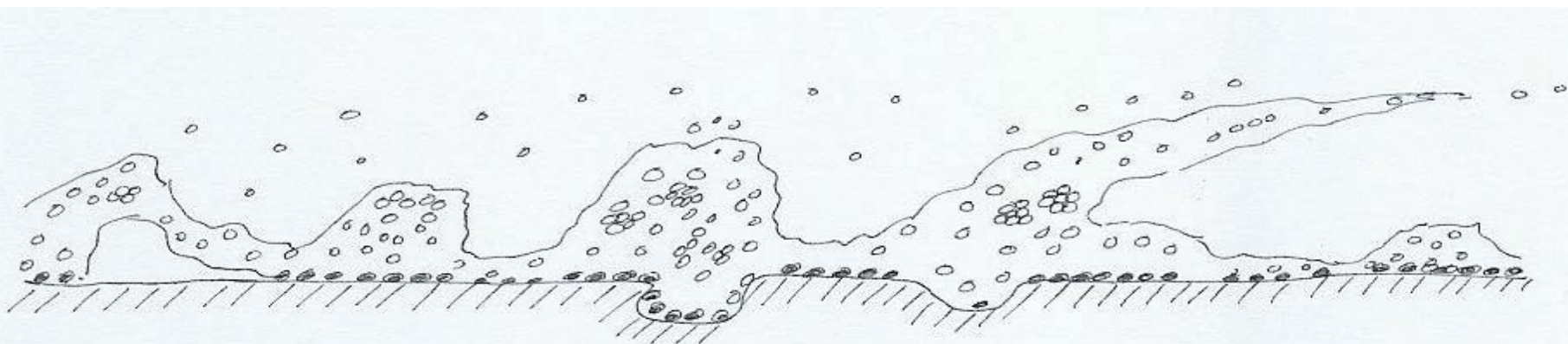


Infections sur prothèses articulaires

Biofilm : pathogénie et conséquences diagnostiques et thérapeutiques

Nicole DESPLACES
Centre de Référence des
Infections Ostéo-articulaires
GH Diaconesses Croix Saint Simon PARIS - France

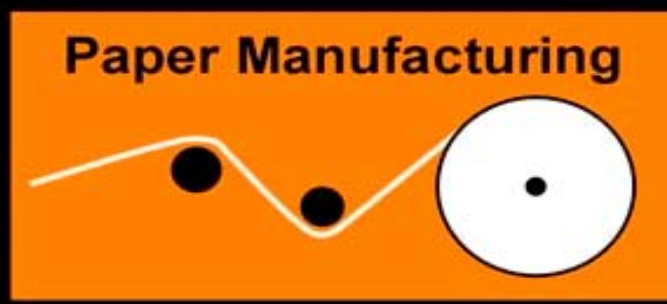
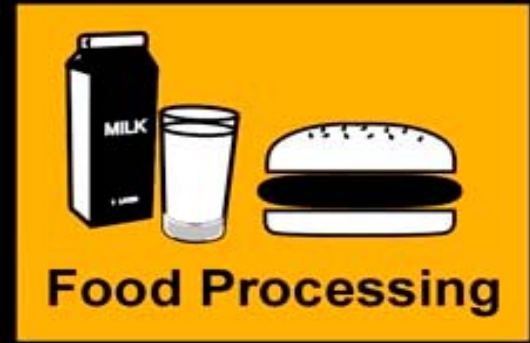
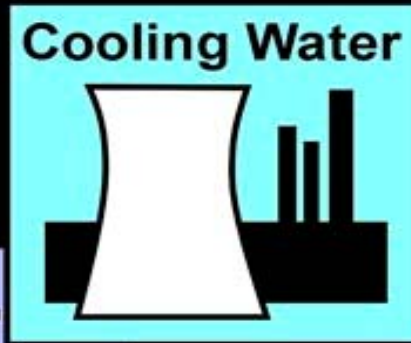


XXIe congrès STPI 21-23 avril 2011. Tunis

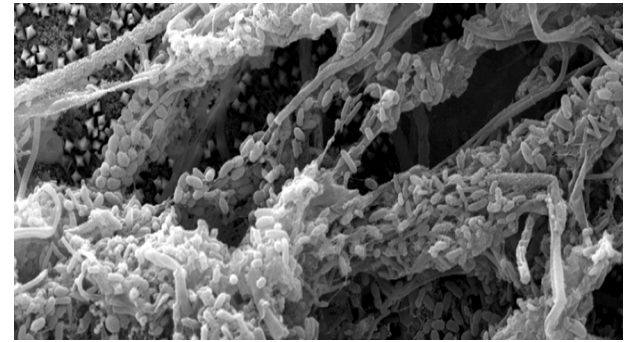
Biofilm : mécanisme universel de survie des bactéries

Importance dans les industries et dans le monde de la santé

Biofilms Impact . . .



Qu'est ce qu'un biofilm ?

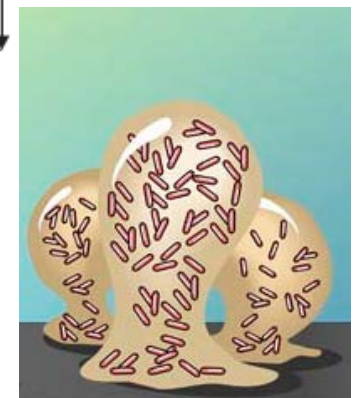
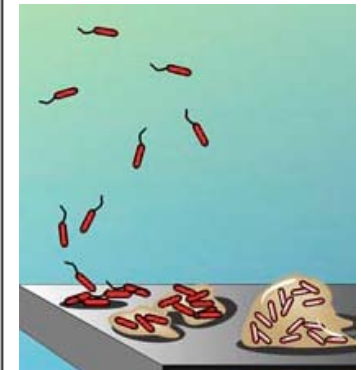
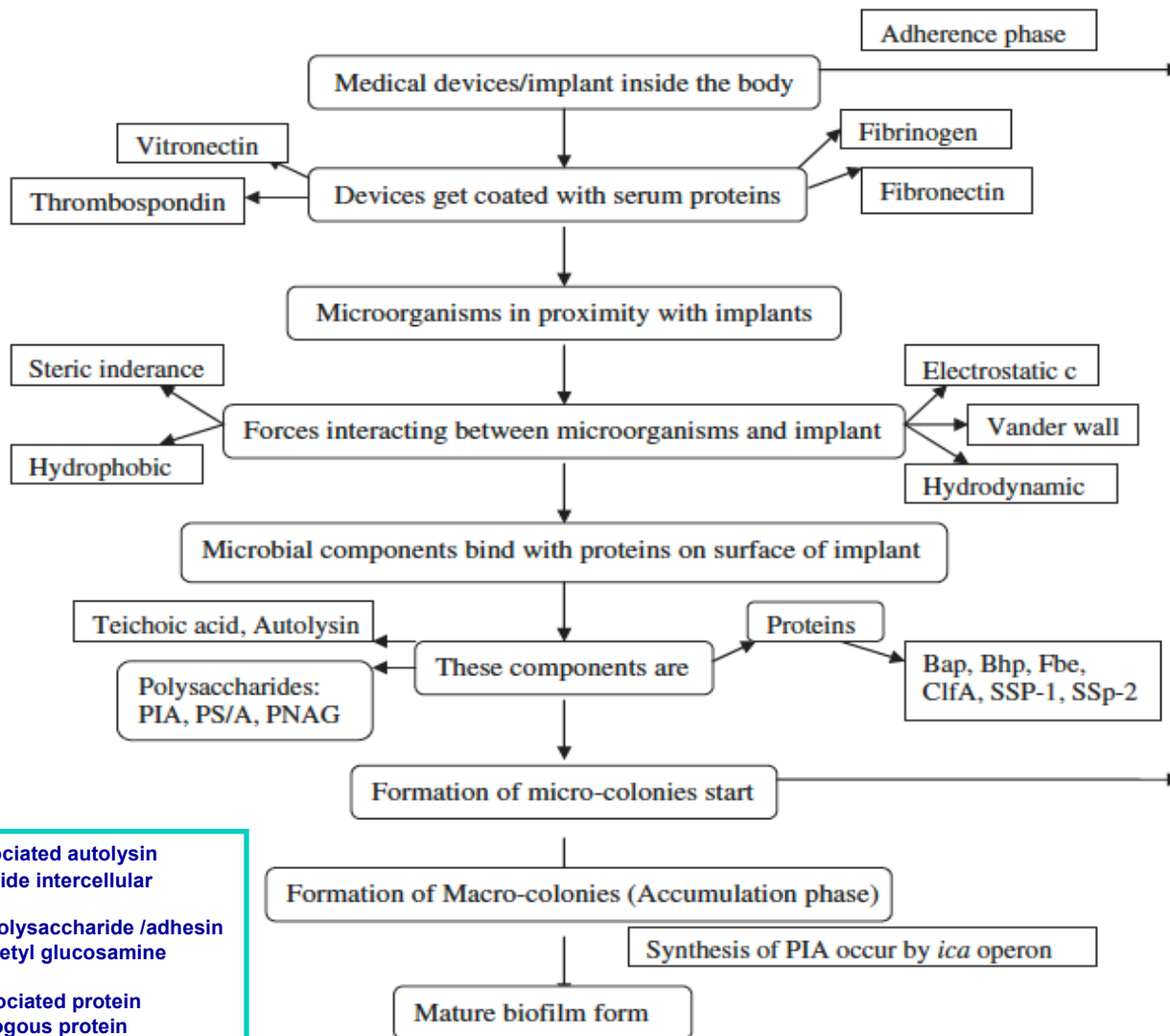


- Communauté de micro-organismes "sessiles"
- Attachés irréversiblement sur une surface vivante ou inanimée
- Englués dans une substance collante, visqueuse : biofilm
- Constitué d'exopolysaccharides bactériens, de substances exogènes de l'environnement local (protéines, acides nucléiques, minéraux, nutriments ...)
- Epaisseur variable
- Architecture complexe des biofilms avec des microcolonies, des réseaux de canaux, un système de communication très sophistiqué
- Protection contre l'élimination (mécanique ou immunitaire)
- **Impliqué dans 80% des infections humaines**

Biofilm

- Stratification bactérienne
- Bactéries anciennes adhérentes au support, dormantes
- Bactéries prisonnières du biofilm, conditions hostiles, croissance ralentie
- **Résistance aux antibiotiques par 3 mécanismes :**
 - Effet barrière du biofilm
 - Ralentissement de la croissance des bactéries sessiles)
 - Conditions hostiles (anaérobiose, pH acide, cations divalents, ...)
- **Bactéries planctoniques, libres, sont celles qu'on cultive**

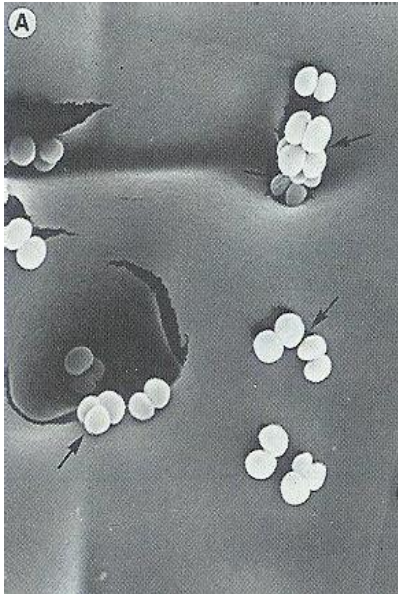
Formation du biofilm



Atl = Surface-associated autolysin
PIA = polysaccharide intercellular adhesin
PS/A = capsular polysaccharide /adhesin
PNAG = poly N Acetyl glucosamine

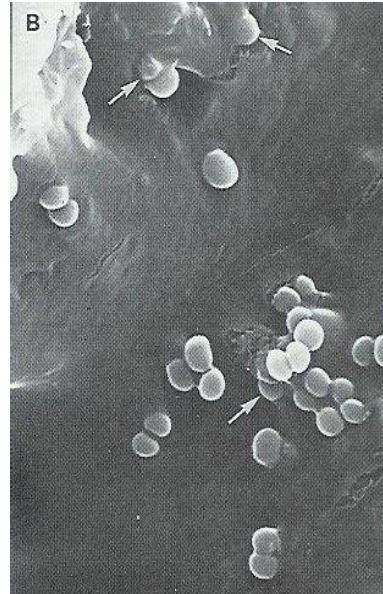
Bap = Biofilm associated protein
Bhp = Bap homologous protein
Fbe = Fibronectine
ClfA = Clumping factor A (*S. aureus*)
SSP-1 = Staphylococcal surface proteins
AAP = Accumated associated proteins

Colonisation du matériel par SCN



2 h

**Fixation des staph
sur des irrégularités
à la surface du
matériel**



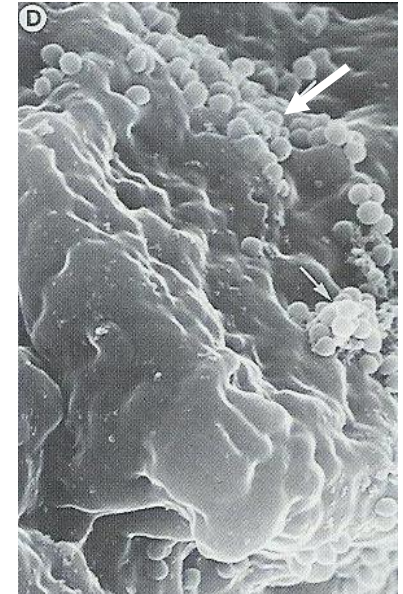
4 h

**Début de
fabrication du
"slime "**



8 h

**La surface du
matériel est
recouverte par une
couche épaisse de
"slime"**



24 h

**Des bactéries
émergent du
biofilm, libres et
prêtes à se fixer
ailleurs**

Microphotographies Olson, Ruseska, Costerton J. Biomed Mater Res 1988

Biofilm de *S. epidermidis*

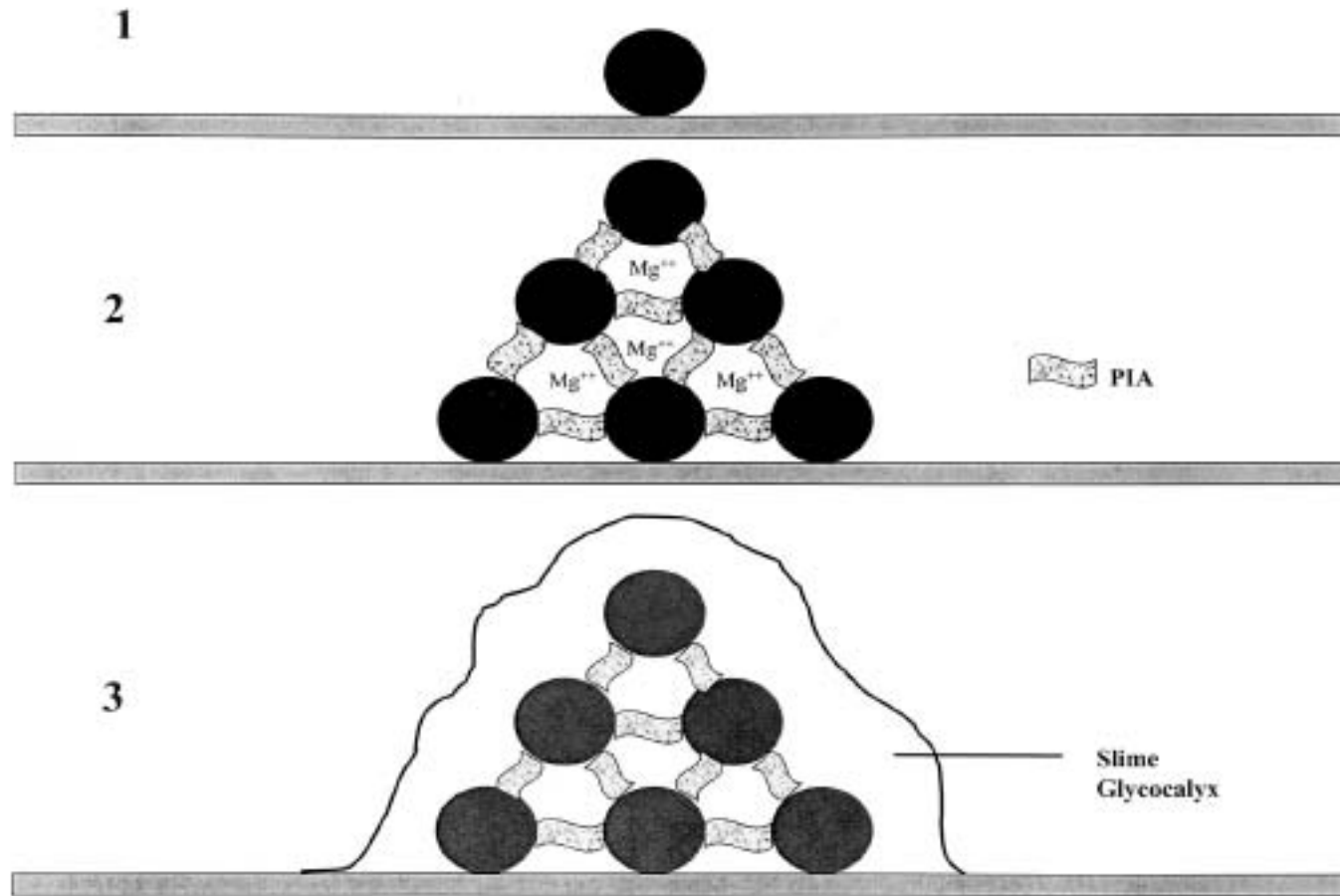


FIG. 3. Schematic representation of biofilm formation by *S. epidermidis*. Primary adhesion (step 1) of individual cells to a surface is influenced by physical interactions (hydrophobic, electrostatic), which in turn might be influenced by cell surface adhesions. Cellular aggregation (step 2) is mediated by polysaccharide intercellular adhesin (PIA), the gene product of the *icaADBC* gene cluster, and (speculatively) other factors, such as divalent cations. The final phase (step 3) is characterized by the generation of a slime exopolysaccharide that encases surface-bound organisms in a gelatinous matrix but is not essential to biofilm development.

Au sein du biofilm

Communication des bactéries entre elles "*Quorum sensing*" grâce à des **petites molécules** "auto-inducteurs" et à des "recepteurs" pour synchroniser la transcription ou la répression de certains gènes

Modifications bactériennes

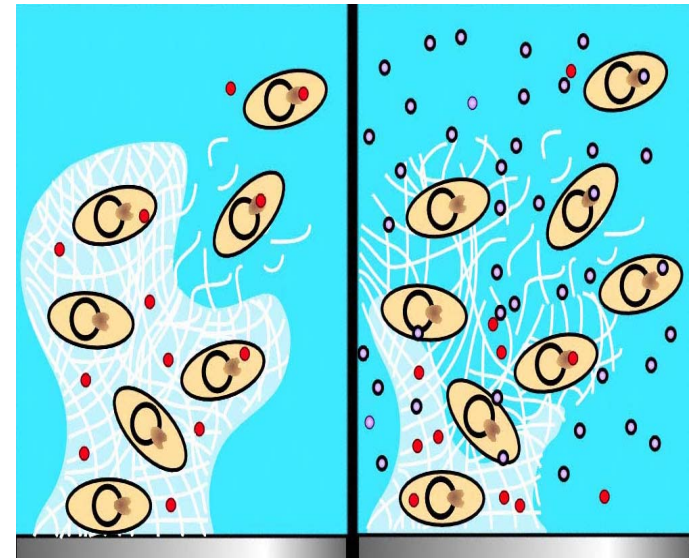
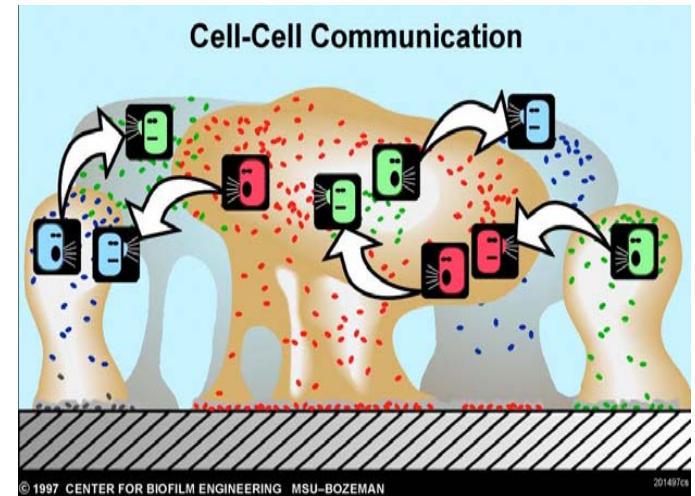
- de la paroi ,
- du métabolisme
- adoption d'un phénotype génétiquement programmé pour faciliter la croissance sur un support (pili) ou pour le libérer (flagelles)
- bactéries dormantes profondes

Perturbe l'activité des AB

Impénétrable aux anticorps, aux phagocytes ("frustrated phagocytosis")

Libération des bactéries des couches superficielles

Extension de l'infection



Biofilm de *P. aeruginosa*

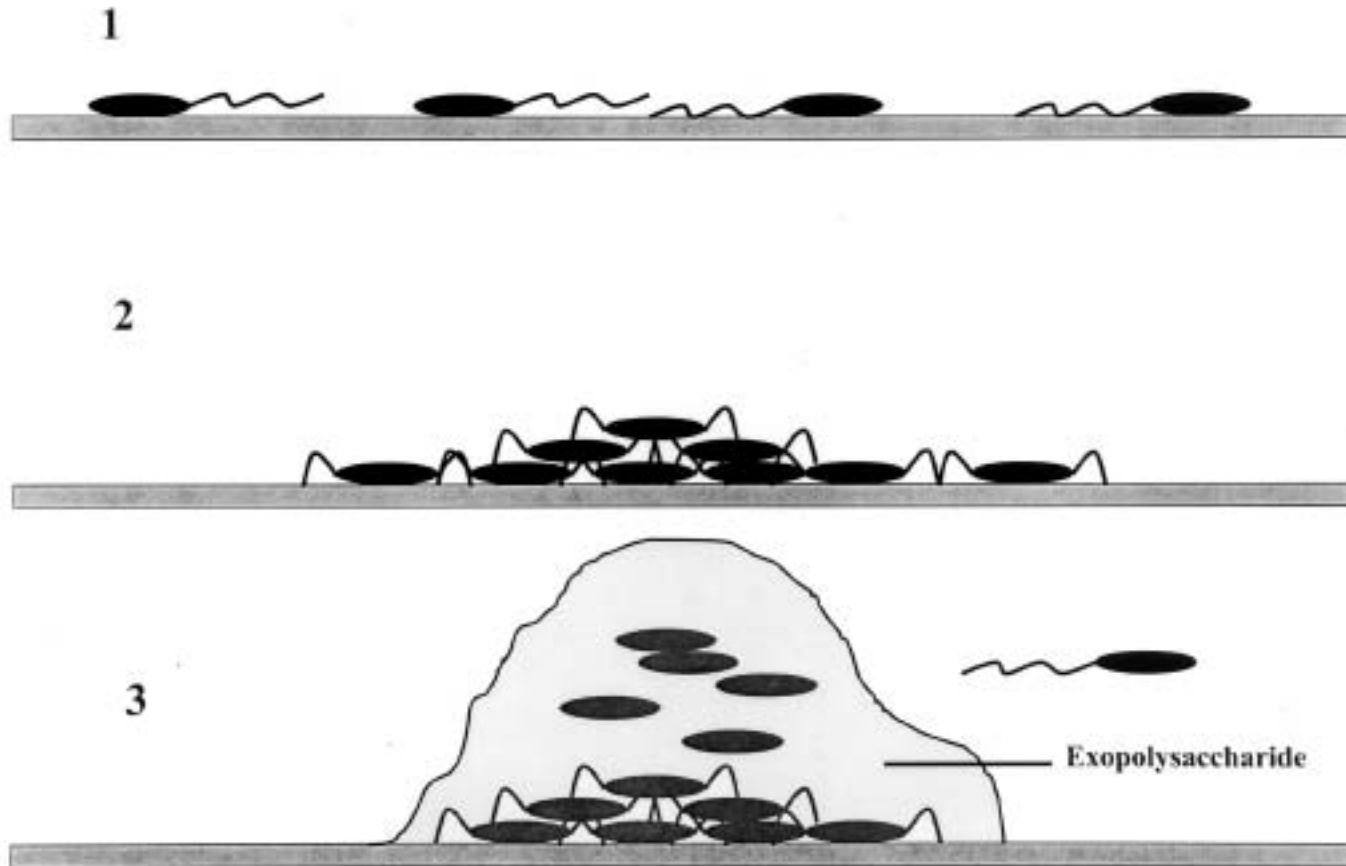
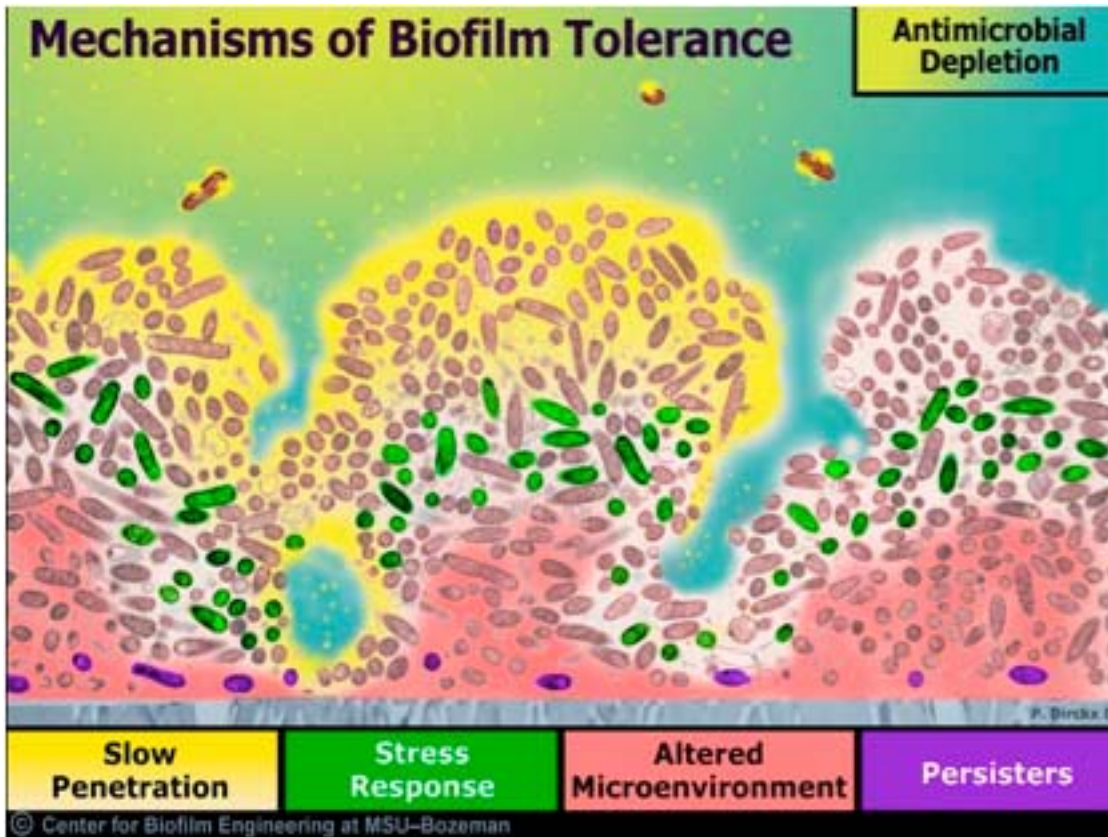


FIG. 4. Schematic representation of biofilm formation by *P. aeruginosa*. Step 1 represents the primary adhesion of individual cells to a targeted surface that is dependent on motility, i.e., the production of functional flagella. The aggregation phase (step 2) of biofilm development requires the synthesis of type IV pili, which allow the cells to migrate across a surface and congregate in microcolonies. The final phase (step 3) of biofilm development by *P. aeruginosa* calls for the elaboration of an alginic acid-like exopolysaccharide by the *algACD* gene cluster. Cells near the outer surface can dislodge from the biofilm and escape to colonize new microenvironments.

Activité des antibiotiques



Si CMB = 1
sur bactéries libres

CMB x 10 à 1000
Sur les bactéries du
biofilm

Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Isolated from Orthopedic Implants following Revision Hip Surgery

MICHAEL M. TUNNEY,^{1,2} GORDON RAMAGE,¹ SHEILA PATRICK,¹ JAMES R. NIXON,³
PHILIP G. MURPHY,⁴ AND SEAN P. GORMAN^{2*}

TABLE 1. Antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from orthopedic implants

Isolate (no. of strains tested)	Test agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			% Susceptible	MBC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	50%	90%		Range	50%	90%
All (49)	Gentamicin	<0.5–512	8	64		1–>1,024	32	1,024
	Cefamandole	<0.5–64	1	32		<0.5–>1,024	1	64
	Cefotaxime	<0.5–64	2	16		<0.5–>1,024	64	512
	Erythromycin	<0.5–>1,024	16	>1,024		<0.5–>1,024	256	>1,024
	Vancomycin	0.25–2	1	2		1–64	32	64
	Ciprofloxacin	0.125–2	0.5	1		0.125–64	8	32
	Fusidic acid	<0.125–32	1	8		1–>256	16	>256
<i>Staphylococcus</i> spp. (30)	Gentamicin	<0.5–512	16	128	26	1–>1,024	32	1,024
	Cefamandole	<0.5–64	2	64	63	1–512	16	128
	Cefotaxime	<0.5–32	4	16	77	4–>1,024	128	1,024
	Erythromycin	<0.5–>1,024	256	>1,024	6	2–>1,024	>1,024	>1,024
	Vancomycin	0.25–2	1	2	100	1–64	32	64
	Ciprofloxacin	0.125–2	0.5	1	100	0.125–64	16	32
	Fusidic acid	<0.125–16	0.25	16	NA ^a	1–>256	64	>256
<i>P. acnes</i> (19)	Gentamicin	<0.5–16	4	8	NA	2–128	8	64
	Cefamandole	<0.5	<0.5	<0.5	100	<0.5–4	<0.5	1
	Cefotaxime	<0.5–1	<0.5	<0.5	100	<0.5–128	<0.5	2
	Erythromycin	<0.5–>1,024	<0.5	>1,024	NA	<0.5–>1,024	<0.5	>1,024
	Vancomycin	<0.125–1	0.5	0.5	NA	4–>256	8	32
	Ciprofloxacin	0.5–1	1	1	NA	1–128	8	32
	Fusidic acid	<0.125–8	1	2	NA	2–>256	16	32

^a NA, no MIC breakpoint approved by the National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Isolated from Orthopedic Implants following Revision Hip Surgery

MICHAEL M. TUNNEY,^{1,2} GORDON RAMAGE,¹ SHEILA PATRICK,¹ JAMES R. NIXON,³ PHILIP G. MURPHY,⁴ AND SEAN P. GORMAN^{2*}

TABLE 2. Antimicrobial susceptibilities of staphylococcal species isolated from orthopedic implants

Isolate (no. of strains tested)	Test agent	MIC (µg/ml)			MBC (µg/ml)		
		Range	50%	90%	Range	50%	90%
<i>S. epidermidis</i> (17)	Gentamicin	<0.5–512	16	256	1–>1,024	128	>1,024
	Cefamandole	<0.5–64	4	32	1–512	16	64
	Cefotaxime	<0.5–32	4	16	4–>1,024	128	512
	Erythromycin	<0.5–>1,024	>1,024	>1,024	2–>1,024	>1,024	>1,024
	Vancomycin	1–2	2	2	8–64	16	64
	Ciprofloxacin	0.25–1	0.5	1	0.5–64	16	32
	Fusidic acid	<0.125–16	0.5	16	1–>256	>256	>256
	<i>S. aureus</i> (4)	Gentamicin	16–32			16–32	
Cefamandole		32			64–512		
Cefotaxime		2–4			256–>1,024		
Erythromycin		2–16			2–>1,024		
Vancomycin		0.5–1			16–32		
Ciprofloxacin		0.5–1			1–32		
Fusidic acid		<0.125–0.25			16–128		
<i>S. hominis</i> (3)	Gentamicin	<0.5–32			2–64		
	Cefamandole	1–64			1–>1,024		
	Cefotaxime	2–4			64–>1,024		
	Erythromycin	128–>1,024			1,024–>1,024		
	Vancomycin	1			16–32		
	Ciprofloxacin	0.25–2			0.25–32		
	Fusidic acid	0.25–32			4–>256		
<i>S. capitis</i> (2)	Gentamicin	<0.5–16			8–64		
	Cefamandole	1			1–16		
	Cefotaxime	2–4			128–512		
	Erythromycin	256			256–>1,024		
	Vancomycin	1			32		
	Ciprofloxacin	0.25			8–16		
	Fusidic acid	<0.125–0.25			32–64		

Actions sur le biofilm

- Plus il jeune plus il est facile à éliminer
- Mécanismes de résistance aux AB : multifactoriels
 - Matrice extracellulaire rôle de filtre
 - Ralentissement croissance bactérienne
 - Conditions locales défavorables à l'action des AB
 - Beaucoup de modèles *in vitro* pour évaluer l'activité des AB dans un biofilm, résultats pas toujours concordants
- Contrôle du biofilm :
 - Molécules qui bloquent le "quorum sensing" (ARN-III),
 - Ultra sons, courant électrique basse pression, lysostaphine, lactoferrine, streptokinase
 - Intérêt des associations d'AB comportant : rifampicine, minocycline, clarithromycine
 - Intérêt des associations d'AB comportant : tigécycline, daptomycine

Actions sur le biofilm

Phagothérapie avec phages génétiquement modifiés
(bactérie cible et enzyme dégradant le biofilm)

LU. PNAS 2007, July N° 104 (27) 11197-11202.



Fig. 1. Two-pronged attack strategy for biofilm removal with enzymatically active DspB-expressing T7_{DspB} phage. Initial infection of *E. coli* biofilm results in rapid multiplication of phage and expression of DspB. Both phage and DspB are released upon lysis, leading to subsequent infection as well as degradation of the crucial biofilm EPS component, β -1,6-*N*-acetyl-D-glucosamine (22).

Diagnostic bactériologique

Diagnostic microbiologique des IOA sur prothèses

- **Indispensable** pour traiter correctement ces infections aiguës ou chroniques.
- Facile si infection aiguë (si pas d'antibiotiques),
- **Souvent très difficile si infection chronique**
- Importance de
 - la qualité des prélèvements,
 - du transport et
 - des techniques utilisées au laboratoire
 - Ne pas contaminer les cultures
 - **Méthodes de culture ne sont pas standardisées**
"on ne trouve que ce qu'on cherche..."

Qualité des prélèvements +++

Prélèvements superficiels : à oublier

- Fistule, Pus sur la compresse, écouvillonnage de la cicatrice ...

PLUSIEURS prélèvements profonds dans le site de l'infection

- Liquide articulaire et lavages,
- Biopsies synoviales
- Prélèvements per-opératoires (tissus, os, matériels...)

Autres prélèvements

- Hémocultures si infection aiguë
- Liquides de drainage pour la surveillance du site infecté opéré.

Prélever est un geste médical

Qualité du transport

- **Ponction**

- Seringue bouchée à θ ° ambiante
- Flacons d'hémoculture à 37°C
- Tubes hépariné.

Pas de transvasement dans un pot

- **Prélèvements per-opératoires**

- Pots stériles spéciaux prévus pour cet usage, vendus sous emballage stérile unitaire .

- **Milieux de transport**



- Transport rapide
- < 2 heures
- Protocolisé
- Respect des bonnes pratiques

Au laboratoire

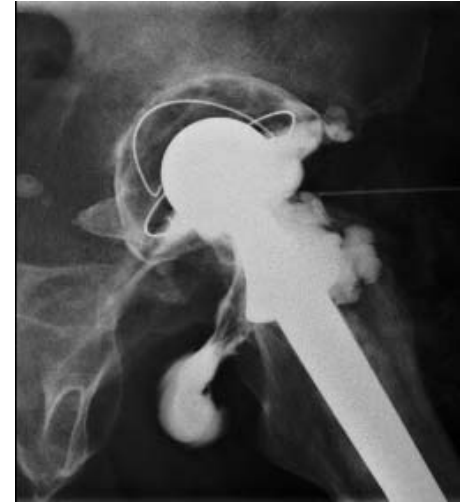
- Techniquer sous PSM 2 (hotte flux laminaire type 2)
- Casaque à manches longues à usage unique et Gants stériles,
- Matériel à usage unique pour hacher menu les prélèvements solides,
 - Mortiers, broyeurs, ...
- *Sonication des implants*
- Conserver les prélèvements jusqu'au rendu des résultats,
- Congeler à -80°C certains prélèvements pour étude ultérieure,

Les cultures

- Utiliser des **géloses enrichies** (sang, polyvitamines, vit K1...)
- Incubées : sous air ambiant, 5%CO2 et en anaérobiose,
- Utiliser des **milieux liquides d'enrichissement** Aérobie et Anaérobie,
 - Liquides articulaires : flacons d'hémocultures
 - Prélèvements tissulaires : milieux liquides d'enrichissement
- Cultures prolongées au moins 10 jours, mieux 14 jours, parfois plus
- Repiquer les milieux liquides même s'ils ne sont pas troubles
- Travailler avec une loupe binoculaire
- Congeler à - 80°C les bactéries isolées

Examen bactériologique des liquides articulaires

- Numération des éléments
- Recherche de cristaux même chez un patient qui a une prothèse
- Cytocentrifugation et colorations
 - MGG : Formule des éléments nucléés
 - Gram : Recherche de bactéries



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

Trampuz Am J Med 2004

Cultures prolongées en aérobiose et en anaérobiose 10 à 14 jours

Examen bactériologique des prélèvements tissulaires

Colorations de frottis

- MGG : cytologie (PNN, macrophages)
- Gram : présence de bactéries ou non
- Autres colorations Ziehl , auramine

**Cultures prolongées en aérobiose et en anaérobiose
10 à 14 jours**

Diagnostic bactériologique

Infection aiguë sur PTA

Urgence médico-chirurgicale

- Ponction articulaire
- Hémocultures
- Portes d'entrée potentielles

- Diagnostic facile
- **Bactérie à l'ex. direct souvent**
- (bactéries planctoniques)
- Culture + en 24h
- Antibiogramme en 48h

- **S. aureus, (50%)**
- **Strepto β hém. B,C,G, A, (25%)**
- ***Enterococcus faecalis***
- **Entérobactéries**
 - ***E.coli*, ...**

- **Autres...**
 - ***Staph lugdunensis***
 - ***H. influenzae B*,**
 - ***Pneumocoque***
 - ***Listeria***
 - ***Campylobacter***
 - ***Pasteurella***
 - **....**

Diagnostic bactériologique

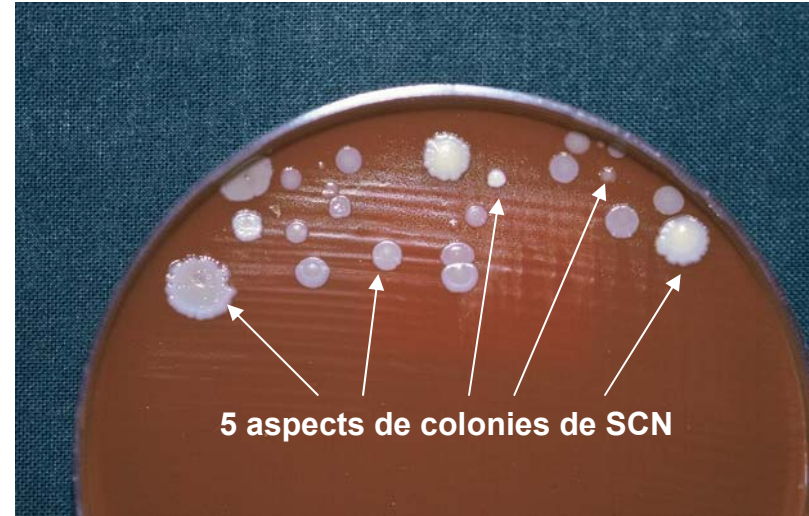
Infection chronique

Souvent difficile, déconcertant

- Examen direct :
 - Bactéries invisibles
 - Peu de PNN
- Les bactéries cultivent :
 - Lentement : 4 -13 j
 - En petit nombre
 - Plusieurs aspects
 - Dans les bouillons d'enrichissement
- Aspect polymorphe des colonies
- Plusieurs phénotypes de résistance....
- Identification difficile parfois

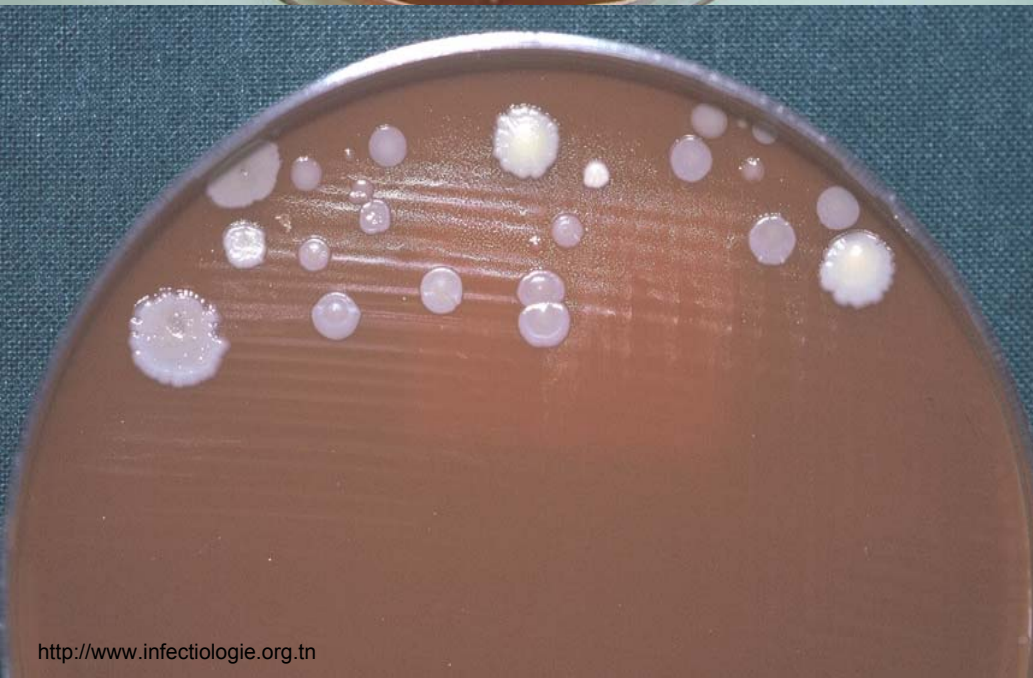


Plusieurs prélèvements positifs

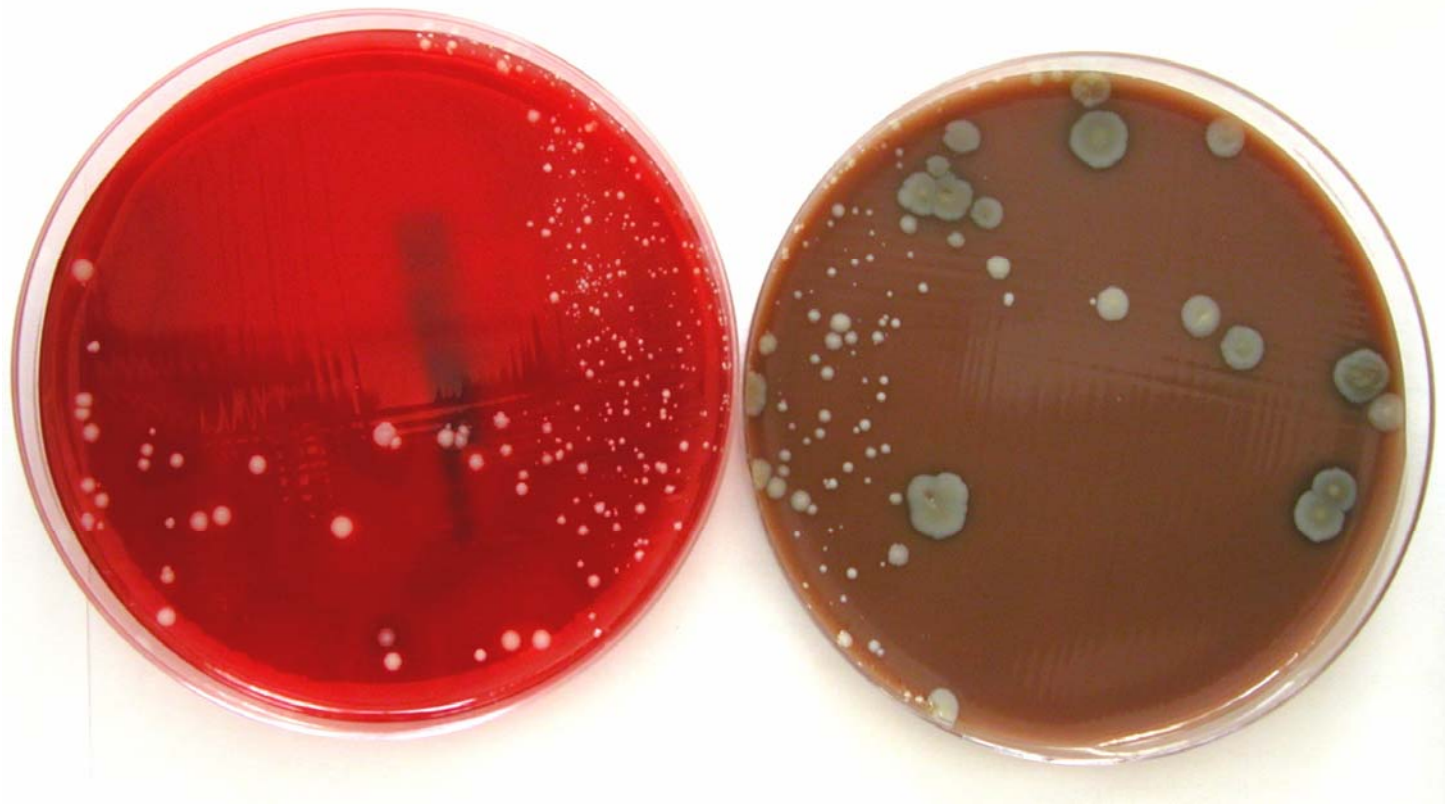




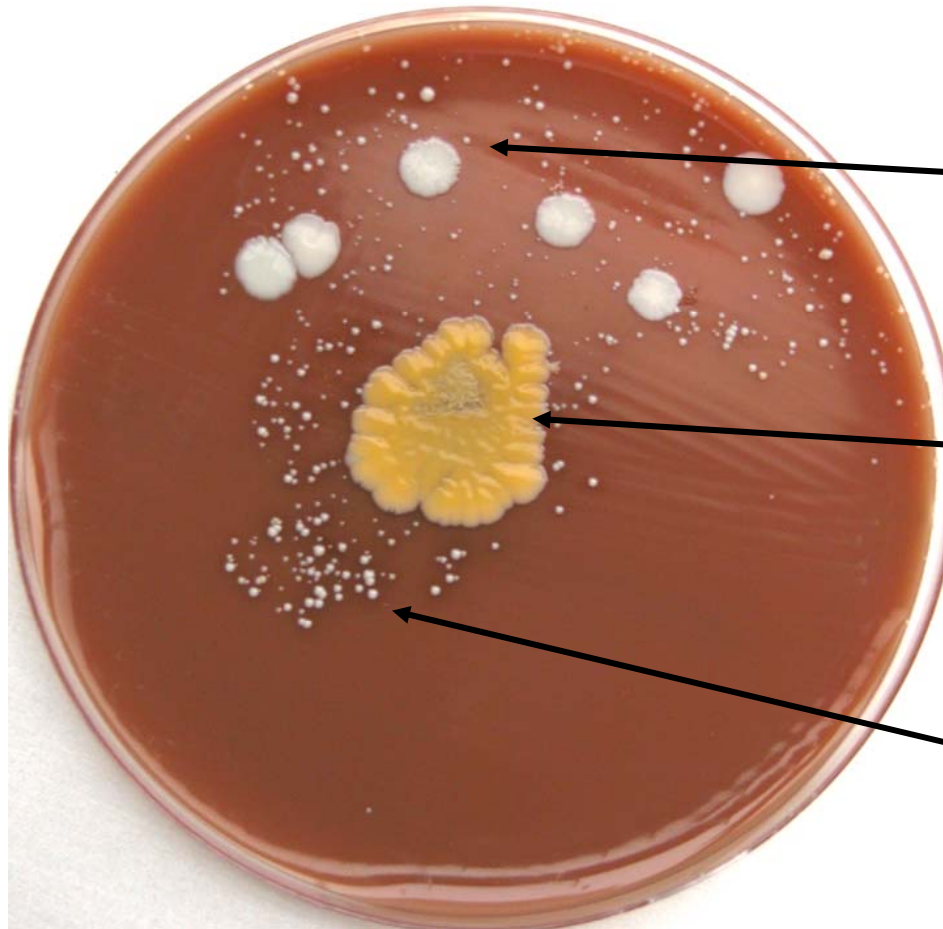
Aspects typiques inf chroniques
Polymorphisme des colonies



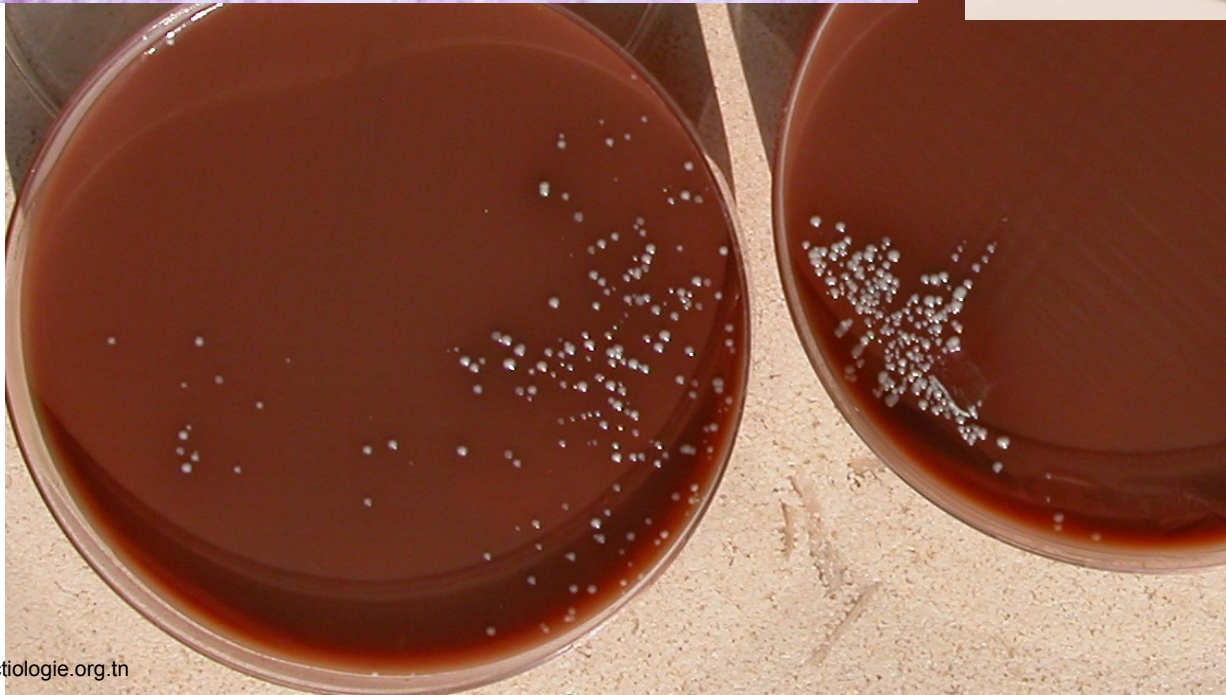
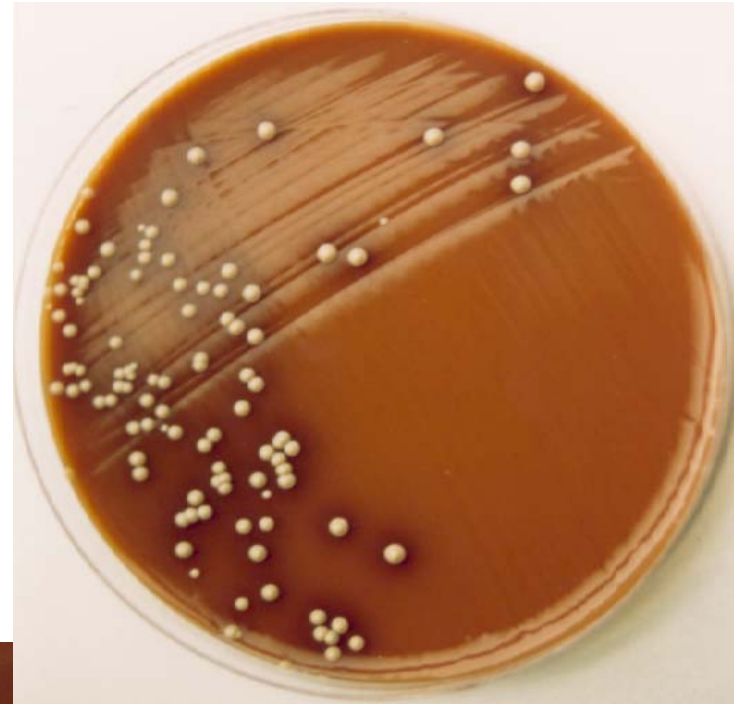
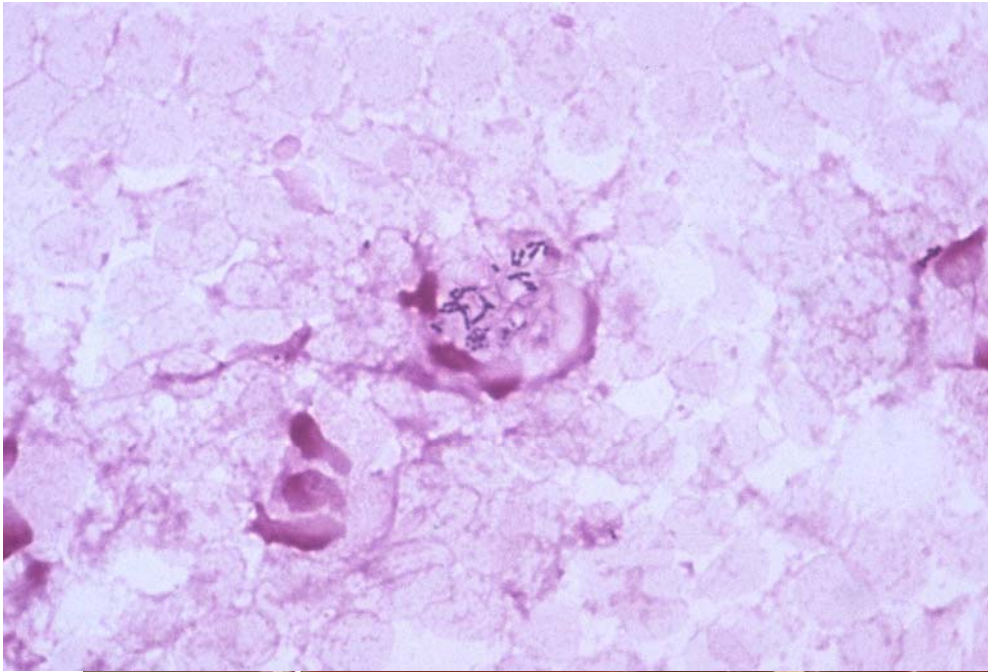
Les micro-colonies (" small colony variants ")



Infection polymicrobienne (<10% des cas)



- Quelques colonies de Staphylocoque à coagulase négative
- Rare (1 colonie) *Staphylococcus aureus* culture positive en 24h
- Très nombreuses petites colonies de *P. acnes*, 5 ou 6 jours plus tard



P. acnes

Infection chronique depuis 15 ans , PTH 7 fois changée

Infection polymicrobienne



Cotyle et synoviale (4 prélèvements) :

- *S. aureus* : Pénicilline R, S à tout
- *S. lugdunensis* : multi S
- *S. epi* : oxaR, GtR, EryS, RifR, PefR, FuciR, Co-TmpR

Fémur (4 prélèvements)

- *S. aureus* : Pénicilline R, S à tout
- *S. epi* : 7 antibiogrammes différents
(oxaS/R, GtS/R, EryS/R, Fosfo S/R, Pef S/R, Rif S/R)
- *S. warneri* : 2 antibiogrammes différents

« Prolonged Bacterial Culture to Identify late periprosthetic joint infection : a promising strategy »

CID 2008 : 47; 1 dec (ENDO-KLINIK Hambourg)

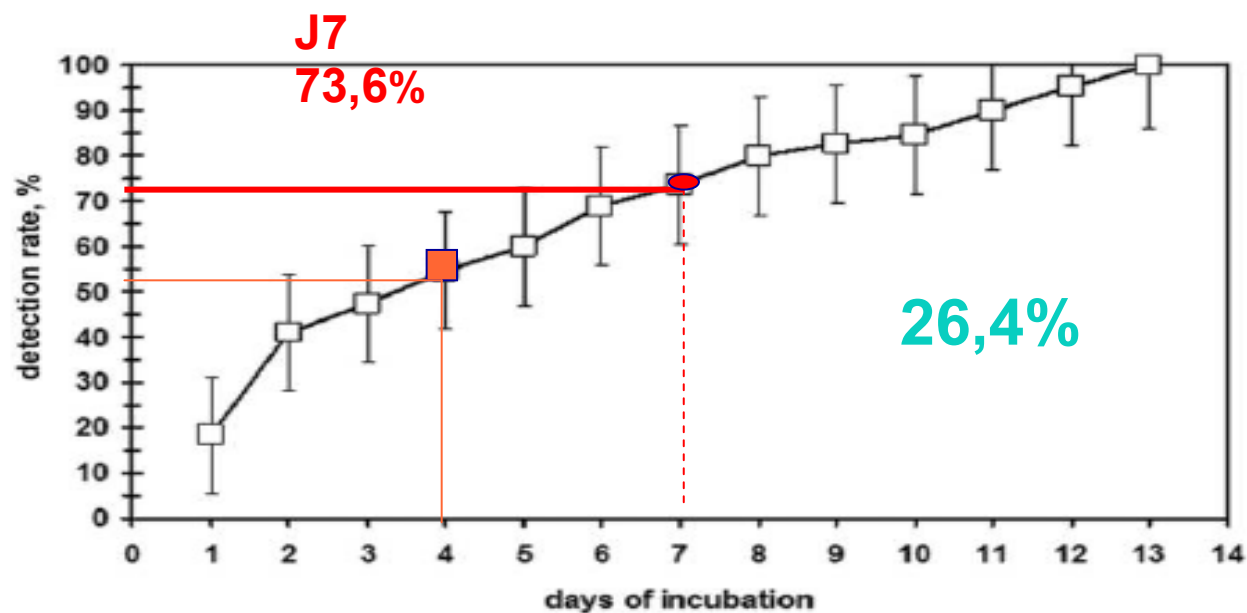
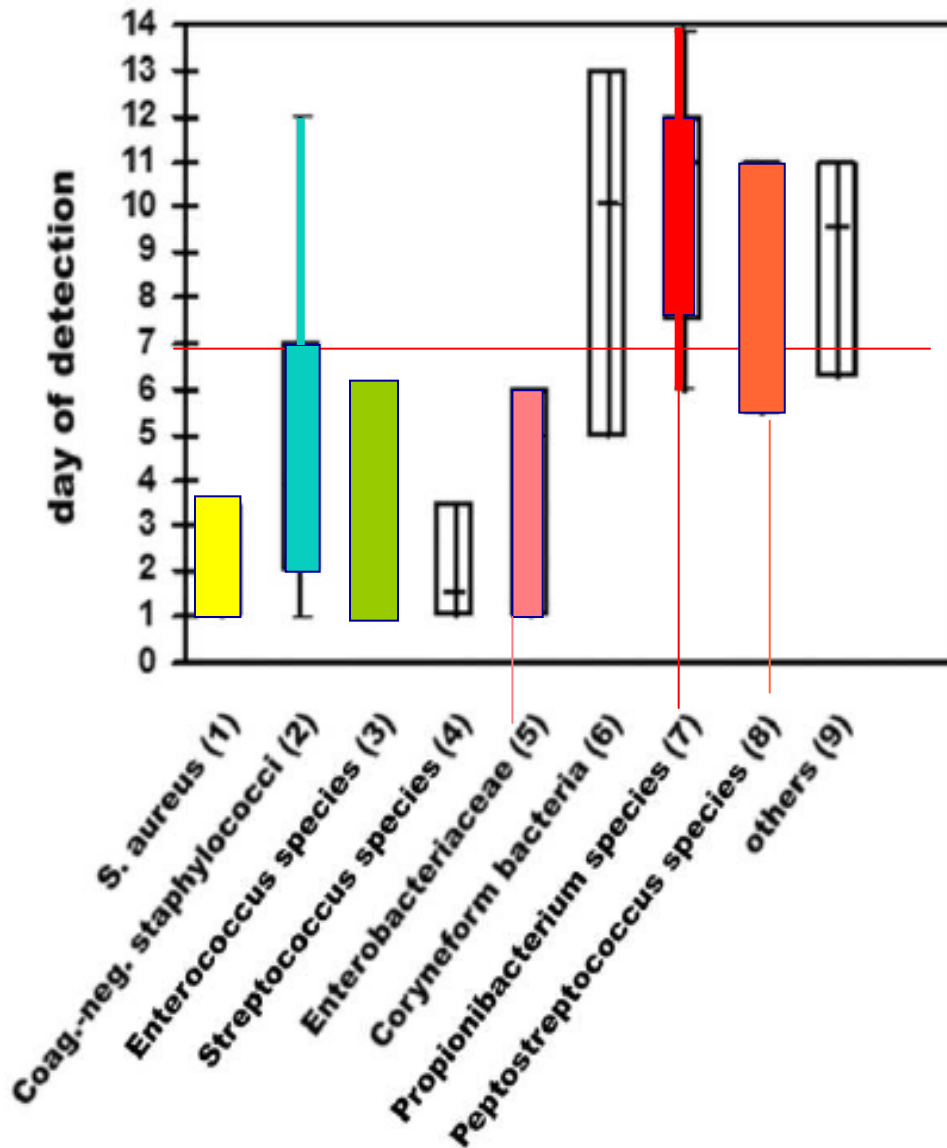


Figure 1. Time to diagnosis of infection by culture. Whisker lines span the 95% Hall-Wellner CI.



Délai d'apparition
des bactéries dans
les infections sur
prothèses

Clin Inf Dis 2008 1 Dec

Travail considérable



Microorganismes responsables d'infections sur PTA

- SCN
 - Staph aureus
- 60%**, (30% SAMR, 60% SCN MR)

- Strepto béta hémolytiques : B, C, G, A
- Streptocoques viridans,
- Enterocoques

Bacilles à Gram négatif: **11%**

- Enterobacteries (E.coli, Proteus sp, ..)
- Pseudomonas aeruginosa

Anaerobies

- Propionibacterium acnes
- Peptostreptococcus spp **15%**
- Bacteroïdes spp

Infections polymicrobiennes <10% of cases

Autres microorganismes rares

- *Haemophilus spp.*
- *Campylobacter spp*
- *Salmonella spp*
- *Listeria monocytogenes*
- *Strepto pneumoniae*
- *Pasteurella multocida*
- ***Corynebacteries***
- *Candida albicans*
- *Mycobacterium*, BCG,

Interprétation des résultats microbiologiques

Importance d'étudier plusieurs prélèvements profonds :

- Tous les prélèvements sont positifs avec la même bactérie = Infection.
- 2 prélèvements positifs avec la même bactérie = Infection
- 1 seul prélèvement effectué et il est positif avec
 - *S. aureus*, *S.pneumonia*, *Listeria*, *Campylobacter* = Infection
 - SCN, corynébactéries... = ininterprétable
- 1 prélèvement positif sur 5 et seulement en bouillon ? :
 - *S. aureus*, *S.pneumonia*, *Listeria*, *Campylobacter* ... = infection
 - SCN, *P. acnes* = possible contamination (sans intérêt ?)

Les Prélèvements Stériles

5 à 20% selon les séries :

- Patient sous antibiotique, (arrêt minimum 15 j, parfois 1 mois)
- Prélèvement mal fait,
- Transport trop long,
- Culture inadéquate,
- Bactérie trop fragile, ou non cultivable
- Mycobactérie, Champignon
- Corps étranger ...

Conclusions

L'infection sur prothèse articulaire est une infection grave

- Biofilm joue important dans les infections chroniques et les échecs
- Diagnostic bactériologique INDISPENSABLE mais difficile
- Techniques bactériologiques particulières et surtout de la patience
- Cultures prolongées pour bactéries de culture difficile, issues du biofilm.
- Diagnostic de certitude repose sur plusieurs prélèvements profonds.
- Infections dues très souvent à des bactéries cutanées,
- Prévenir la contamination des prélèvements.
- Intérêt certain de techniques innovantes en biologie moléculaire
- **Antibiogramme : activité bactériostatique des AB**, pas grand chose de comparable avec l'activité des AB dans un os infecté, en présence de matériel, de biofilm, de bactéries dormantes, de micro-colonies
- **Importance capitale de la chirurgie.**

*