviale	Négatif					

Annexe 2. Critères MSIS des patients suspects d'infection prothétique

Patient	Critères MSIS											Diagnostic final
	2 cultures +	Fistule	CRP(mg/L)/DD (ng/L)	VS (mm/h)	Leucocytes LS/mm3/LE	%PNN LS	Alpha-défensine LS	CRP LS	Histologie +	Purulence +	1 culture +	
1	Oui	Oui	CRP 14,7		60 000	90						Infecté
2	Non	Non	CRP 20,6		QI	QI			Positive	Oui	Non	Infecté
3	Oui	Non										Infecté
4	Non	Non	CRP 4,6							Oui	Oui	Peu concluant
5	Non	Non	CRP 4,7							Non	Non	Non infecté
6	Non	Non	CRP 11						Positive	Non	Non	Non infecté
7	Oui	Non	CRP 91,4		7 000	95						Infecté
8	Non	Non	CRP 30,8							Non	Non	Non infecté
9	Non	Non			120		Négatif			Non	Non	Non infecté
10		Non	CRP 64		83 000	89						Infecté
11	Non	Non								Non	Oui	Non infecté
12	Non	Non	CRP 19,3		Incomptable (nombreux leucocytes)					Non	Non	Possiblement infecté
13	Non	Non	CRP 8,9		3 360	96			Négatif	Non	Non	Infecté
14		Non	CRP 8,4		28 500	100						Infecté
15	Non	Non	CRP 2,1							Non	Oui	Non infecté
16	Non	Non	CRP 2,8							Non	Non	Non infecté
17	Non	Non	CRP 17							Non	Non	Non infecté
18	Non	Non	CRP 24,5							Non	Non	Possiblement infecté
19	Oui	Non	CRP 1,1							Non	Non	Infecté

CRP : protéine C réactive DD : D-Dimères

VS : vitesse de sédimentation LS : liquide synovial

LE : leucocyte estérase PNN : polynucléaires neutrophiles

Les patients 4, 12 et 18 ont été considérés comme infectés.

Annexe 3. Caractéristiques des patients suspects d'ostéites, résultats des cultures et de la PCR multiplexe Unyvero ITI

Patient	Sexe	Date de naissance	Antériorités	Antibiothérapie préalable	Culture			Macrolides			Méticilline			Date positivité			Unyvero		Diagnostic final									
					Date	Echantillon	Résultats	Méticilline	Macrolides	Date positivité	Date	Résultat	Date	Résultat														
1	H	02/02/1988		Non	Os	05/04/2019	Négatif								19-avr	SCN		Non infecté										
2	H	13/04/1972		Non	Os	31/03/2019	Fistule	<i>S. aureus</i>	Sensible	Sensible	J7	J7	ermA		19-avr	<i>S. aureus</i> SCN		Infecté										
																			Os	Fistule	<i>S. aureus</i>	Sensible	Sensible	J7	J7			
3	H	15/06/1993	SAMS	Non	Os	30/11/2018		<i>S. aureus</i>	Sensible	MLSB inductible	J14	J7			07-déc	Négatif		Infecté										
																			Os		<i>S. aureus</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7			
4	F	04/11/1949		Non	Os	30/11/2018		<i>P. mirabilis</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7						Infecté										
																			Os		<i>S. aureus</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7			
																			Os		<i>P. mirabilis</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7			
																			Os		<i>S. aureus</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7			
																			Os		<i>P. mirabilis</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7			
																			Os		<i>S. aureus</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7			
5	H	23/08/1980	Ecoulement Os / <i>S. capitis S. warneri</i>	Non	Os	22/07/2020	Synoviale	<i>P. aeruginosa</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7				07-déc	<i>Proteus spp S. aureus P. aeruginosa F. magna</i>		Non infecté									
																				Os		<i>P. mirabilis</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7		
																				Os		<i>S. aureus</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7		
																				Os		<i>P. mirabilis</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7		
																				Os		<i>S. aureus</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7		
																				Os		<i>P. mirabilis</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7		
					Os		Condyle fémur	<i>P. mirabilis</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7			27-juil	Négatif		Non infecté										
																			Os		<i>S. aureus</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7			
																			Os		<i>P. mirabilis</i>	Sensible	MLSB inductible	J7	J7			

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Apport de la PCR multiplexe Unyvero ITI dans le diagnostic microbiologique des infections ostéo-articulaires

Les infections ostéo-articulaires sont rares, mais peuvent être responsables de complications sévères nécessitant de multiples reprises chirurgicales. Le diagnostic microbiologique des infections ostéo-articulaires est essentiel pour la mise en place d'une antibiothérapie adaptée. A ce jour, la culture standard, qui est la méthode de référence, se heurte à plusieurs limites parmi lesquelles une durée d'incubation de plusieurs jours ainsi qu'une sensibilité imparfaite. La PCR multiplexe Unyvero ITI grâce à son panel élargi permet la détection simultanée en 5 heures de 85 pathogènes et 17 gènes de résistance. Cette technique de biologie moléculaire a été utilisée au CHU de Bordeaux, en complément de la culture, chez des 19 patients atteints d'infection de prothèse et 5 patients atteints d'ostéite dont les prélèvements étaient négatifs à J3 d'incubation. Nos résultats montrent un taux de concordance de 58% entre les deux techniques. La PCR Unyvero ITI a apporté un diagnostic supplémentaire dans 11% des cas chez des patients présentant une infection prothétique dont les cultures demeuraient stériles. Parmi la détection des gènes de résistance, la PCR multiplexe a démontré une excellente détection (100%) de la méticillinorésistance des staphylocoques. La PCR Unyvero ITI, réalisée à J3 de culture négative, semble se placer comme une méthode complémentaire à la culture microbiologique dans le diagnostic des infections ostéo-articulaires grâce à sa précocité diagnostique et à l'apport d'une identification chez des patients exposés au préalable à un traitement antimicrobien. L'identification bactérienne précoce de la PCR multiplexe, constatée dans certains cas, permet la mise en place d'une antibiothérapie ciblée et la diminution de la durée d'hospitalisation.

Mots-clés : PCR multiplexe Unyvero ITI, Diagnostic microbiologique, Infections ostéo-articulaires, Infections de prothèse articulaire, Ostéite

Contribution of Unyvero ITI multiplex PCR in the microbiological diagnosis of osteoarticular infections

Osteoarticular infections are rare but can be responsible for severe complications requiring multiple repeat surgeries. Microbiological diagnosis of osteoarticular infections is essential for the implementation of appropriate antibiotic therapy. Actually, the standard culture, which is the reference method, has several limitations, including an incubation period of several days and imperfect sensitivity. The Unyvero ITI multiplex PCR, thanks to its extended panel, allows the simultaneous detection of 85 pathogens and 17 resistance genes in 5 hours. This molecular biology technique was used at the Bordeaux University Hospital, in addition to culture, in 19 patients with prosthesis infection and 5 patients with osteitis whose samples were negative at incubation day 3. Our results show a 58% agreement rate between the two techniques. The Unyvero ITI PCR provided an additional diagnosis in 11% of cases in patients with prosthetic infection whose cultures remained sterile. Among the detection of resistance genes, multiplex PCR demonstrated an excellent detection (100%) of staphylococcal methicillin resistance. The Unyvero ITI PCR, performed on J3 negative culture, appears to be a complementary method to microbiological culture in the diagnosis of osteoarticular infections thanks to its diagnostic precocity and the provision of identification in patients previously exposed to antimicrobial treatment. The early bacterial identification of multiplex PCR, observed in certain cases, allows the implementation of targeted antibiotic therapy and a reduction in the length of hospitalization.

Keywords : Unyvero ITI multiplexe PCR, Microbiological diagnosis, Osteoarticular infections, Prosthetic joint infections, Osteitis

