



U1173
INFECTION ET
INFLAMMATION



Institut national
de la santé et de la recherche médicale



Comment optimiser le diagnostic microbiologique des IOA en 2025?

Anne-Laure Roux

Service de Microbiologie, Hôpital Ambroise Paré

CRIOAC Ile de France - site Ambroise Paré

U1173, Infection et Inflammation

Difficultés du diagnostic microbiologique des IOA

- Difficulté d'isoler les micro-organismes
 - Production de biofilm
 - Traitements antibiotiques antérieurs multiples
 - Infections polymicrobiennes fréquentes
 - Micro-organismes à croissance lente ou déficients (Small Colony Variants)
- ➡ L'utilisation d'un milieu d'enrichissement est nécessaire
 - Les cultures doivent être prolongées
 - Utilisation d'un milieu permettant l'isolement des anaérobies et des aérobies
 - La contamination fréquente par la flore commensale de la peau

Problème de la spécificité

- Les bactéries commensales de la peau sont des pathogènes majeurs isolées dans les IOAs
 - Nécessité d'avoir des prélèvements multiples indépendants
 - Nécessité d'identifier et de tester la sensibilité aux antibiotiques de tous les micro-organismes isolés
- Prévention de la contamination de laboratoire à plusieurs niveaux
 - Manipulation des prélèvements sous poste de sécurité microbiologique de niveau 2 (PSM2)
 - Port de gants obligatoire
 - Traitement du prélèvement dans système clos

Problème de la sensibilité

- Le traitement des prélèvements doit permettre :
 - Relargage des bactéries à partir d'un prélèvement solide
 - Destruction du biofilm
- Choix large de milieux de culture pour permettre la croissance de tous les micro-organismes:
 - Aérobie / anaérobie / capnophile
 - Géloses au sang / géloses au sang cuit
 - Milieux d'enrichissement pour permettre la croissance des « fastidious » micro-organismes

➡ Entre 10-40% de cultures faussement négatives (*Dudareva, J Clin Microbiol, 2018*)

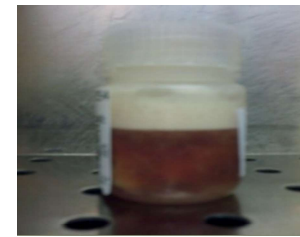
Quels prélèvements ?

- AVANT ANTIBIOTHERAPIE +++ (délai de 15 jours minimum)
- Prélèvements pré-opératoires :
 - Ponction intra articulaire
 - Biopsie synoviale
 - Prélèvements interdits : - écouvillon de cicatrice,
- prélèvement de fistule
- Prélèvements per-opératoires :
 - Entre 4 et 5 prélèvements tissulaires périprothétiques au niveau de zones macroscopiquement pathologiques
 - Acheminement dans un délai de moins de 2 heures au laboratoire

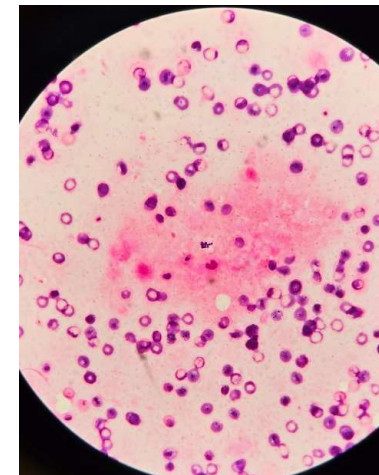
Diagnostic bactériologique



- Broyage mécanisé



- Examen microscopique



L'étape du « bead mill », une étape cruciale

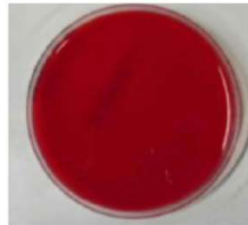
- Destruction du biofilm
- Détachement et relargage des bactéries
- Equilibre fragile entre forces de frottement et survie bactérienne
- Systèmes « maison » / systèmes commercialisés



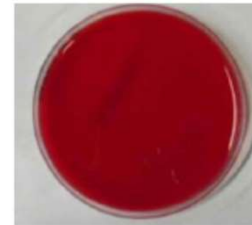
Diagnostic bactériologique



- Mise en culture



O₂



~~O₂~~



CO₂



➡ Incubation de 5 jours pour milieux gélosés et 14 jours minimum pour milieu liquide.

Critères d'interprétation des résultats

	SPILF 2009		MSIS 2018		IDSA 2013		ICM 2013	
	Critère majeur	Critère mineur	Critère majeur	Critère mineur	Critère majeur	Critère mineur	Critère majeur	Critère mineur
1 prélèvement positif: bactérie réputée pathogène	X		X		X		X	
≥ 2 prélèvements positifs: bactérie réputée pathogène	X		X		X		X	
1 prélèvement positif: bactérie commensale de la peau		X		X		X		X

Major criteria (at least one of the following)	Decision
Two positive cultures of the same organism	Infected
Sinus tract with evidence of communication to the joint or visualization of the prosthesis	

Intraoperative Diagnosis	Inconclusive pre-op score <u>or</u> dry tap ^a	Score	Decision
	Preoperative score	-	≥6 Infected
	Positive histology	3	4-5 Inconclusive ^b
	Positive purulence	3	
	Single positive culture	2	≤3 Not Infected


Preoperative Diagnosis	Minor Criteria		Score	Decision
	Serum	Elevated CRP <u>or</u> D-Dimer	2	≥6 Infected
		Elevated ESR	1	
	Synovial	Elevated synovial <i>WBC count</i> <u>or</u> <i>LE</i>	3	2-5 Possibly Infected ^a
		Positive alpha-defensin	3	
		Elevated synovial PMN (%)	2	
		Elevated synovial CRP	1	
			0-1 Not Infected	

(Parvizi, Journal of Arthroplasty, 2018)

Critères diagnostiques EBJIS

	Infection Unlikely (all findings negative)	Infection Likely (two positive findings) ^a	Infection Confirmed (any positive finding)
Clinical and blood workup			
Clinical features	Clear alternative reason for implant dysfunction (e.g. fracture, implant breakage, malposition, tumour)	1) Radiological signs of loosening within the first five years after implantation 2) Previous wound healing problems 3) History of recent fever or bacteraemia 4) Purulence around the prosthesis ^b	Sinus tract with evidence of communication to the joint or visualization of the prosthesis
C-reactive protein		> 10 mg/l (1 mg/dl) ^c	
Synovial fluid cytological analysis ^d			
Leukocyte count ^c (cells/ μ l)	$\leq 1,500$	> 1,500	>3,000
PMN (%) ^c	$\leq 65\%$	> 65%	> 80%
Synovial fluid biomarkers			
Alpha-defensin ^e			Positive immunoassay or lateral-flow assay ^a
Microbiology ^f			
Aspiration fluid		Positive culture	
Intraoperative (fluid and tissue)	All cultures negative	Single positive culture ^g	\geq two positive samples with the same microorganism
Sonication ^h (CFU/ml)	No growth	> 1 CFU/ml of any organism ^g	> 50 CFU/ml of any organism
Histology ^{c,i}			
High-power field (400x magnification)	Negative	Presence of \geq five neutrophils in a single HPF	Presence of \geq five neutrophils in \geq five HPF
			Presence of visible microorganisms
Others			
Nuclear imaging	Negative three-phase isotope bone scan ^c	Positive WBC scintigraphy ⁱ	

(Mcnally, Bone joint J, 2021)



Ajout de
techniques
complémentaires

La sonication

La sonication : tous dans le même bain?

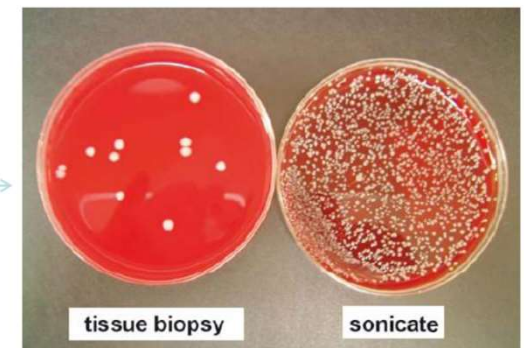
The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Sonication of Removed Hip and Knee Prostheses for Diagnosis of Infection

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

- Sonication du matériel (plaques, clous, vis)
 - ✓ Résultats contradictoires selon les études mais peut être utile en plus de la culture des broyats
 - ✓ Sensibilité : 67 à 94% / Spécificité : 90 à 100%
 - ✓ Seuil de 50 CFU/ml
 - ✓ Logistique +++
 - ✓ Risque élevé de contamination

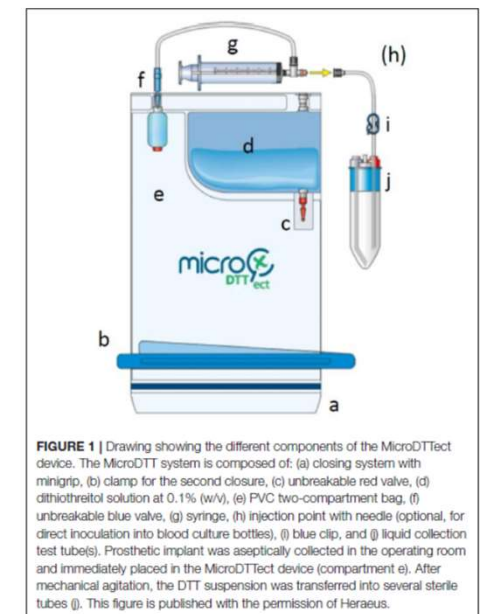


Sonication ^h (CFU/ml)	No growth	> 1 CFU/ml of any organism ^g	> 50 CFU/ml of any organism
----------------------------------	-----------	---	-----------------------------


Experience With the Use of the MicroDTTect Device for the Diagnosis of Low-Grade Chronic Prosthetic Joint Infections in a Routine Setting

Camille Kolenda^{1,2,3}, Jérôme Josse^{1,2}, Cécile Batailler^{2,4}, Allison Faure¹, Alice Monteix³, Sébastien Lustig^{2,4}, Tristan Ferry^{1,2,5}, Frédéric Laurent^{1,2,3} and Céline Dupieux^{1,2,3*}
on behalf of the Lyon Bone and Joint Infection Study Group

- Utilisation des propriétés chimiques du dithiothreitol → action sur le biofilm
- Remplacement de la sonication avec système commercial
- Etude sur 20 patients:
 - ✓ Réduction du délai de détection
 - ✓ Sensibilité améliorée
 - ✓ Problèmes de contamination



(Kolenda, Front M., 2021)



Ajout de
techniques
complémentaires

Les biomarqueurs

Les biomarqueurs sériques et synoviaux : une aide précieuse dans le diagnostic?

Major criteria (at least one of the following)	Decision
Two positive cultures of the same organism	Infected
Sinus tract with evidence of communication to the joint or visualization of the prosthesis	

Preoperative Diagnosis	Minor Criteria		Score	Decision ≥6 Infected 2-5 Possibly Infected ^a 0-1 Not Infected
	Serum	Elevated CRP <u>or</u> D-Dimer	2	
		Elevated ESR	1	
	Synovial	Elevated synovial WBC count <u>or</u> LE	3	
		Positive alpha-defensin	3	
		Elevated synovial PMN (%)	2	
		Elevated synovial CRP	1	

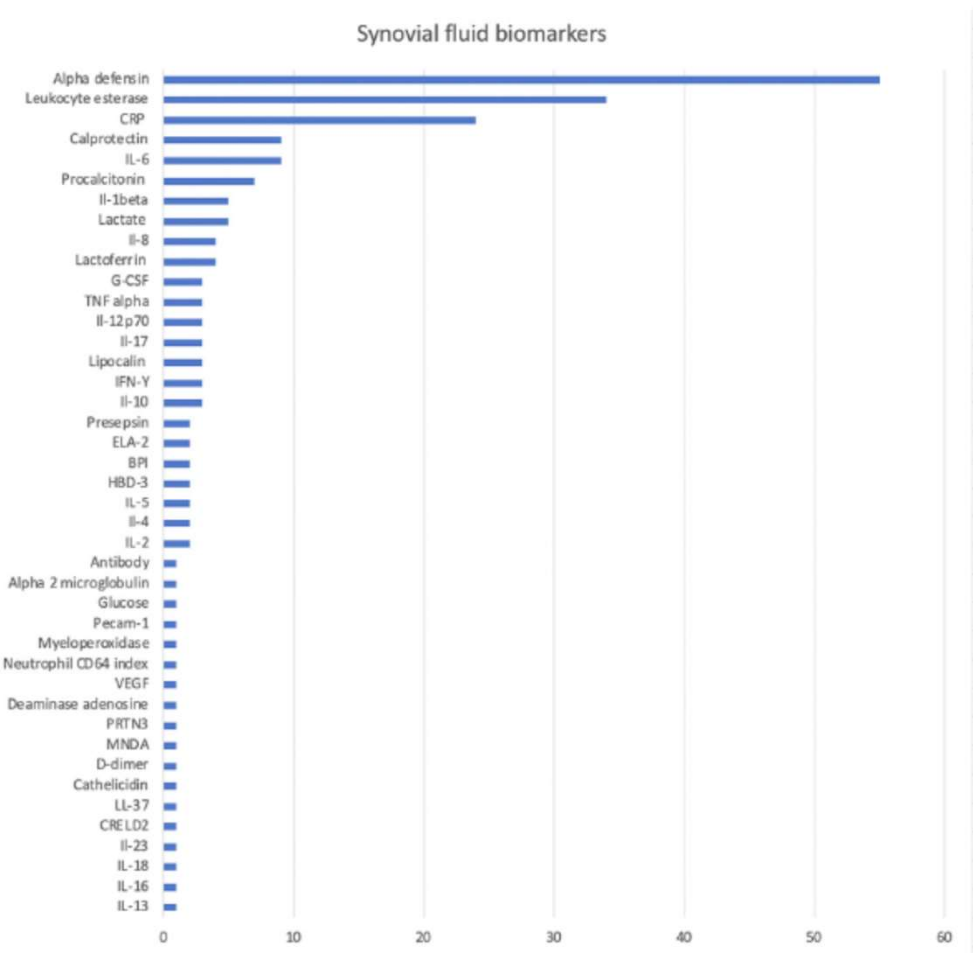
Intraoperative Diagnosis	Inconclusive pre-op score <u>or</u> dry tap ^a	Score	Decision ≥6 Infected 4-5 Inconclusive ^b ≤3 Not Infected
	Preoperative score	-	
	Positive histology	3	
	Positive purulence	3	
	Single positive culture	2	

(Parvizi, Journal of Arthroplasty, 2018)

Synovial fluid biomarkers			
Alpha-defensin ^a			Positive immunoassay or lateral-flow assay ^a

(McNally, Bone joint J, 2021)

Les biomarqueurs synoviaux



Supplemental Fig. 1. The 43 potential synovial fluid biomarkers found in the search and their frequency.

Systematic Review and Meta-Analysis

Synovial Fluid Biomarkers for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection—A Systematic Review and Meta-Analysis of Their Diagnostic Accuracy According to Different Definitions

João S. Vale, MD ^{a,*}, Filipe S. Castelo, MD ^b, Bianca S. Barros, MD ^a, Ana C. Ribau, MD ^a, André D. Carvalho, MD ^a, Ricardo J.G. Sousa, MD, PhD ^{a,c}

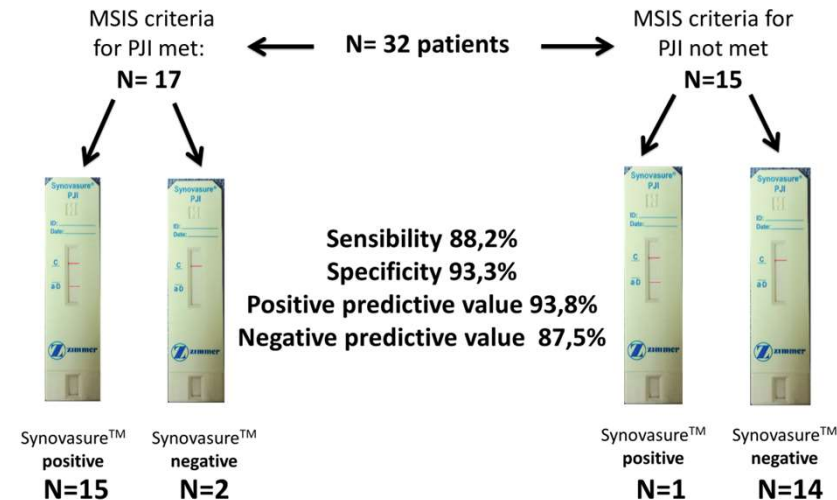
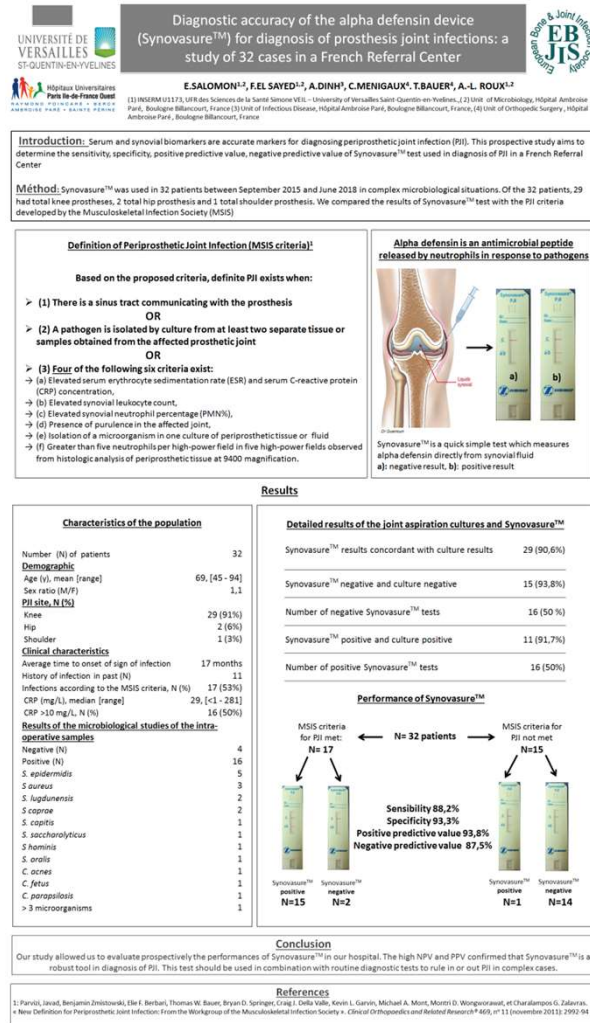
Table 1
List of Sensitivity and Specificity for Diagnostic Tests.

Synovial Fluid Biomarkers	Sensitivity*	Specificity*
Alpha-defensin (lateral flow test)	0.859 (0.818, 0.892)	0.931 (0.906, 0.949)
Alpha-defensin (ELISA)	0.869 (0.815, 0.909)	0.947 (0.924, 0.963)
CRP	0.860 (0.823, 0.890)	0.903 (0.861, 0.934)
LE (+1)	0.853 (0.800, 0.894)	0.912 (0.877, 0.937)
LE (+2)	0.780 (0.689, 0.850)	0.948 (0.925, 0.964)
Calprotectin	0.923 (0.840, 0.965)	0.945 (0.865, 0.979)

CRP, C-reactive protein; LE, leukocyte esterase; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

* Overall sensitivity and specificity of biomarkers regardless of the definition used.

Alpha-défensine : Etude prospective CRIOAc Ambroise Paré



CRP + calprotectine synoviales

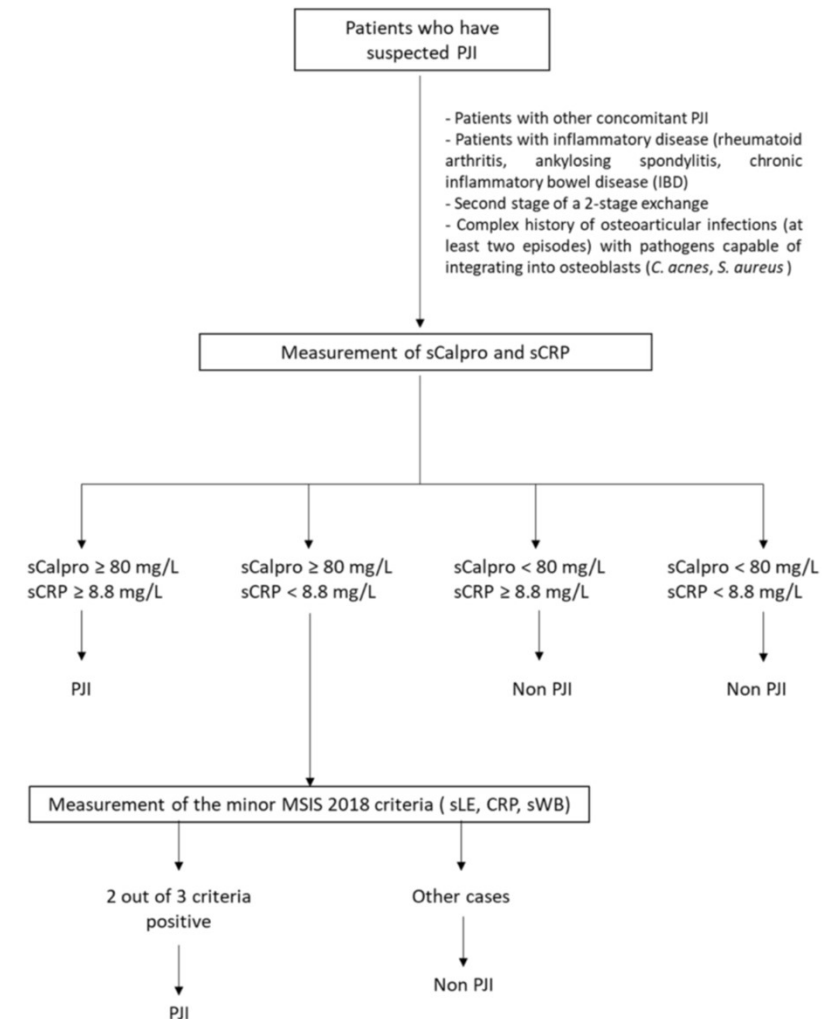
Synovial Biomarkers C-Reactive Protein and Calprotectin for Diagnosing Chronic Periprosthetic Joint Infection: A Prospective Multicenter Evaluation


Louise Ruffier d'Epenoux, PharmD ^{a, b, c}, Manon Robert, PharmD ^d,
Raphaël Lecomte, MD ^{c, e, f}, Christophe Nich, MD, PhD ^{c, g, h}, Pascale Bémer, MD ^a,
Stéphane Corvec, PharmD, PhD ^{a, b, c, i, *}, on behalf the CRIOGO/CALPROS Study group¹

- Etude CRIOGO : 98 patients inclus (52 infectés / 46 non infectés)
- dosage CRP synoviale + calprotectine synoviale + Leucocyte estérase

Table 2
Diagnostic Accuracy of Synovial Calprotectin, C-Reactive Protein, and Leukocyte Esterase.

Test	Cutoff Value	Sensitivity %	Specificity %
Calprotectin	50 mg/L	94.23% (95% CI 84.3 to 98.4)	78.26% (95% CI 64.4 to 87.7)
Calprotectin	80 mg/L	94.23% (95% CI 84.3 to 98.4)	84.78% (95% CI 71.8 to 92.4)
CRP	8.8 mg/L	80.77% (95% CI 68.1 to 89.2)	86.96% (95% CI 74.3 to 93.9)
Leukocyte esterase	2+	67.4% (95% CI 53.4 to 78.8)	92.50% (95% CI 80.1 to 97.4)





Ajout de
techniques
complémentaires

La biologie moléculaire sous toutes ses
formes

Les PCR spécifiques

- PCR *S. aureus*

- Tests commerciaux unitaires et en plaque
- Détection ADN *S. aureus* + sensibilité à la méticilline (détection gène *SpA* – *Sccmec* – *mecA* / *mecC*)
- Rapidité du rendu ~ 1h
- Sensibilité 85,4 - 100% / Spécificité 91,2 - 100% avec une très bonne VPN → possibilité d'adapter l'antibiothérapie probabiliste?
- Détection résistance à la méticilline pour SCN

- PCR *K. kingae*

- PCR maison et commercialisée en plaque
- Détection gènes *cpn60* / *Rtx* / *groEL*
- Indications chez l'enfant < 4 ans



La PCR 16S : outil obsolète?

Extraction → Amplification → Séquençage

- ✓ PCR 16S rRNA → sensibilité : 50 à 92% / spécificité : 65 à 94%

Avantage :

- ✓ sans « a priori »

Inconvénients :

- ✓ Peu automatisé
- ✓ Prélèvements polymicrobiens
- ✓ Délai de rendu min 2-3 jours
- ✓ Pas de réponse pour la sensibilité aux antibiotiques

→ en complément des techniques conventionnelles de culture

Les PCR multiplex



- Tests commerciaux (Unyvero ITI, Biofire BJI Filmarray)
 - Panels +/- complets (bactérien – fongique – résistance)
- Tests unitaires validés sur liquide synovial ou biopsie osseuse
- Performances variables selon les kits et les études
- Manque de sensibilité quand faible inoculum
- Coût ++ (150 - 300€) – délai de rendu (1h-5h)

Cibles manquantes :
S. epidermidis
C. acnes
Staphylococcus spp.
Corynebacterium spp.

BACTERIES A GRAM POSITIF	BACTERIES A GRAM NEGATIF	GENES DE RESISTANCE
Aérobies <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus lugdunensis</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Aérobies <i>Kingella kingae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus spp.</i> <i>Salmonella spp.</i> Groupe <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Citrobacter</i> Complexe <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Résistance à la méticilline <i>mecA/C</i> et <i>MREJ</i> Résistance à la vancomycine <i>vanA/B</i> BLSE <i>CTX-M</i> Carbapénémases <i>OXA48-like</i> <i>KPC</i> <i>NDM</i> <i>VIM</i> <i>IMP</i>
Anaérobies <i>Anaerococcus prevotii/vaginalis</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Cutibacterium avidum/granulosum</i> <i>Finegoldia magna</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Peptoniphilus</i> <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	Anaérobies <i>Bacteroides fragilis</i>	
	LEVURES	
	<i>Candida spp.</i> <i>Candida albicans</i>	

La métagénomique

- Avantages :
 - ✓ sans « a priori »

Identification of Prosthetic Joint Infection Pathogens Using a Shotgun Metagenomics Approach

Matthew J. Thoendel,¹ Patricio R. Jeraldo,² Kerryl E. Greenwood-Quaintance,³ Janet Z. Yao,² Nicholas Chia,² Arlen D. Hanssen,⁴ Matthew P. Abdel,⁴ and Robin Patel^{1,3}

¹Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, ²Department of Surgery, ³Division of Clinical Microbiology, Department of Laboratory Medicine and Pathology, and ⁴Department of Orthopedic Surgery, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota

Table 2. Performance of Metagenomic Shotgun Sequencing Versus Sonicate Fluid Culture

Case Classification	Samples, No.	Identical Findings	Organisms Not Identified by Metagenomics	New Organisms Detected by Metagenomics
Aseptic failure	195	188 (96.4)	NA	7 (3.6)
Culture-positive PJI	115	99 (86.1)	6 (5.2)	11 (9.6)
Culture-negative PJI	98	55 (56.1)	NA	43 (43.9)

Abbreviations: NA, not applicable; PJI, prosthetic joint infection.

Data are the No. (%) of samples in which identical findings or discrepant findings between sonicate fluid culture and metagenomic sequencing were observed.

- Couture (équipement spécialisé)
- ✓ Contamination par ADN humain
- ✓ Expertise en bioinformatique
- ✓ Bruit de fond avec ADN bactérien → détermination d'un seuil



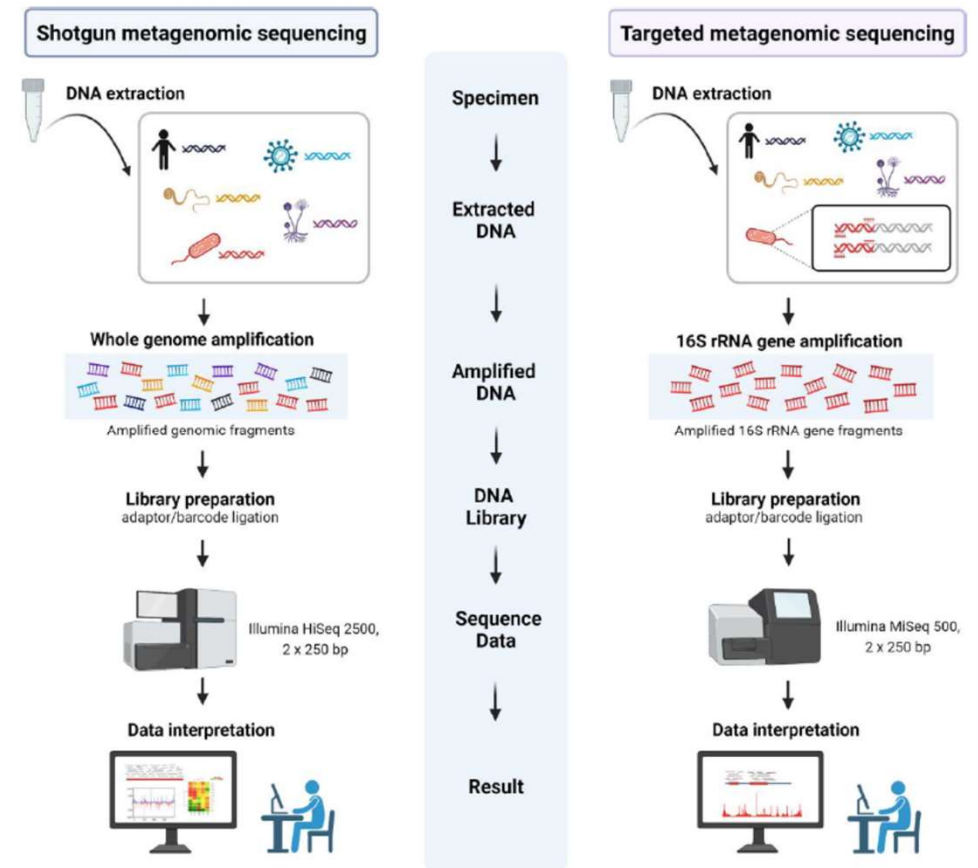
La métagénomique ciblée

Targeted Versus Shotgun Metagenomic Sequencing-based Detection of Microorganisms in Sonicate Fluid for Periprosthetic Joint Infection Diagnosis

Hyo-Lim Hong,^{1,2} Laure Flurin,^{1,3} Matthew J. Thoendel,⁴ Matthew J. Wolf,¹ Matthew P. Abdel,⁵ Kerry E. Greenwood-Quaintance,¹ and Robin Patel^{1,4,6}

¹Department of Laboratory Medicine and Pathology, Division of Clinical Microbiology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA; ²Department of Internal Medicine, Daegu Catholic University School of Medicine, Daegu, Republic of Korea; ³Department of Intensive Care, University Hospital of Guadeloupe, Pointe-à-Pitre, France; ⁴Division of Public Health, Infectious Diseases, and Occupational

- Analyse plus simple
- Délai de rendu plus court
- Taux de contamination moins important
- Résultats équivalents à la métagénomique shotgun



Apport des outils moléculaires au laboratoire pour affiner le diagnostic microbiologique des IOAs à *C. acnes*

❖ La collection (2010-2015)

- ❖ 108 isolats de *C. acnes*
- ❖ 34 cas d'IMOA monomicrobiennes

❖ Technique de typage moléculaire de référence

- ❖ Multi Locus Sequence Typing ou MLST

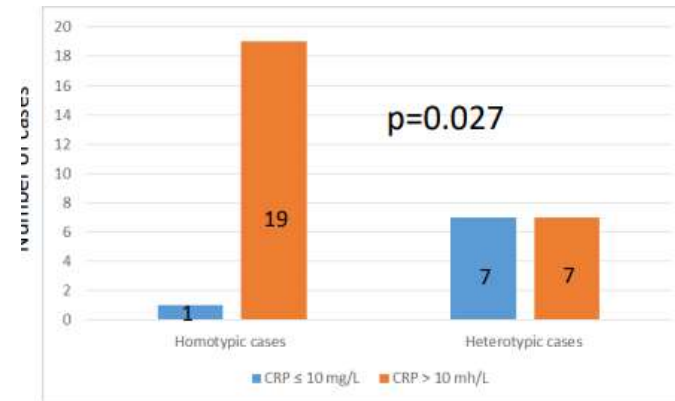
❖ Résultats

- ❖ 60% impliquaient un ST ou type = **homotypiques**
- ❖ 40% impliquaient plusieurs STs ou types = **hétérotypiques**

[Clin Infect Dis.](#) 2019 May 17;68(11):1942-1945. doi: 10.1093/cid/ciy952.

Molecular Typing of Multiple Isolates Is Essential to Diagnose Cutibacterium acnes Orthopedic Device-related Infection.

[El Sayed F](#)^{1,2}, [Roux AL](#)^{1,2}, [Sapriel G](#)^{3,4}, [Salomon E](#)^{1,2}, [Bauer T](#)^{3,5}, [Gaillard JL](#)^{1,2}, [Rottman M](#)^{2,6}.



Apport des outils moléculaires au laboratoire pour affiner le diagnostic microbiologique des IOAs à *C. acnes*

- Single Locus Sequence Typing ou SLST
- Sur la même collection (2010-2015)
- MLST vs SLST

SLST \ MLST	Cas homotypiques	Cas hétérotypiques
	Cas homotypiques	Cas hétérotypiques
Cas homotypiques	20	8
Cas hétérotypiques	0	6

14/34 (41%) cas « hétérotypiques » par MLST vs 6/34 (17,6%) par SLST

Résultats Dr F. El Sayed

Cas clinique n°1

Homme de 60 ans, pose de PTE en Mai 2022

1) Douleurs mécaniques, luxations itératives

- CRP = 20 mg/L
- Synovectomie avec changement des pièces mobiles (Août 2022)
- 4/5 prélèvements positifs à *C. acnes*
- Traitement : amoxicilline + rifampicine 3 mois

Infection PTE

Cas clinique n°1

Homme de 60 ans, pose de PTE en Mai 2022

1) Douleurs mécaniques, luxations itératives

- CRP = 20 mg/L
- Synovectomie avec changement des pièces mobiles (Août 2022)
- 4/5 prélèvements positifs à *C. acnes*
- Traitement : amoxicilline + rifampicine 3 mois

Isolat 1= D1
Isolat 2 = K2
Isolat 3 = K1
Isolat 4 = H1

~~Infection PTE~~

problème mécanique non septique ?

Cas clinique n°2

Homme de 68 ans, pose de PTE en décembre 2017

1) 1 mois plus tard : cicatrice inflammatoire

- CRP = 36 mg/L
- Synovectomie
- 4/5 prélèvements positifs à *C. acnes*
- Traitement : amoxicilline + rifampicine

2) 11 mois plus tard : douleurs mécaniques et instabilité PTE

- CRP = 4 mg/L
- Changement de prothèse
- 2/5 prélèvements positifs à *C. acnes*
- Traitement : amoxicilline + rifampicine

Réinfection ? Récidive ? Contamination?

Cas clinique n°2

Homme de 68 ans, pose de PTE en décembre 2017

1) 1 mois plus tard : cicatrice inflammatoire

- CRP = 36 mg/L
- Synovectomie
- 4/5 prélèvements positifs à *C. acnes*
- Traitement : amoxicilline + rifampicine

4 isolats = A1

2) 11 mois plus tard : douleurs mécaniques et instabilité PTE

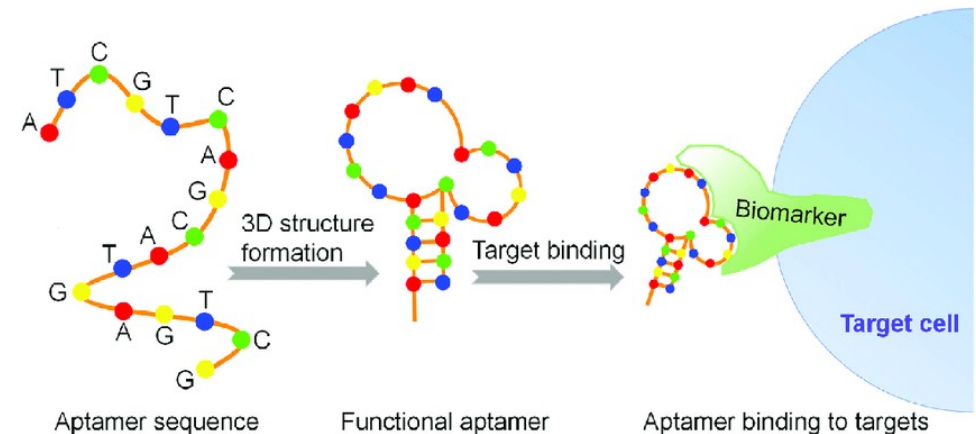
- CRP = 4 mg/L
- Changement de prothèse
- 2/5 prélèvements positifs à *C. acnes*
- Traitement : amoxicilline + rifampicine

2 isolats = D1

Réinfection

A venir : les aptamères

- ✓ Courtes séquences d'ADN, ARN ou peptide
- ✓ Se lie spécifiquement à une cible (protéine, cellule, toxine, etc.)
- ✓ Sélectionnés *in vitro* via SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)
- ✓ Alternative synthétique aux anticorps :
 - Stabilité élevée
 - Faible coût de production
 - Haute affinité et spécificité



Les applications possibles dans les IOA



Diagnostic rapide :

- Détection directe de pathogènes dans le liquide synovial (*S. aureus*, *S. epidermidis*)



Différenciation ciblée :

- Identification de souches multirésistantes (ex. SARM)
- Outils multiplex pour plusieurs agents infectieux



Recherche & traitement :

- Étude du biofilm bactérien sur implants
- Blocage de l'adhésion bactérienne
- Distribution ciblée d'antibiotiques ou d'agents antimicrobiens

Take home messages

- Diagnostic IOA = diagnostic difficile → intérêt des réunions de concertation multidisciplinaire ou recours CRIOAc
- Culture = Gold Standard → optimisation
 - Recommandation de 4-6 prélèvements profonds
 - Traitement des prélèvements sous hotte de type PSM2
 - Broyage des prélèvements pour permettre la libération des bactéries de la matrice osseuse et du biofilm
 - Ensemencement de milieux liquides enrichis en aérobiose et en anaérobiose
 - Conservation des cultures au minimum 14 jours
 - Intérêt de la sonication?
- Apport de nouveaux tests diagnostiques **en complément**
 - Biomarqueurs synoviaux
 - Biologie moléculaire sous toutes ses formes
 - Nouveaux outils?

moléculaire
Diagnostic Broyage
Sonication
articulaires
PTH Culture PTG
Infections
Matériel
Biomarqueur
outil **PCR** Merci
Biologie