



**HAL**  
open science

# Infections péri prothétiques et bactéries multi résistantes : un challenge médico-chirurgical

Laure Gatin

► **To cite this version:**

Laure Gatin. Infections péri prothétiques et bactéries multi résistantes : un challenge médico-chirurgical. Chirurgie. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLV053 . tel-01639635

**HAL Id: tel-01639635**

**<https://theses.hal.science/tel-01639635>**

Submitted on 20 Nov 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Infections péri prothétiques et bactéries multi résistantes : un challenge médico-chirurgical

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université de Versailles-  
St-Quentin-en-Yvelines

École doctorale n°577  
Structure et Dynamique des Systèmes Vivants

Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 29 septembre 2017, par

**Mme Laure Gatin**

Composition du Jury :

M. P. Tattevin Professeur, Université Rennes	Président
M. R. Nizard Professeur, Université Paris 7-Diderot	Rapporteur
M. E. Senneville Professeur, Université Lille	Rapporteur
M. D. Hutten Professeur, Université de Rennes	Examinatrice
M. F. Laurent Professeur, Université de Lyon 1	Examineur
Mme A.-C. Crémieux Professeur, Université Paris 7-Diderot	Directrice de thèse
M. A. Saleh-Mghir Ingénieur de recherche, UVSQ	Examineur

# Infections péri prothétiques et bactéries multi résistantes : un challenge médico-chirurgical

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université de Versailles-  
St-Quentin-en-Yvelines

École doctorale n°577  
Structure et Dynamique des Systèmes Vivants

Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 29 septembre 2017, par

**Mme Laure Gatin**

Composition du Jury :

M. P. Tattevin Professeur, Université Rennes	Président
M. R. Nizard Professeur, Université Paris 7-Diderot	Rapporteur
M. E. Senneville Professeur, Université Lille	Rapporteur
M. D. Hutten Professeur, Université de Rennes	Examinatrice
M. F. Laurent Professeur, Université de Lyon 1	Examineur
Mme A.-C. Crémieux Professeur, Université Paris 7-Diderot	Directrice de thèse
M. A. Saleh-Mghir Ingénieur de recherche, UVSQ	Examineur

## Remerciements

**Mme Anne-Claude Crémieux**, vous m'avez encadrée depuis mon Master 2 et pour ces trois années de thèse. Vous avez toujours répondu à mes mails, mes questions, tardives, parfois même le week-end, pendant vos congés. Vous avez su me communiquer l'intérêt de la recherche. Cela a été un très grand plaisir pour moi de travailler avec vous pendant toutes ces années. Je n'aurai probablement pas mené à bien de thèse si cela n'avait pas été avec vous. J'espère que nous continuerons à travailler ensemble, et que la fin de cette thèse ne signifiera pas la fin de notre collaboration !

**M Azzam Saleh Mghir**, ingénieur de recherche bienveillant qui m'a encadrée pendant toute la durée de mon Master 2, puis pendant ces trois années de thèse, en restant toujours disponible et d'une incroyable gentillesse. Tu formes avec Mme Crémieux un fabuleux duo d'encadrement (et en plus tu as toujours raison !). Merci aussi d'avoir accepté d'être dans mon jury ! C'est promis, je passerai régulièrement te voir dans ton bureau, et j'espère aussi continuer à travailler sur plein de projets avec toi.

**M Rémy Nizard**, pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail avec beaucoup d'enthousiasme, après avoir été président du jury du DESC l'année où je l'ai passé...

**M Eric Senneville**, pour votre implication dans le rapport de ce travail, malgré la distance !

**M Denis Hutten**, c'est un très grand honneur pour moi que vous ayez accepté de faire partie de mon jury.

**M Pierre Tattevin et M Frédéric Laurent**, vous avez suivi toutes les étapes de ce projet, m'avez aidée dans son élaboration, sa présentation à différents congrès. Merci infiniment pour tout ce travail, et pour le déplacement pour être dans mon jury !

**M Idir Ghout**, pour son aide précieuse en statistiques, sa disponibilité.

**M Jean-Louis Herrmann et toute son équipe**, pour leur accueil au sein du laboratoire de microbiologie.

**M Thomas Lilin (et toute son équipe)**, Vétérinaire et directeur du CRMB de l'Ecole Vétérinaire de Maisons-Alfort pour son accueil.

**M Chiocchia et M Mignotte**, merci d'avoir accepté, dans ces circonstances un peu particulières pour moi, que je déroge à la règle des « 3 années maximum » de thèse !

**Et toutes celles et tous ceux qui m'ont soutenue, aidée, supportée...pendant ces trois années, ou jusqu'ici !**

Evidemment mes parents, mon frère, ma belle-sœur et mes neveux, qui ont toujours été présents pour m'aider, m'accompagner dans toutes les étapes de ma vie, et en particulier ces dernières années. Je n'en serais pas là sans vous tous.

Mes beaux parents, qui ont toujours respecté mon travail et le temps que je prenais pour pouvoir le mener à bien. J'essaierai de rendre un peu plus disponible votre fils pour vous désormais...

Jean-Dominique...je sais très bien tout ce que je te dois pour ce travail et pour tant d'autres choses. C'est une aide quotidienne, faite d'encouragements, d'aide matérielle aussi pour que je n'ai pas trop de choses à faire à la maison en cas d'urgence de travail...et puis c'est la mise en page, l'utilisation des outils informatiques que je ne maîtrise pas parfaitement...Merci tout simplement, je sais que je ne te le dis pas suffisamment souvent !

Et enfin, à Camille...ton arrivée en pleine écriture de thèse a été un grand bouleversement, extrêmement heureux bien évidemment. J'ai appris grâce à toi à n'utiliser qu'une main pour vivre (et t'avoir dans l'autre bras), et à utiliser la reconnaissance vocale, à conseiller à toutes les femmes en congé maternité pour continuer à travailler sur un ordinateur ! Je souhaite que tu réussisses tous tes projets dans la vie. Tes parents t'y aideront de toutes leurs forces !

## Table des matières

I.	Introduction :	12
II.	Modèles expérimentaux d'infection péri prothétique	17
A.	Les modèles existants	17
a.	Introduction	17
b.	Recherche bibliographique	19
c.	Résultats de notre analyse ( <b>Tableau 2</b> )	24
d.	Discussion	26
e.	Conclusion de notre étude (53)	28
B.	Description de notre modèle (25 ; 39-48)	28
a.	Modèle utilisé ( <b>Figure 2</b> )	28
b.	Implant utilisé ( <b>Figure 3</b> )	29
c.	Technique opératoire	30
d.	Etude des prothèses	36
III.	Evaluation dans un modèle expérimental d'infection sur prothèse à <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline de l'efficacité d'une nouvelle classe d'antibiotique	37
A.	Introduction	37
B.	Utilisation de la ceftaroline ( <b>Figure 18</b> )	38
C.	Objectif de l'étude	40
D.	Matériel et méthodes	40
a.	Souche bactérienne	40
b.	Réalisation des courbes de bactéricidie	41

c.	Protocole de l'étude .....	42
d.	Choix des posologies .....	43
e.	Etude de la pharmacocinétique de la ceftaroline .....	43
f.	Sélection <i>in vivo</i> des mutants résistants .....	45
g.	Analyse statistique .....	46
E.	Résultats (48).....	46
a.	Etudes <i>in vitro</i> .....	46
b.	Etude <i>in vivo</i> .....	48
c.	Recherche de mutants résistants .....	50
F.	Discussion .....	52
G.	Limites de cette étude.....	54
H.	Conclusion.....	55
IV.	Création d'un modèle d'infection péri prothétique à <i>Klebsiella pneumoniae</i> productrice de carbapénémase, et étude de l'efficacité de la colistine locale seule ou associée à la colistine systémique et/ou au méropénème systémique .....	55
A.	Introduction .....	55
B.	Objectifs de cette étude .....	57
C.	Matériels et méthodes.....	58
a.	Description du modèle d'infection péri prothétique aigue à <i>Klebsiella pneumoniae</i> productrice de carbapénémase et du deux temps chirurgical.....	58
b.	Choix de la souche.....	59
c.	Préparation de l'inoculum .....	60

d. Traitement antibiotique.....	61
e. Courbes de bactéricidie .....	63
f. Recherche de mutants résistants .....	64
g. Analyse statistique .....	64
D. Résultats .....	64
a. Cinétique de la colistine .....	64
b. Cinétique du méropénème .....	65
c. Elution de la colistine dans l'espaceur en ciment.....	66
d. Courbes de bactéricidie .....	67
e. Résultats de l'étude <i>in vivo</i> ( <b>Tableau 7</b> ) .....	69
f. Recherche de mutants résistants .....	70
E. Discussion .....	71
F. Limites de cette étude.....	72
G. Conclusion.....	73
V. Références.....	74
Annexes.....	88
A. Posters présentés .....	88
B. Communications orales .....	88
C. Publications .....	89

## Table des illustrations (Figures)

Figure 1 : Flow chart de notre étude .....	19
Figure 2 : Lapin New Zealand.....	28
Figure 3 : Implant utilisé .....	29
Figure 4 : Installation des animaux .....	30
Figure 5 : Badigeonnage de la patte arrière droite des animaux .....	31
Figure 6 : Ostéotomie des plateaux tibiaux .....	31
Figure 7 : Cathétérisation du fût diaphysaire tibial .....	32
Figure 8 : Mise en place de la prothèse en silicone.....	32
Figure 9 : Fermeture de l'incision cutanée .....	32
Figure 10 : Inoculation .....	33
Figure 11 : Patch de Fentanyl® en place .....	33
Figure 12 : Etude de la cicatrice au moment du sacrifice .....	34
Figure 13 : Incision sur la cicatrice précédente au moment du sacrifice .....	34
Figure 14 : Pus entourant la prothèse .....	34
Figure 15 : Prélèvement du pus péri prothétique .....	35
Figure 16 : Aspect du tibia après excision de toutes les parties molles .....	35
Figure 17 : Aspect de la moelle osseuse .....	35
Figure 18 : Formules chimiques de la pro drogue (ceftaroline fosamil) et de la forme active (ceftaroline) : .....	38
Figure 19 : Courbes de bactéricidie pour 4 CMI.....	47
Figure 20 : Pharmacocinétique de la ceftaroline comparative lapin/humain (63) .....	48
Figure 21 : Représentation graphique des résultats étude ceftaroline versus vancomycine ....	50
Figure 22 : Dosages colistine (A+B) lapins 13-16.....	65

Figure 23 : Concentrations de colistine (A+B) mesurées dans les éluats de ciment surchargés et baignés dans le NaCl 0,9% .....	66
Figure 24 : Pourcentage de colistine éluée par rapport à la quantité initiale .....	67
Figure 25 : Courbes de bactéricidie de la souche KPC99YC en présence de colistine à 4 mg/l, de méropénème à 16 mg/l (= 4xCMI), et d'une association, colistine-méropénème .....	68
Figure 26 : Représentation graphique des résultats pour la souche KPC99YC .....	70
Figure 27 : 29 octobre 2016 : ID Week 2016 à la Nouvelle-Orléans (LA, USA) : « Efficacy of colistin-loaded cement spacer in carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> experimental prosthetic joint infection ».....	90
Figure 28 : 16 septembre 2016 : 24ème congrès de l'EORS à Bologne (ER, Italie): « Colistin treatment in an experimental model of carbapenem resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> prosthetic joint infection » .....	91
Figure 29 : 25 au 28 avril 2015 : 25ème congrès de l'ECCMID, à Copenhague (Danemark) : « New experimental models of carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> prosthetic joint infections and post-traumatic osteomyelitis ».....	92
Figure 30 : 4 mars 2015 : 1ère Journée de l'Ecole Doctorale SDSV, Gif Sur Yvette : « New experimental models of carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> prosthetic joint infections and post-traumatic osteomyelitis » .....	93
Figure 31 : 2-4 juillet 2014: 22ème congrès de l'EORS, à Nantes : « Periprosthetic joint infection animal models : literature review and description of our model ».....	94
Figure 32 : 11 septembre 2013: 53ème congrès de l'ICAAC, à Denver (Colorado, USA): « Ceftaroline Efficacy against Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) Rabbit Prosthetic Joint Infection ».....	95

## **Table des illustrations (Tableaux)**

Tableau 1 : Comparaisons des différents modèles animaux existants dans la littérature.....	21
Tableau 2 : Résultats de notre analyse .....	25
Tableau 3 : Efficacité comparative des antibiothérapies dans un modèle d'infection péri prothétique à SARM chez le lapin .....	49
Tableau 4 : Emergence de mutants résistants à la daptomycine .....	51
Tableau 5 : CMI des souches résistantes à la daptomycine montrant l'effet seesaw chez les 6 lapins .....	52
Tableau 6 : Antibiogramme de la souche KPC99YC .....	60
Tableau 7 : Efficacité comparative des antibiothérapies dans un modèle d'infection péri prothétique à KPC chez le lapin .....	69

**Abréviations utilisées**

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé

ASC : Aire Sous la Courbe

BHI : Brain-Heart Infusion

BHRe : Bactéries Hautement Résistantes aux antibiotiques émergentes

BMR : Bactérie Multi Résistante

CDC : Center for Disease Control

CFU (UFC) : Colony Forming Unit (Unité Formant Colonie)

$C_{\max}$  : Concentration maximale observée

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

$CMI_{90}$  : Concentration Minimale Inhibitrice de 90% des unités formant colonies

CMS : colistine méthanesulfonate

Coli : Colistine

Colis : Colistine

CPT : Ceftaroline

CRP : C-Reactive Protein

EPC : entérobactérie productrice de carbapénémase

ESBL : entérobactérie productrice de bêta-lactamase à spectre élargi

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (chromatographie liquide à haute performance)

i.m. : intramusculaire

i.v. : intra veineux

KPC : *Klebsiella pneumoniae* Productrice de Carbapénémase

Manip : manipulation

Mero : Méropénème

Méro : méropénème

MRSA : Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

MUI : Million d'Unités Internationales

P : P- value

PBP2a : penicillin-binding protein 2a

PBS : Phosphate Buffered Saline

pH : Potentiel Hydrogène

PMMA : Polyméthylméthacrylate

RIF : Rifampicine

SAMS : *Staphylococcus aureus* Sensible à la Méricilline

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline

SRM : Staphylocoque Résistant à la Méricilline

$T_{1/2}$  : Demi-vie

$T_{\max}$  : Temps au bout duquel la concentration maximale est observée

VAN : Vancomycine

VS : Vitesse de Sédimentation

## **I. Introduction :**

Malgré les progrès réalisés pour leur prévention, le nombre d'infections ostéo-articulaires augmente (1-2). Cette augmentation est notamment liée à l'augmentation du nombre de corps étrangers implantés (plaques, clous, prothèses...), en raison du vieillissement de la population et de l'amélioration des techniques opératoires et anesthésiques. Elles représentent la complication la plus redoutée par les chirurgiens orthopédistes, car responsables d'une morbidité majeure et de coûts très élevés.

En France, plus de 100 000 prothèses de hanche sont en effet mises en place chaque année ainsi que de très nombreuses prothèses de genou, d'épaule, de cheville, de doigt... Ces infections concernent selon les études, entre 0,6 et 1,5% (3) des patients porteurs de prothèse, soit plus de 10 000 personnes en France chaque année (2).

Différents facteurs de risque d'infection péri prothétique peuvent être retrouvés (4, 5). Ces facteurs peuvent dépendre du patient lui-même (diabète, corticothérapie, fumeur, malnutrition, obésité morbide, consommation alcoolique élevée, maladie auto-immune, toxicomanie, durée d'hospitalisation péri opératoire importante, colonisation nasale par une bactérie multi résistante (BMR) notamment un staphylocoque résistant à la méticilline (SRM), transfusion péri opératoire, infection sur un autre site notamment articulaire, septicémie, infection de la peau et des tissus mous active). Ils peuvent aussi être liés à l'environnement péri opératoire : douche pré opératoire, dépilation pré opératoire, préparation cutanée de l'opéré en salle d'opération, antiseptie pré opératoire du personnel soignant, prophylaxie antibactérienne.

Définir une infection péri prothétique peut être un travail difficile et repose sur plusieurs critères parfois associés entre eux. Selon le Center for Disease Control (CDC) d'Atlanta (6), est considérée comme infection nosocomiale une infection qui survient dans l'année qui suit l'implantation d'un matériel (ou dans les 30 jours suivant une intervention chirurgicale en l'absence d'implantation de matériel), et qui présente au moins l'une des caractéristiques suivantes :

- présence de pus dans un drain au contact du site opératoire,
- micro organisme isolé au niveau du site opératoire, prélevé de façon stérile,
- signes évidents d'infection au niveau du site opératoire (en particulier abcès),
- diagnostic clinique posé par le chirurgien.

La difficulté diagnostique peut être à l'origine d'un retard diagnostic, ou au contraire d'un excès de reprise chirurgicale en fonction de chaque chirurgien.

Un article récent (4) a répertorié différents critères diagnostiques d'infection péri prothétique (un critère majeur ou 3 critères mineurs associés évoquant une infection péri prothétique) :

- Critères majeurs :
  - 2 cultures péri prothétiques positives avec des phénotypes bactériens identiques,
  - trajet fistuleux communicant avec la prothèse.
- Critères mineurs :
  - élévation de la CRP (C-Reactive Protein) ou de la VS (Vitesse de Sédimentation),
  - augmentation du nombre de leucocytes dans le liquide synovial (plus de 1100 à 1700 cellules par  $\mu\text{l}$ ),
  - augmentation du pourcentage de polynucléaires neutrophiles dans le liquide synovial (plus de 65%),
  - analyse histologique positive des tissus péri prothétiques,
  - une seule culture positive des tissus péri prothétiques.

La contamination péri opératoire est responsable de la majorité des infections péri prothétiques. Mais celles-ci peuvent aussi être d'origine hématogène. La classification actuellement utilisée pour les infections péri prothétiques est dérivée de la classification de Tsukayama (7), qui porte sur les infections péri prothétiques de hanche, et extrapolable aux autres articulations :

- Type 1 : infection aiguë post opératoire,
- Type 2 : infection chronique,
- Type 3 : infection hématogène,
- Type 4 : découverte de micro organismes lors d'une reprise de prothèse pour un autre motif que septique.

La prise en charge des infections péri prothétiques est un enjeu majeur. Différentes stratégies médico-chirurgicales peuvent être proposées (5, 8-10) :

- Traitement par antibiothérapie suppressive, réservée aux patients dont l'intervention chirurgicale représente un risque de morbidité et de mortalité élevé,
- Débridement chirurgical (synovectomie), réservé aux cas d'infections péri prothétiques aiguës, c'est-à-dire au maximum un mois après l'implantation de la prothèse, et en général plus tôt si cela est possible, associé à une antibiothérapie par voie systémique (11-12),
- Reprise chirurgicale avec changement de l'implant en un temps, (changement immédiat de la prothèse) ou deux temps, (avec espaceur : ciment imprégné ou non d'antibiotiques (13-14)) en fonction de la bactérie retrouvée, de l'état du patient et de l'expérience du chirurgien, associée à une antibiothérapie par voie systémique. Parfois, aucun implant ni espaceur n'est mis en place (le patient est alors laissé en résection) (15). Plus la bactérie est résistante aux antibiotiques et plus le geste chirurgical doit être radical (5).

Tous ces traitements sont soit incomplets (dans le cas de l'antibiothérapie suppressive qui reste un traitement purement palliatif ou du débridement qui ne donne pas toujours de bons résultats s'il est effectué trop tard), soit très lourds (reprises chirurgicales avec parfois résection sans remise en place d'un implant, entraînant une morbidité importante pour le patient).

Le choix de l'antibiothérapie dépend du type de bactéries. Les staphylocoques sont les bactéries les plus fréquemment à l'origine de ces infections sur prothèses (3). Bien que la résistance à la méticilline des *Staphylococcus aureus* diminue, ce n'est pas le cas pour les *Staphylococcus epidermidis* (16) pour lesquels la vancomycine et la daptomycine, autrefois réservées aux patients particulièrement fragilisés, sont actuellement souvent utilisées en première ligne (17). Ces deux antibiotiques ayant des structures chimiques proches, des résistances croisées ont été décrites. Trouver d'autres molécules efficaces sur ces staphylocoques résistants à la méticilline est donc particulièrement important dans ce contexte.

D'autres bactéries sont plus rarement retrouvées, mais tout aussi pathogènes et destructrices (18). Les infections à bacilles à Gram négatif représentent 6 à 23% des infections péri prothétiques selon les séries (19). En particulier, les infections dues à des klebsielles représentent environ 15% des infections péri prothétiques à bacilles à Gram négatif (20). En raison de l'augmentation importante de la multi résistance aux antibiotiques des entérobactéries acquises à l'hôpital (21), ces infections sont particulièrement difficiles à traiter. Elles peuvent avoir des conséquences en termes de morbidité et de mortalité extrêmement graves pour les patients (22). Actuellement le problème le plus préoccupant est constitué par l'émergence d'entérobactéries résistantes à la quasi-totalité des antibiotiques

disponibles (dont les *Klebsiella pneumoniae* productrices de carbapénémase (KPC) (16)). Dans ce type d'infection, la morbidité (amputations notamment), mais surtout la mortalité, sont très élevées (près d'un tiers de décès chez ces patients atteints d'une infection péri prothétique à KPC (19)). Ces bactéries, dites bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe), rares encore en France, sont présentes à l'état endémique dans les hôpitaux de certains pays d'Europe du Nord, d'Israël, et d'Amérique du Nord (23). Le traitement optimal de ces infections est largement méconnu et est difficile à évaluer cliniquement en raison de la rareté et l'hétérogénéité des infections (24).

La sélection des meilleures stratégies médico-chirurgicales est un enjeu essentiel. A ce jour les études cliniques prospectives comparatives sont rares. Ces infections sont en effet hétérogènes et de nombreux facteurs influencent le pronostic y compris la qualité de l'opérateur. Les études publiées dans les journaux chirurgicaux s'intéressent au geste chirurgical mais ne tiennent en général pas compte du type de bactéries et du traitement médical. Inversement les travaux qui portent sur l'antibiothérapie incluent des patients ayant reçus des traitements chirurgicaux très différents. Les modèles expérimentaux sont donc nécessaires pour pouvoir comparer les stratégies médico-chirurgicales entre elles et définir les traitements optimaux pour nos patients.

La plupart des modèles expérimentaux sont des modèles d'ostéites et peu d'études concernent les infections péri prothétiques. Par ailleurs, la majorité de ces travaux étudient des infections à *Staphylococcus aureus* alors que ceux qui concernent les infections à bacilles à Gram négatif et en particulier les entérobactéries multi résistantes aux antibiotiques telles que les KPC sont inexistantes.

### **Les objectifs de la thèse étaient les suivants :**

- a. Réaliser une revue de la littérature sur les différents modèles expérimentaux d'infections péri prothétiques,
- b. Evaluer dans un modèle expérimental d'infection sur prothèse à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), l'efficacité d'une nouvelle classe d'antibiotique.

Notre équipe travaille depuis de nombreuses années sur un modèle expérimental d'infection sur prothèse à SARM (25). Nous avons comparé dans ce modèle l'efficacité de la ceftaroline, une céphalosporine active sur les SARM, à celle de la vancomycine, en monothérapie et en association avec la rifampicine.

- c. Créer un modèle d'infection péri prothétique à KPC, et sélectionner les traitements les plus efficaces par voie systémique et par voie locale (mise en place d'espaceurs en ciment imprégnés ou non d'antibiotiques). Ce travail est mené en collaboration avec plusieurs équipes regroupées au sein du projet de recherche EVERGREEN financé par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé).

## **II. Modèles expérimentaux d'infection péri prothétique**

### **A. Les modèles existants**

#### a. Introduction

De nombreux modèles animaux ont été créés pour étudier les infections ostéo-articulaires, en particulier des modèles reproduisant des ostéomyélites. La plupart de ces modèles se sont inspirés des travaux de Norden (26) à la fin des années 1970 (27-50). Le modèle animal est intéressant pour étudier les effets prophylactiques et thérapeutiques des antibiotiques sur les infections de prothèse, en raison de l'homogénéité et la reproductibilité des infections

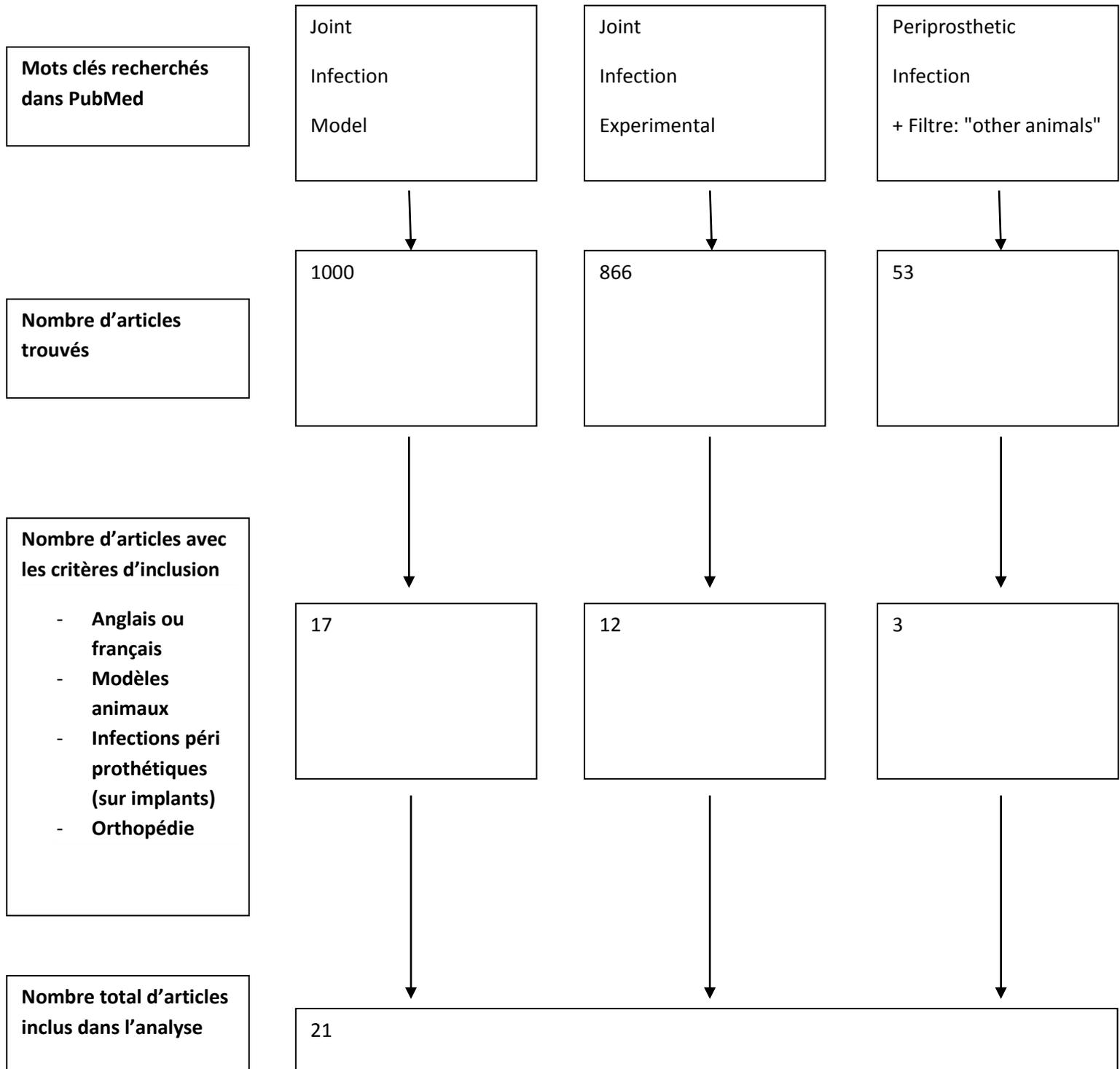
expérimentales. Il permet de mieux comprendre la physiopathologie de l'infection articulaire péri prothétique et de tester de nouveaux traitements (antibiotiques par voie générale ou locale sous forme de ciments, de revêtements d'implants). Pour qu'il soit applicable à l'homme, son cahier des charges implique de reproduire le plus fidèlement possible le mode d'infection et l'évolution d'une infection péri prothétique humaine (notamment l'absence de guérison spontanée et une évolution sur un mode chronique), être reproductible et facile à réaliser. De plus, il doit être éthiquement acceptable (accord obligatoire d'un comité d'éthique), et peu coûteux. Une des problématiques réside dans le type d'inoculation, qui peut être intra articulaire per opératoire, intra artériel ou intraveineux post opératoire (hématogène) ou par inoculation de proximité (inoculation intra médullaire) ; chaque type d'inoculation simulant un mode de contamination différent rencontré en pratique clinique. Par exemple, l'inoculation locale (intra articulaire) représente le mode d'inoculation reproduisant les conditions des infections nosocomiales, les plus fréquentes, attribuées à une contamination directe de la plaie opératoire ou de l'implant. Quelles qu'en soient les modalités, l'inoculation doit produire constamment une infection susceptible de se chroniciser sans entraîner la mort de l'animal, reproduisant les caractères de la plupart des infections articulaires sur matériel chez l'homme. Nous avons donc étudié tous les types de modèles animaux d'infections prothétiques de la littérature en fonction du mode de contamination, et avons classé ces modes de contamination en fonction de certains critères. En premier lieu, la contamination devait produire un taux d'infection proche de 100%. Ensuite, le taux de guérison spontanée de l'infection devait s'approcher de 0% et le taux de mortalité également.

Notre hypothèse était que le mode d'inoculation directe est le plus efficace et le moins iatrogène pour induire une infection locale sur matériel étranger articulaire.

### b. Recherche bibliographique

Nous avons recherché sur Pubmed tous les articles comprenant les mots *Experimental* ou *Model +joint* ou *periprosthetic + Infection* (**Figure 1**).

Figure 1 : Flow chart de notre étude



Les critères d'exclusion étaient toutes les infections ne reproduisant pas une infection péri prothétique (notamment les modèles d'implantation de cages sous-cutanées qui reproduisent une infection sur corps étranger éloignée de l'infection péri prothétique articulaire de l'homme, avec des abcès purement sous-cutanés sans localisation ostéo-articulaire de l'infection (18 ; 29), et la plupart des articles traitaient d'ostéomyélites sans arthrite, et n'ont pas été sélectionnés). Seuls ceux traitant des infections articulaires péri prothétiques en orthopédie ont été retenus. Au total, 21 travaux ont été analysés, représentant 9 modèles d'infections péri prothétiques différents (30-50) : 7 chez le lapin, un chez la souris, et un chez le rat.

Chaque article a été analysé en fonction du mode d'inoculation, de la bactérie utilisée, de la technique opératoire (et plus généralement de la méthodologie, incluant l'accord d'un comité d'éthique), de la proximité de l'infection péri prothétique avec la situation humaine (en particulier en terme de fonction, d'aspect osseux et d'absence de guérison spontanée), et des objectifs de l'étude (mise au point d'un modèle, tests d'antibiothérapie locale ou systémique...) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Comparaisons des différents modèles animaux existants dans la littérature

Type d'inoculation	Premier auteur	Année de publication	Pathogène utilisé	Type d'implant	Animal utilisé et nombre	Objectifs de l'étude
Intra articulaire per opératoire	Schurman (28)	1978	<i>Escherichia coli</i>	Hémi-arthroplastie de genou : ciment et cylindre en acier inoxydable fémoral	30 Lapins Néozélandais	Tester efficacité d'un ciment à la gentamicine et la durée de cet effet
	Craig (33)	2005	SARM	Hémi-arthroplastie de genou : ciment autour d'une vis dans le fémur distal	22 Lapins Néozélandais	Mise au point d'un modèle d'infection péri prothétique articulaire
	Bernthal (36) Niska (37)	2010 (36) 2013 (37)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Clou de Kirchner en acier inoxydable dans le fémur distal (extrémité distale intra articulaire)	12 Souris (36) 8 Souris (37)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- (36) évaluer l'efficacité d'un polymère résorbable imprégné de rifampicine et minocycline dans la prévention des infections péri prothétiques</li> <li>- (37) évaluer l'intérêt de l'association entre vancomycine et rifampicine dans les infections péri prothétiques à <i>Staphylococcus aureus</i></li> </ul>
	Notre modèle (25 ; 39-48)	1996-2011	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hémi arthroplastie de genou droit : implant en silicone	Lapins Néozélandais (25) 35 animaux, (39) 20 animaux, (40) 31 animaux, (41) 13 animaux, (42) 20 animaux, (43) 52 animaux, (44) 45 animaux, (45) 52 animaux, (46) 11 animaux, (47) 56 animaux, (48) 66 animaux	Mise au point du modèle (25), tester des antibiothérapies (39 ; 40 ; 43 ; 44 ; 45 ; 48), évaluation de méthodes diagnostiques (41-42), évaluation de polymères bioactifs (46), évaluation de ciments aux antibiotiques (47)

<b>Intra médullaire per opératoire</b>	Southwood (32)	1985	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hémi-arthroplastie de hanche : composant fémoral : roulement à bille et broche cimentée	125 Lapins Short Hair	Montrer la baisse de la résistance aux infections en présence d'un corps étranger
	Alt (34)	2006	<i>Staphylococcus aureus</i>	Clou centromédullaire tibial (extrémité distale intra articulaire)	30 Lapins Néozélandais	Tester des revêtements d'implants, imprégnés ou non à la gentamicine
	Antoci (38)	2007	<i>Staphylococcus aureus</i>	Clou en titane ± recouvert de vancomycine dans le fémur distal (extrémité distale intra articulaire)	24 Rats Wistar	Tester l'intérêt d'un revêtement imprégné de vancomycine dans la prévention des infections péri prothétiques
<b>Intra veineux post opératoire</b>	Blomgren (30) (31)	1980 (30) 1981	<i>Staphylococcus aureus</i>	Arthroplastie totale de genou (composants fémoral et tibial cimentés)	23 Lapins Néozélandais dans chaque étude	- (30) étudier la dissémination hématogène bactérienne post opératoire d'une prothèse articulaire - (31) tester l'efficacité d'un ciment à la gentamicine
	Southwood (32)	1985 (31)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hémi-arthroplastie de hanche : composant fémoral : roulement à bille et broche cimentée	125 Lapins Short Hair	Montrer la baisse de la résistance aux infections en présence d'un corps étranger
<b>Intra artériel post opératoire</b>	Poultides (35)	2008	<i>Staphylococcus aureus</i>	Implant de tantale poreux dans le tibia proximal (extrémité proximale intra articulaire)	30 Lapins Néozélandais	Mise au point d'un modèle d'infection péri prothétique articulaire

Quatre modes d'inoculation ont été recensés :

- l'inoculation intra articulaire per opératoire (25 ; 28 ; 33 ; 36 ; 37 ; 39 ; 40 ; 41 ; 42 ; 43 ; 44 ; 45 ; 46 ; 47 ; 48). Elle consiste à injecter dans la cavité articulaire l'inoculum après l'implantation (implants variés, présentés dans le **Tableau 1**) et la fermeture cutanée (entre 0,1 et 0,5 ml en fonction des protocoles), à l'aide d'une seringue de 1 ml munie d'une aiguille de 16 Gauges,
- l'inoculation intra médullaire per opératoire (32 ; 34 ; 38). Elle consiste à injecter l'inoculum dans la cavité médullaire de l'os avant l'implantation, au moment de la cathétérisation de la diaphyse (en général à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille de 16 Gauges, permet d'injecter 0,002 à 0,1 ml de suspension bactérienne en fonction de l'animal utilisé dans l'étude),
- l'inoculation intra veineuse post opératoire (30-32). Elle consiste à injecter l'inoculum dans une veine périphérique (auriculaire chez le lapin) après l'implantation, à l'aide d'un cathéter de 22 à 24 Gauges, permettant l'injection de 1 ml de suspension bactérienne,
- l'inoculation intra artérielle post opératoire (35). Elle consiste à injecter l'inoculum dans l'artère fémorale après l'implantation (cela nécessite l'exposition de l'artère fémorale 2 cm au-dessus de l'articulation du genou, avec introduction d'un cathéter 26 Gauges et injection d'1 ml de suspension bactérienne).

Pour tous les modèles, quel que soit le mode d'inoculation, le diagnostic d'infection était porté sur l'analyse bactériologique (notamment le comptage des bactéries) de l'os prélevé au moment de l'autopsie des animaux. Pour la plupart des études, une étude histologique ou radiographique complétait ce diagnostic.

c. Résultats de notre analyse (Tableau 2)

Les injections locales de l'inoculum (intra articulaires ou intra médullaires) constituaient le mode d'inoculation permettant le plus fort taux d'infection (avec des extrêmes de 75 à 100 % pour la voie intra articulaire et 70 à 100% pour l'inoculation intra médullaire), associé au plus faible taux de mortalité. Bien que le taux de mortalité n'ait pas toujours été renseigné (25 ; 31 ; 36 ; 37 ; 38 ; 43 ; 44 ; 45 ; 47 ; 48), il était estimé sur les études qui en faisaient état à 5 à 23 % dans le cas d'une inoculation intra articulaire (28 ; 33 ; 39 ; 40 ; 41 ; 42 ; 46), et de 11 à 17% dans le mode d'inoculation intra médullaire (32 ; 34). Dans notre modèle (25 ; 39-48), le nombre de décès était majoré par l'association avec la rifampicine (données non publiées mais taux observé de 23% en moyenne dans notre dernière étude en rapport avec des diarrhées profuses survenant chez le lapin).

Le taux de guérison spontanée était de 0 à 25% dans le cas d'une inoculation intra articulaire, et de 0 à 30% par inoculation intra médullaire.

Les autres modes d'inoculation, notamment intra veineux et intra artériels n'obtenaient pas des taux d'infection aussi importants (pour l'inoculation intraveineuse : 47 à 70%, avec un taux de guérison spontanée de 30 à 53%, peut-être en raison d'un effet de « lavage » par le sérum du lapin), ou entraînaient une surmortalité conséquente (37% pour l'inoculation intra artérielle et 28 à 56% pour l'inoculation intra veineuse).

Tableau 2 : Résultats de notre analyse

Type d'inoculation	Premier auteur	Année de publication	Taux d'infection (chez les témoins si test d'un antibiotique)	Taux de mortalité des animaux	Taux de guérison spontanée
<b>Intra articulaire per opératoire</b>	Schurman (28)	1978	81%	9%	19%
	Craig (33)	2005	75%	5%	25%
	Bernthal (36) Niska (37)	2010 (36) 2013 (37)	100% (36) 77% (37)	Non précisé (36) Non précisé (37)	0% (36) 23% (37)
	Notre modèle (25 ; 39-48)	1996-2011	93%	23% (moyenne des taux de mortalité quand précisés)	7%
<b>Intra médullaire per opératoire</b>	Southwood (32)	1985	70%	17%	30%
	Alt (34)	2006	88%	11%	12%
	Antoci (38)	2007	100%	Non précisé	0%
<b>Intra veineux post opératoire</b>	Blomgren (30) (31)	1980 (30) 1981 (31)	50% (30) 70% (31)	56% (30) Non précisé (31)	50% (30) 30% (31)
	Southwood (32)	1985	47%	28%	53%
<b>Intra artériel post opératoire</b>	Poultides (35)	2008	100%	37%	0%

#### d. Discussion

L'inoculation locale directe, qu'elle soit intra médullaire ou intra articulaire directe, constitue le mode d'inoculation le plus efficace pour l'étude des infections péri prothétiques précoces, permettant un taux d'infection élevé, avec un taux de mortalité faible par rapport aux autres modes d'inoculation. Les autres modes d'inoculation, intra artérielle ou intra veineuse, sont en effet responsables de taux de mortalité plus élevés probablement en raison de la difficulté technique liée à la pose d'un cathéter artériel sur les membres inférieurs chez le petit animal, et aussi d'une probable bactériémie avec infection sévère secondaire (35). Ceci explique le fait qu'ils n'ont fait l'objet que de peu d'études.

En revanche, le modèle d'inoculation directe ne permet pas de simuler des infections hématogènes. Il permet l'étude de la très grande majorité des infections péri prothétiques précoces. C'est pourquoi il a été particulièrement utilisé dans la mise au point des modèles, l'étude de la physiopathologie des infections, mais également les essais thérapeutiques.

L'implant utilisé est un élément important à prendre en compte, en particulier vis à vis de la formation de bio film. Aussi, tester de nouveaux matériaux, ou des matériaux proches de ceux utilisés chez l'humain serait intéressant.

D'autres paramètres influencent le taux d'infection, le taux de mortalité et le taux de guérison spontanée, comme le type d'animal ou le type d'agent microbien.

La plupart des modèles étudiés utilisent le lapin en raison de son comportement vis-à-vis de l'infection, mimant parfaitement l'infection ostéo-articulaire humaine (cicatrice inflammatoire, fistulisation à la peau, aspect radiographique d'ostéite, diminution des amplitudes articulaires) et de la facilité de réalisation des interventions chirurgicales, y compris des remplacements articulaires (49). La pharmacocinétique des antibiotiques chez le lapin est voisine de celle de l'homme, ce qui permet d'étudier de nouveaux traitements. Le lapin est considéré comme un animal de choix pour étudier certains aspects

physiopathologiques comme par exemple l'impact des facteurs de virulence du *Staphylococcus aureus in vivo* (25, 51). Enfin, ces animaux s'infectent plus facilement que les souris et les rats, et sont économiques, en particulier en comparaison à de gros animaux comme le mouton ou le porc (50). Néanmoins, ils ont une mauvaise tolérance digestive à certains antibiotiques (notamment la rifampicine et les carbapénèmes), pouvant induire de graves diarrhées, responsable d'un taux de mortalité plus élevé.

La majorité des modèles utilisent une souche de *Staphylococcus aureus* car il s'agit de l'agent pathogène le plus souvent en cause dans les infections ostéo-articulaires, et en particulier dans les infections articulaires péri prothétiques humaines. Il présente un tropisme articulaire et osseux qui en fait un sujet d'étude de choix. Mais d'autres bactéries sont en cause dans un certain nombre de cas d'infections péri prothétiques, et les souches utilisées ne sont pas forcément représentatives de celles en cause chez l'homme (52). En particulier, et cela est la principale limite de notre étude, aucun modèle n'utilisait une souche de staphylocoque à coagulase négative, qui sont fréquents chez l'homme (3). En effet, le but de la mise au point de modèles d'infections péri prothétiques chez l'animal reste la possibilité d'étude de la physiopathologie de telles infections et des possibilités thérapeutiques qui en découlent. Cela nécessite d'étudier des germes représentatifs de la population bactérienne retrouvée dans les infections ostéo-articulaires humaines. Par ailleurs, le fait que les modèles diffèrent à la fois quant aux animaux utilisés et quant aux matériaux prothétiques étudiés peut engendrer des difficultés de comparaison des différents modèles entre eux, ce qui constitue l'autre limite importante de notre étude.

e. Conclusion de notre étude (53)

L'inoculation directe est le mode de contamination expérimental le plus efficace pour obtenir une infection péri prothétique, mais cette procédure ne simule ni les infections par dissémination hémotogène ni par contiguïté.

Les modèles expérimentaux d'infection hémotogène sont plus délicats à mettre en œuvre, induisant des taux d'infection plus bas et une surmortalité.

**B. Description de notre modèle (25 ; 39-48)**

a. Modèle utilisé (Figure 2)



*Figure 2 : Lapin New Zealand*

Le modèle utilisé est un modèle chez le lapin Néo-Zélandais femelle, qui a montré sa similitude en matière d'infection osseuse avec l'homme (son comportement en cas d'infection osseuse est proche de l'homme).

Nous avons choisi des lapins de 10 à 12 semaines (en raison de la non-fermeture du cartilage de croissance à cet âge, favorisant ainsi l'ostéotomie tibiale), de 2,5 à 3 kg.

Chaque lapin était logé dans une cage individuelle avec un accès libre à la nourriture et à l'eau et un rythme jour-nuit reproduisant les conditions naturelles. Les animaux ont tous été traités conformément aux lois éthiques françaises concernant les animaux de laboratoire et le

protocole expérimental animal a été approuvé par le comité de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons Alfort.

b. Implant utilisé (Figure 3)



*Figure 3 : Implant utilisé*

L'implant utilisé était une prothèse tibiale en silicone, réalisée par un prothésiste dentaire, afin de s'adapter au mieux à l'anatomie de nos lapins. Elle est dérivée d'une arthroplastie de la première métatarso phalangienne humaine (Silastic, implant de gros orteil HP ; Swanson Design, Dow-Corning [fourni par Wright Medical France, Créteil, France]).

Le moule initial en résine de nos prothèses a été réalisé sur une prothèse en titane qui avait été utilisée dans une autre étude sur ce même modèle (Réalisation d'un moulage en plâtre de la prothèse en titane puis d'un contre-moule toujours en plâtre, mimant la forme de la prothèse, et enfin d'un moule de ce contre-moule en résine, afin de ne pas abîmer la prothèse initiale en titane).

Un seul modèle de prothèse a été réalisé afin de diminuer les variations entre les lapins. Elle mesurait 14 mm de longueur, cette distance étant insérée dans le canal médullaire tibial, et la tête de l'implant (remplaçant les plateaux tibiaux) mesurait 15 mm de diamètre pour 5 mm de hauteur.

Des essais d'autoclavage ont ensuite été réalisés pour s'assurer de la bonne qualité de la prothèse une fois stérilisée (passage à 121°C pendant 20 minutes).

### c. Technique opératoire

La technique opératoire était la même chez tous les lapins, réalisée par un chirurgien orthopédiste, afin de limiter la variabilité entre les lapins.

Le protocole d'anesthésie, également le même pour tous les lapins, était celui-ci concernant l'induction anesthésique :

- xylazine 0,25 ml/kg (laboratoire Bayer®),
- kétamine 0,25 ml/kg (laboratoire Virbac®),
- buprénorphine 0,1 ml/kg (laboratoire Axiance®).

L'entretien de l'anesthésie était assuré par de l'isoflurane 1% (Vetflurane, laboratoire Virbac®) à une dose comprise entre 1 et 2 litres par minute, en fonction de la profondeur de l'anesthésie observée chez nos lapins.

De l'oxygène à la dose de 1l par minute était administré au masque à haute concentration **(Figure 4)**.



*Figure 4 : Installation des animaux*

Les lapins avaient la patte arrière droite rasée au préalable.

Une solution d'iode (Vétédine®) était mise en place sur la patte arrière droite pour badigeonnage.

L'opération se déroulait sous anesthésie générale, en décubitus dorsal, les quatre pattes maintenues par des liens à la table (**Figure 5**).



*Figure 5 : Badigeonnage de la patte arrière droite des animaux*

La voie d'abord du genou était antéro-interne.

Une hémostase soigneuse était réalisée, notamment au niveau du cercle rotulien supéro-interne.

L'arthrotomie était réalisée, puis les ligaments croisés antérieur et postérieur ainsi que le ligament adipeux de Hoffa étaient excisés.

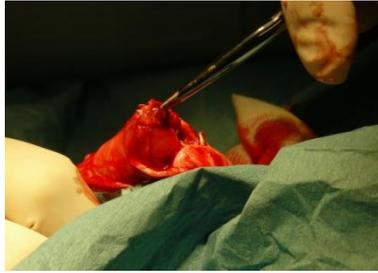
Les ménisques étaient également excisés.

Une ostéotomie des plateaux tibiaux était réalisée à la pince de Liston (**Figure 6**).



*Figure 6 : Ostéotomie des plateaux tibiaux*

Après cathétérisation du fût diaphysaire tibial à la curette (**Figure 7**), la prothèse en silicone était mise en place (**Figure 8**).



*Figure 7 : Cathétérisation du fût diaphysaire tibial*



*Figure 8 : Mise en place de la prothèse en silicone*

L'articulation du genou était alors réduite.

La capsule articulaire était ensuite refermée par des points en X au Vicryl® 3/0 résorbable (au début de l'étude puis par de l'Ethilon® 3/0 non résorbable en raison des nombreuses fistules purulentes observées).

La peau était fermée par des points séparés à l'Ethilon® 3/0 non résorbable (**Figure 9**).



*Figure 9 : Fermeture de l'incision cutanée*

En postopératoire, aucun pansement n'a été mis en place au niveau de la patte opérée.

Juste après la fermeture cutanée, on injectait contre la prothèse 0,5ml d'inoculum (**Figure 10**).



*Figure 10 : Inoculation*

Un patch de Fentanyl® (Janssen-CILAG SA, Issy-Les-Moulineaux, France) de 12µg/h a été mis en place au niveau du cou, préalablement rasé, afin de permettre l'analgésie pendant les 7 jours suivant l'opération (**Figure 11**).



*Figure 11 : Patch de Fentanyl® en place*

Au moment du sacrifice, 4 ml de pentobarbital était injecté dans une veine collatérale de la veine centrale de l'oreille, en intra veineux direct, pour l'euthanasie.

Toutes les autopsies étaient réalisées de la même façon, afin de prélever de l'os tibial, la prothèse et du liquide entourant la prothèse pour les analyses ultérieures.

Pour chaque lapin, étaient notés les poids, aspect de la cicatrice, aspect de l'os, aspect de la moelle osseuse, le poids de l'os prélevé et le positionnement de la prothèse au moment de l'autopsie (luxée ou en place).

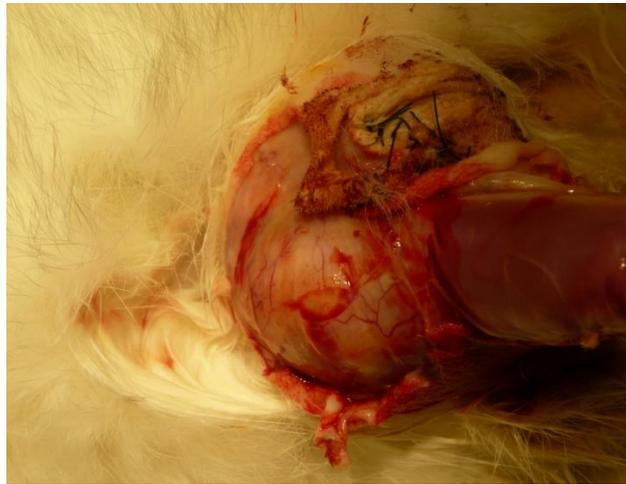
Des photographies étaient réalisées à différents moments de l'autopsie, chaque photographie comportant le numéro du lapin autopsié ainsi qu'une règle permettant de réaliser une échelle de mesure.

L'aspect de la cicatrice était étudié (**Figure 12**).



*Figure 12 : Etude de la cicatrice au moment du sacrifice*

Ensuite la peau était ouverte sur la cicatrice précédente (**Figure 13**).



*Figure 13 : Incision sur la cicatrice précédente au moment du sacrifice*

Puis, après avoir mis en place les champs opératoires, on visualisait le positionnement de la prothèse et le liquide l'entourant (pus franc dans l'exemple ci-dessous **Figure 14**).



*Figure 14 : Pus entourant la prothèse*

Le liquide et la prothèse étaient ensuite systématiquement prélevés et placés dans des tubes stériles (**Figure 15**).



*Figure 15 : Prélèvement du pus péri prothétique*

Puis le tiers supérieur du tibia était prélevé, en réalisant une ostéotomie tibiale basse.

Celui-ci était ensuite débarrassé des muscles à l'aide d'une rugine de Lambotte (**Figure 16**).



*Figure 16 : Aspect du tibia après excision de toutes les parties molles*

Après avoir noté d'aspect de l'os, celui-ci était ouvert longitudinalement pour permettre d'étudier l'aspect de moelle osseuse (**Figure 17**).



*Figure 17 : Aspect de la moelle osseuse*

Ensuite, l'os était placé dans un tube stérile après avoir été pesé.

L'os prélevé, la prothèse retirée, et le pus prélevé étaient placés dès leur prélèvement au frais, entre 2 et 8°C jusqu'au broyat de l'os (auto pulvérisateur MM200 ; Retsch GmbH, Haan, Allemagne) dans 20 ml d'eau stérile puis dilutions en séries (par ajout de 9 ml d'eau stérile dans 1 ml de la première suspension, en répétant cette opération 5 fois pour obtenir une dilution au 1/100 000ème), au passage dans un vortex des prothèses et à l'ensemencement des géloses au sang (Columbia agar au sang de mouton 5% bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) avec 100µl de chaque suspension diluée.

Les boîtes étaient ensuite placées à l'étuve (37°C) pendant 24 heures avant de déterminer le nombre de micro organismes viables. Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écarts types de  $\log_{10}$  CFU (Colony Forming Unit)/g d'os et en nombre d'animaux dont l'os a été effectivement stérilisé.

#### d. Etude des prothèses

Les matériels étrangers constituent des réserves potentielles de germes en raison de la présence du biofilm qui se développe à leur surface.

Les prothèses n'y font pas exception.

L'une des techniques récentes, la sonication, a été discutée dans le cadre de notre étude, car pouvant permettre de détacher les bactéries éventuellement encore fixées sur la prothèse.

Nous lui avons préféré la technique du passage dans un vortex, et ce pour différentes raisons :

- Une récente étude (54) a montré que la sensibilité entre le passage dans un vortex et la sonication n'est pas significativement différente, et leurs spécificités sont équivalentes,

- La littérature est riche d'articles consacrés à la sonication, depuis ces dernières années, mais les techniques décrites dans les articles sont souvent complexes, peu reproductibles facilement, et surtout sont très diverses, alors que le passage dans un vortex est standardisé, accessible et facile à réaliser,
- Le risque de contamination est important avec la sonication (55), à cause des différentes manipulations réalisées, alors que les manipulations sont plus réduites dans le cas du passage dans un vortex, ce qui pourrait réduire le risque de contaminations.

Nous avons donc appliqué le protocole suivant pour l'étude des prothèses :

- mise au frais entre 2 et 8°C dès l'ablation,
- passage dans un vortex pendant une minute dans 10 ml d'une solution BHI (Brain-Heart Infusion, bouillon cœur-cerveau), conformément aux recommandations de l'étude précédemment citée (54),
- dilution au 50ème puis ensemencement immédiat des boîtes de gélose au sang.

Cette technique est dérivée de celle réalisée dans l'article comparant la sonication au passage dans un vortex (54).

### **III. Evaluation dans un modèle expérimental d'infection sur prothèse à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline de l'efficacité d'une nouvelle classe d'antibiotique**

#### **A. Introduction**

La contamination péri opératoire est responsable de la plupart des infections péri prothétiques, qui sont principalement causées par *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermidis* (16). Ces micro organismes sont souvent résistants à de nombreux antibiotiques couramment

utilisés. À l'heure actuelle, la vancomycine ou la daptomycine, combinée à la rifampicine est recommandée comme thérapie de première ligne contre les infections ostéoarticulaires dues à SARM (17). Cependant, l'efficacité de la vancomycine pourrait ne pas être optimale lorsque la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la souche responsable est de 1 µg/ml (17, 45). Par ailleurs, des souches à sensibilité diminuée à la daptomycine ont été décrites dans des modèles d'infections péri prothétique et chez les patients sans traitement et chez ceux traités par vancomycine ou daptomycine (45, 51). Ainsi, des thérapies alternatives sont encore nécessaires.

## B. Utilisation de la ceftaroline (Figure 18)

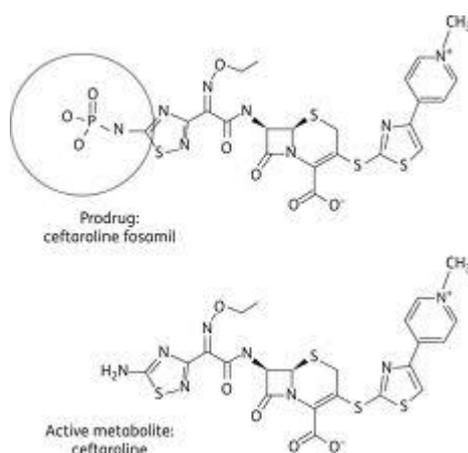


Figure 18 : Formules chimiques de la pro drogue (ceftaroline fosamil) et de la forme active (ceftaroline) :

La ceftaroline est un antibiotique de la famille des céphalosporines, à large spectre et possédant une haute affinité pour la protéine penicillin-binding protein 2a (PBP2a) synthétisée par les SARM et constituant la voie de résistance habituelle de ces bactéries (56).

La pro drogue (ceftaroline fosamil) est rapidement convertie *in vivo* en sa forme active (ceftaroline) (57).

Il s'agit ainsi de la première céphalosporine à large spectre ayant une activité anti-SARM.

En clinique, elle a démontré son efficacité dans les infections respiratoires (pneumopathies) sévères communautaires et les infections sévères de la peau et des tissus mous à bactérie à Gram positif et a déjà obtenu une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) dans ces indications (58).

La ceftaroline a aussi été testée dans des modèles expérimentaux d'infection à SARM sévère.

Des études ont été réalisées sur les endocardites (59) et sont prometteuses.

Dans les infections osseuses, une étude, dans un modèle lapin d'ostéomyélite aiguë, montrait une bonne pénétration de l'antibiotique au niveau osseux, une bonne diffusion et une efficacité bactéricide (60), mais l'efficacité *in vivo* de cette molécule n'a pas été testée dans un modèle d'infection péri prothétique à SARM.

Les principales caractéristiques de la ceftaroline sont :

- un  $T_{1/2}$  (temps au bout duquel la moitié de la ceftaroline a disparu) de 2,64 heures,
- une CMI<sub>90</sub> (Concentration Minimale Inhibitrice de 90% des colonies bactériennes) de 0,5 mg/l pour les SAMS (*Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline) et de 1 à 2 mg/l pour les SARM (61),
- une activité bactéricide *in vitro* qui est temps dépendante, tout comme pour la vancomycine,
- une stabilité du produit de 6h à température ambiante et de 24h à une température comprise entre 2 et 8°C après dilution de la poudre dans 20ml d'eau injectable (62),
- une conservation qui doit se faire au frais et à l'abri de la lumière quand elle sous forme de poudre.

### C. Objectif de l'étude

Nous avons cherché à montrer l'efficacité de cette nouvelle molécule dans les infections péri prothétiques de genou chez le lapin (mimant de façon proche une infection péri prothétique chez l'humain) en la comparant au traitement actuel de référence dans ce type d'infections : la vancomycine, seule ou en association à la rifampicine. L'émergence *in vivo* de souches avec des sensibilités diminuées à la vancomycine, la daptomycine, la rifampicine ou la ceftaroline chez les lapins non traités et traités était également étudiée.

### D. Matériel et méthodes

#### a. Souche bactérienne

La souche bactérienne que nous avons étudiée dans ce modèle est la souche ST 20121238, du centre de référence des infections à *Staphylococcus aureus* de Lyon, SARM sensible à la vancomycine et à la rifampicine. Elle a été isolée d'un patient porteur d'une infection de prothèse de genou. Sa virulence a été maintenue en réalisant des injections intra-péritonéales chez la souris.

Les CMI ont été déterminées par la méthode de l'Etest (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France). Pour les antibiotiques testés, elles étaient de : pour la vancomycine : 1mg/l, pour la ceftaroline : 0,38mg/l et pour la rifampicine : 0,006 mg/l. Un inoculum unique, ajusté à une norme McFarland de 0,5 dans de l'eau distillée a été utilisé. Puis des géloses au sang de Mueller-Hinton (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) ont été inoculées avec des écouvillons saturés avec une suspension de la souche et incubées pendant 18 h à 37 ° C. La CMI a été définie comme la valeur de l'intersection entre la zone d'inhibition et la bande de l'Etest.

Pour la préparation de l'inoculum (son calibrage), nous avons utilisé le protocole suivant :

- Une colonie isolée sur gélose au sang a été placée dans 10 ml de BHI pendant 24 heures, milieu riche et permettant une prolifération bactérienne,
- puis ce bouillon a été centrifugé 15 minutes à 3000 tours par minute,
- un culot de colonies a alors été récupéré,
- 10 ml de sérum physiologique ont été ajoutés à ce culot, puis le tout a été homogénéisé par passage dans un vortex,
- une nouvelle centrifugation identique à la première a été réalisée,
- ce deuxième culot de colonies a été récupéré, et y a été ajouté 10 ml de solution PBS (Phosphate Buffered Saline, solution permettant le maintien d'un pH (potentiel hydrogène) constant).

Ce protocole a permis d'obtenir un inoculum entre  $10^7$  et  $10^8$  CFU par ml d'inoculum pur, ce qui était notre objectif, compte-tenu des études antérieures.

#### b. Réalisation des courbes de bactéricidie

Les courbes de bactéricidie sont utilisées pour déterminer l'activité bactéricide des antibiotiques testés.

Nous avons déterminé l'activité bactéricide de la ceftaroline et de la vancomycine, seules ou en association avec la rifampicine.

Les cultures de toute une nuit étaient diluées dans 10 ml de bouillon Mueller-Hinton frais pour obtenir un inoculum de  $10^6$  CFU/ml. Les concentrations d'antibiotiques utilisées étaient équivalentes à 4 CMI pour la ceftaroline, la vancomycine ou la rifampicine. Après 0, 3, 6 et 24 h d'incubation dans une étuve à agitation à 37°C, des dilutions en série d'échantillons de 0,1 ml ont été sous-cultivées sur des géloses au sang de Mueller-Hinton (Bio-Rad) et incubées à 37 ° C pendant 24 h avant le compte du nombre de CFU.

Un effet bactéricide était défini comme une décroissance de l'inoculum initial supérieure ou égale à  $3 \log_{10}$  CFU/ml. Une synergie entre deux antibiotiques était définie par une décroissance supérieure ou égale à  $2 \log_{10}$  CFU/ml pour l'association versus son composant le plus actif après 24 h d'incubation.

### c. Protocole de l'étude

Le protocole expérimental de l'étude était le protocole décrit précédemment.

L'inoculum utilisé était de  $5.10^7$  CFU/ml dans une solution de PBS.

Au moins 12 lapins étaient randomisés pour constituer chacun des cinq groupes de traitement ou contrôle.

Les antibiotiques ont été démarrés à partir de j7 et étaient administrés par voie intramusculaire jusqu'à j14 inclus (1g de vancomycine Mylan® dilué dans 10 ml de sérum physiologique à 0,9%, et 600 mg de ceftaroline dilué dans 10 ml d'eau stérile).

La quantité de produit de dilution a été volontairement réduite afin de faciliter les injections chez les lapins. Les produits étaient parfaitement solubles dans 10 ml de soluté.

La vancomycine et la ceftaroline ont été administrées en monothérapie et en association à la rifampicine (12 lapins par groupe de traitement), tandis que 12 lapins (groupe témoin) ne recevaient aucun antibiotique, mais le même protocole opératoire.

Les lapins étaient tous sacrifiés à j17, selon le protocole déjà décrit plus haut, 3 jours après la fin du traitement antibiotique pour éviter une persistance d'antibiotique résiduelle dans l'os.

d. Choix des posologies

La posologie utilisée de ceftaroline (60mg/kg) a été établie d'après une étude précédente chez le même animal, dans l'ostéomyélite (60) et l'étude pharmacocinétique décrite ci-dessous.

La voie intra musculaire a été choisie car des études récentes sur le sujet ont montré une efficacité comparable entre la voie intra veineuse et la voie intra musculaire (56).

La dose de vancomycine administrée (60 mg/kg) est celle qui permet d'obtenir chez l'animal les concentrations sériques actuellement recommandées (17) et proches de ce qui est recommandé chez l'humain (concentration sérique de 15 à 20 mg/l).

La dose de rifampicine administrée conjointement à la vancomycine ou à la ceftaroline a été choisie également en fonction des études antérieures (60) ; la quantité de 10 mg/kg a été en effet choisie en raison de sa similitude des 900 mg/jour chez l'humain, ce qui correspond à la dose maximale utilisée chez l'homme.

e. Etude de la pharmacocinétique de la ceftaroline

Pour la réalisation de notre étude de la pharmacocinétique de la ceftaroline chez le lapin, nous avons utilisé 5 lapins sains.

Ils ont reçu chacun 3 doses de 60 mg/kg en intra musculaire (i.m.) de ceftaroline en 24 heures, posologie utilisée dans une étude précédente chez le même animal, dans l'ostéomyélite (60). Nous avons vérifié que nous obtenions des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques équivalents à ceux obtenus chez l'humain à des doses de 600 mg de ceftaroline intra veineuse (i.v.) deux fois par jour (c'est-à-dire des aires sous la courbes concentration-temps de 0 à 24 h, et des concentrations plasmatiques

supérieures à la CMI de la souche étudiée (ST20121238) pendant au moins 50% des 12 heures séparant 2 injections).

Des prélèvements ont été effectués à différents temps de la dernière injection (15 minutes, 1 heure, 2 heures, 4 heures, 6 heures, 8 heures, et 12 heures), chez chaque lapin, après rasage des oreilles, au niveau d'une veine collatérale de la veine centrale de l'oreille.

Les temps de prélèvements étaient jugés comme acceptables s'ils différaient de moins de 5 minutes par rapport au moment initialement prévu de collecte.

L'étude de la pharmacocinétique a été faite selon un cahier des charges imposé par le laboratoire distribuant la ceftaroline en France, AstraZeneca.

Les prélèvements ont été effectués à l'aide de seringues pré-refrigérées non héparinées, puis le sang a été immédiatement transféré dans des tubes pré-refrigérés contenant un anticoagulant de type fluorure de sodium et oxalate de potassium, puis agités doucement.

Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 1600 tours par minute pendant 15 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée à 6°C, dans l'heure qui a suivi chaque prélèvement, après avoir été réfrigérés dans de la glace.

Le sérum de chaque échantillon a ensuite été extrait puis placé dans deux tubes de polypropylène (100µl de sérum dans chaque tube), pour chaque prélèvement.

Tous les échantillons ont été ensuite immédiatement congelés à -70°C jusqu'au transport, le lendemain des prélèvements pour éviter l'hydrolyse de la ceftaroline.

Le transport a été réalisé dans de la Carboglace, garantissant une température de -70°C, surveillée par sonde thermique placée au contact des échantillons.

Les mesures ont été effectuées par le laboratoire AstraZeneca. Les échantillons ont été analysés par chromatographie liquide à spectrométrie de masse avec un spectromètre de masse triple quadripôle API4000 équipé d'un échantillonneur automatique Leap et d'un chromatographe liquide Shimadzu haute performance. Les paramètres pharmacocinétiques de base ont été calculés par Phoenix WinNonlin V6.2 en utilisant une analyse non compartimentée. La limite inférieure de la quantification était de 0,001 mg / litre.

f. Sélection *in vivo* des mutants résistants

Des analyses ont été faites de façon complémentaire à nos résultats afin de connaître l'éventuelle émergence de sous-population résistante à différents antibiotiques (vancomycine, ceftaroline, et daptomycine, (compte-tenu de l'émergence de résistance croisée avec la vancomycine et de présence de résistants à la daptomycine chez des lapins non traités dans des études précédentes (45)) dans les groupes traités par ceftaroline, vancomycine, rifampicine ou dans les groupes contrôles.

Seuls les lapins dont les cultures de broyat d'os, de passage dans un vortex des prothèses ou du pus présentaient au moins une colonie ont été analysés, à la fin de la période de traitement.

Ces analyses ont été effectuées par le Centre de Référence des Staphylocoques de Lyon.

Chaque homogénat d'os non dilué (50 µl) a étéensemencé sur une gélose de Mueller-Hinton II et sur une gélose de Mueller-Hinton II additionnée de vancomycine (0,25, 0,5, 1 ou 2 mg/litre), ceftaroline (0,125, 0,25 ou 0,5 mg/litre), ou daptomycine (0,5, 1 ou 2 mg/litre) en plus de chlorure de calcium (50 mg de Ca<sup>2+</sup>/ litre) pour détecter des mutants résistants potentiellement émergents après 72 h d'incubation à 37 ° C.

Lorsque la croissance bactérienne a été observée, les colonies ont été comptées et l'identification des *Staphylococcus aureus* a été confirmée par spectrométrie de masse (Vitek MS, bioMérieux). Un inoculum à une norme de 0,5 McFarland a été utilisé pour déterminer les CMI de la daptomycine, vancomycine, rifampicine, ceftaroline et oxacilline avec des Etests (bioMérieux). L'Etest a été lu après 20 h d'incubation à 37 ° C. Les résultats sont exprimés quantitativement comme le nombre de bactéries cultivées sur un milieu contenant les antibiotiques et sont rapportés comme le nombre de mutants/g d'os. Les mutants étaient définis comme ayant une CMI 3 fois supérieure à celle de la souche initiale.

#### g. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écarts types. La densité bactérienne dans l'os a été comparée entre les différents groupes de traitement par analyse de variance, suivi par un test de Scheffe pour analyse multivariée.

L'os était considéré comme stérile lorsque le nombre de CFU enregistrées était à la limite de la détection bactérienne ( $\log_{10}$  CFU/g d'os 1,64 à 1,84 en fonction du poids des échantillons).

L'analyse a été réalisée par un biostatisticien à l'aide du logiciel R.

Un résultat est significativement différent en cas de p. value (p) inférieure à 0.05.

### **E. Résultats (48)**

#### a. Etudes *in vitro*

- Les courbes de bactéricidie obtenues sont les suivantes pour 4 CMI (**Figure 19**) :

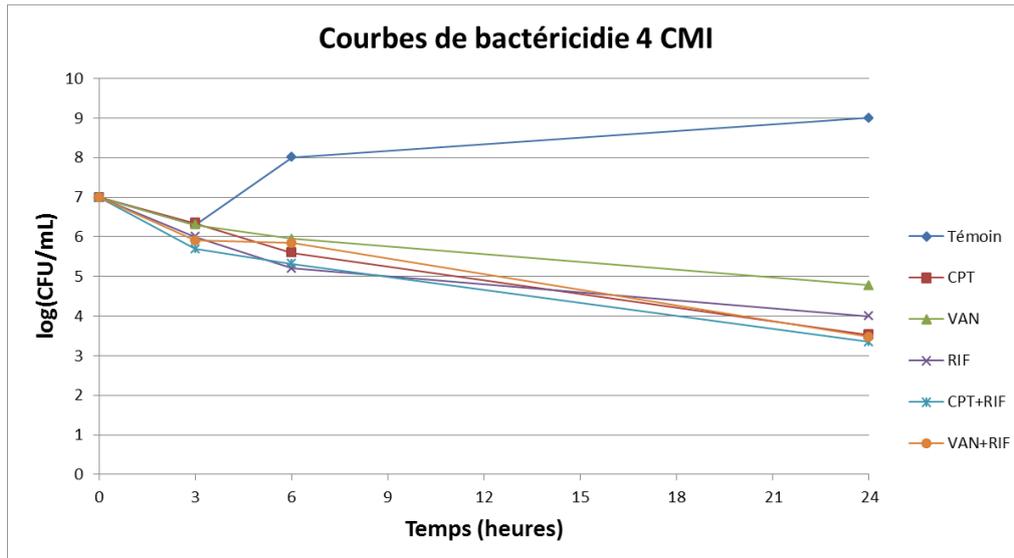


Figure 19 : Courbes de bactéricidie pour 4 CMI

On y montre une activité bactéricide de la ceftaroline avec et sans rifampicine visible à 24h. La rifampicine augmente légèrement la bactéricidie de la vancomycine et de la ceftaroline (respectivement d'environ  $2 \log_{10}$  CFU et  $1 \log_{10}$  CFU à 24 h).

- Les courbes de pharmacocinétique de la ceftaroline chez les animaux sains (**Figure 20**) ont été comparées aux données de la littérature chez l'homme. Après trois injections de ceftaroline (60 mg/kg i.m. deux fois par jour), la moyenne du pic de concentration plasmatique (15 minutes après l'injection) était de 37,9 mg/l à un temps maximal post injection d'une heure. La moyenne de l'aire sous la courbe entre 0 et 24 heures était de 76,2 mg.h/l.

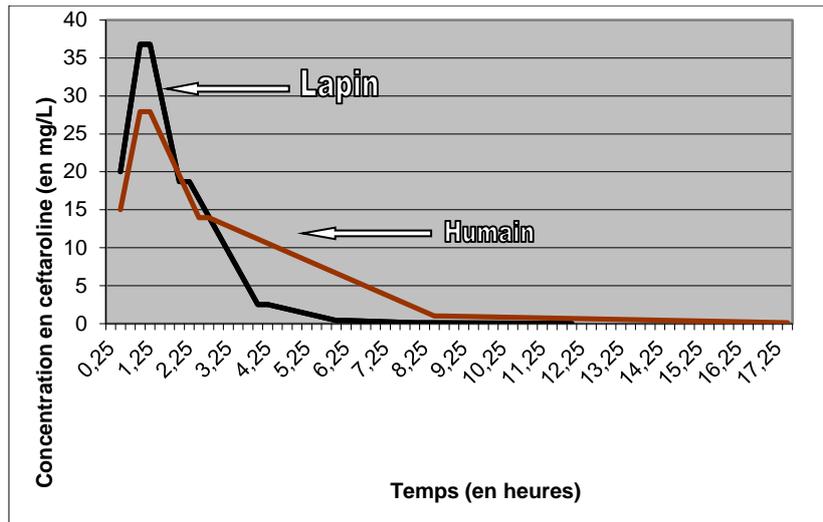


Figure 20 : Pharmacocinétique de la ceftaroline comparative lapin/humain (63)

Une bonne concordance de la pharmacocinétique entre l'homme et notre modèle a été trouvée, notamment en ce qui concerne les  $T_{max}$  (Temps au bout duquel la concentration maximale est observée),  $C_{max}$  (concentration maximale observée), et ASC (aire sous la courbe).

Le fait que la CMI de notre souche soit très basse (0,38mg/l) pour la ceftaroline, nous a permis de conserver notre protocole d'origine, car d'après notre étude pharmacocinétique, nous avons montré qu'en réalisant une injection toutes les 12 heures chez nos lapins, au moins 50% de la période passée entre deux injections espacées de 12 heures était au-dessus de la CMI.

#### b. Etude *in vivo*

Tous les animaux contrôles infectés avec la souche SARM ST20121238 avaient des cultures de broyat d'os ou de prothèse positives avec une moyenne  $\pm$  écart type de  $5,66 \pm 1,15 \log_{10}$  CFU/g d'os (**Tableau 4**). Seulement 3 des 12 animaux traités par ceftaroline et 3 des 12 animaux traités par vancomycine en monothérapie avaient des cultures d'os stériles, même si

la moyenne de la densité bactérienne dans l'os était significativement plus basse que pour le groupe contrôle ( $p < 0,01$ ). Les moyennes des comptes bactériens pour les groupes traités par ceftaroline ou vancomycine étaient comparables. L'association de la rifampicine à la ceftaroline ou à la vancomycine était significativement plus efficace que les monothérapies ( $p < 0,01$ ). Les associations vancomycine-rifampicine ou ceftaroline-rifampicine ont permis de stériliser l'os chez 12 sur 14 animaux dans chaque groupe. Les moyennes des comptes bactériens dans ces deux groupes étaient significativement plus basses que celles dans les groupes contrôle ou traités par un seul des deux antibiotiques ( $p < 0,01$ ) (**Figure 21**).

Tableau 3 : Efficacité comparative des antibiothérapies dans un modèle d'infection péri prothétique à SARM chez le lapin

Traitement <sup>a</sup>	Nombre d'animaux avec un os stérile/ nombre total d'animaux	log <sub>10</sub> CFU/g d'os (moyenne ± Ecart type)
Aucun	0/14	5.66 ± 1.15
ceftaroline	3/12	2.96 ± 0.92 <sup>b</sup>
vancomycine	3/12	3.51 ± 1.10 <sup>b</sup>
ceftaroline + rifampicine	12/14	1.87 ± 0.46 <sup>c</sup>
vancomycine + rifampicine	12/14	1.91 ± 0.46 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Pendant 7 jours, les lapins ont reçu de la ceftaroline (60 mg.kg i.m. deux fois par jour), ou vancomycine (60 mg.kg i.m. deux fois par jour) seul ou en association avec de la rifampicine (10 mg/kg i.m. deux fois par jour).

<sup>b</sup> Significativement différent versus les contrôles ( $P < 0.01$ ).

<sup>c</sup> Significativement différent versus la monothérapie ( $P < 0.01$ ).

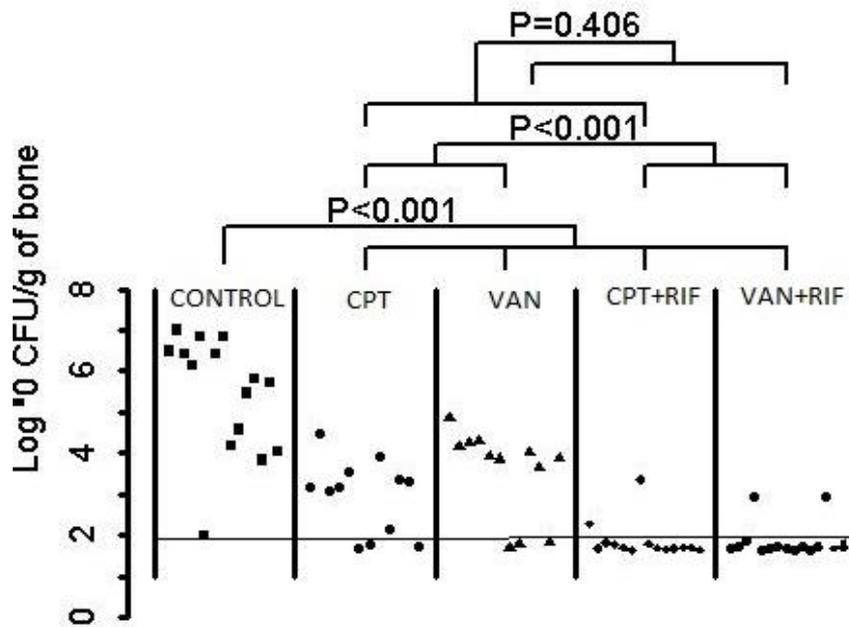


Figure 21 : Représentation graphique des résultats étude ceftaroline versus vancomycine

VAN : Vancomycine

CPT : Ceftaroline

RIF : Rifampicine

NB. Les points sous la ligne noire horizontale représentent des animaux avec un os stérile

### c. Recherche de mutants résistants

Les résultats sont les suivants :

- Aucune émergence de mutants résistants n'a été détectée vis-à-vis de la ceftaroline, la vancomycine ou la rifampicine dans les groupes traités ou non traités.
- Pour la daptomycine (**Tableau 4**):
  - 3 des 14 lapins non traités ont présenté une sous-population résistante sur les milieux à la daptomycine (CMI entre 0.75 et 1mg/L) avec plus de 100 CFU mutantes/g d'os.
  - 3 des 9 lapins traités à la vancomycine ont présenté une sous-population résistante (CMI entre 0.5mg/l et 1.5mg/l) avec 3 à plus de 100 CFU mutantes /g d'os.

- aucune émergence de sous-population résistante dans les groupes ceftaroline seule ou ceftaroline-rifampicine ou vancomycine-rifampicine.

Tableau 4 : Emergence de mutants résistants à la daptomycine

Traitement	Emergence de mutants résistants <sup>a</sup> à la daptomycine <sup>b</sup>		
	Vancomycine CMI initiale : 1mg/l	Daptomycine CMI initiale : 0,064mg/l	Ceftaroline CMI initiale : 0,38 mg/l
<b>Aucun</b>	0/14	3/14	0/14
<b>ceftaroline</b>	0/9	0/9	0/9
<b>vancomycine</b>	0/9	3/9	0/9

<sup>a</sup> Un mutant résistant est défini par une augmentation de la CMI, trois fois supérieure à la CMI de la souche initiale.

<sup>b</sup> nombre de lapins ayant une émergence de mutants résistants à la daptomycine sur le nombre total de lapins traités par groupe.

Pour les 6 lapins ayant une émergence de mutants résistants à la daptomycine, nous avons constaté une diminution de la CMI de l'oxacilline (effet appelé seesaw (64)). En revanche, les CMI de ces souches pour la ceftaroline et la vancomycine demeuraient inchangées (**Tableau 5**).

Tableau 5 : CMI des souches résistantes à la daptomycine montrant l'effet seesaw chez les 6 lapins

Traitement et numéro de lapin	CMI (mg/l) pour :			
	Vancomycine CMI initiale : 1mg/l	Daptomycine CMI initiale : 0,064 mg/l	Ceftaroline CMI initiale : 0,38 mg/l	Oxacilline CMI initiale : 1 mg/l
Contrôle 1	2	0,75	0,5	0,19
Contrôle 2	2	0,75	0,5	0,25
Contrôle 4	2	1	1	0,38
Vancomycine 21	2	0,5	0,5	0,38
Vancomycine 30	2	1,5	0,5	0,38
Vancomycine 38	2	1,5	0,5	0,38

## F. Discussion

Cette étude montre que l'efficacité de la ceftaroline, à une dose équivalente chez l'humain à 600 mg i.v. (63), seule ou combinée avec la rifampicine dans un modèle d'infection péri prothétique de genou chez le lapin à SARM, est comparable au traitement de référence par vancomycine.

Contrairement au linézolide, la ceftaroline était bactéricide *in vivo* dans un modèle d'endocardite à SARM chez le lapin (59). Dans ce modèle, l'efficacité du linézolide ne diffère pas de celle de la vancomycine. Dans un modèle lapin d'ostéomyélite aigue à SARM (60) la ceftaroline a considérablement diminué les densités bactériennes dans le liquide articulaire, la moelle osseuse et dans l'os, alors que la vancomycine était peu active et ne provoquait aucune réduction significative des densités bactériennes après 4 jours de traitement. Une association avec la rifampicine n'a pas été testée.

Dans notre modèle d'infection péri prothétique, les monothérapies par vancomycine et ceftaroline étaient efficaces. L'association avec la rifampicine a augmenté leur efficacité et le nombre d'animaux avec os stérilisés. Cette augmentation remarquable de l'efficacité obtenue avec l'adjonction de rifampicine n'est pas surprenante. Elle a été précédemment décrite dans le même modèle (45) et dans d'autres modèles d'infections ostéo articulaires avec d'autres médicaments complémentaires (65) et est dû à l'activité bactéricide de la rifampicine contre des bactéries à croissance lente (16).

Nous avons précédemment montré l'émergence de mutants résistants à la daptomycine chez des animaux non traités (45). L'émergence naturelle de souches mutantes résistantes à la daptomycine pourrait refléter l'exposition de l'organisme aux peptides cationiques de défense de l'hôte endogène, parce que ces souches présentaient une résistance croisée à ces peptides (51). Une émergence des mutants résistants similaire a été observée ici, ce qui confirme la reproductibilité de ce phénomène. Ces mutants résistants à la daptomycine sont aussi retrouvés chez les animaux traités par vancomycine bien que leur CMI à la vancomycine soit inchangée (45). L'émergence de souche résistante à la daptomycine chez des patients traités par de la vancomycine a déjà été décrite et elle explique qu'il faille utiliser la daptomycine avec prudence en cas d'échec de la vancomycine (66). En revanche, aucune émergence de souche résistante à la daptomycine n'a pu être détectée chez les lapins traités par ceftaroline (pas de résistance croisée). Fait intéressant, les CMI de l'oxacilline de toutes ces souches mutantes ont été diminuées plus de 2 fois, ce qui suggère un effet seesaw oxacilline-daptomycine déjà décrit (51).

La ceftaroline, en monothérapie ou en association pourrait être ainsi être une option thérapeutique en cas d'échec thérapeutique lié à l'émergence de souches résistantes à la daptomycine. En effet, les observations cliniques (67) et les données *in vitro* (68) suggèrent

que l'ajout de la ceftaroline à la daptomycine pourrait restaurer la sensibilité à la daptomycine des souches résistantes à la daptomycine (67).

### **G. Limites de cette étude**

Le modèle utilisé dans cette étude a été validé depuis de nombreuses années désormais (25), et a fait l'objet de plusieurs publications.

Les limites de cette étude sont les suivantes :

- Aucun geste de débridement chirurgical n'a été pratiqué ici (ce qui est fait en pratique chez l'homme), car nous souhaitons être dans les conditions les plus défavorables au nouveau traitement antibiotique pour montrer sa réelle efficacité,
- Comme dans la plupart des études expérimentales, nous avons utilisé une souche de SARM unique. La CMI de cette souche était inférieure à la CMI<sub>90</sub> des SARM (69), et une dose de ceftaroline plus élevée pourrait être nécessaire pour les souches qui ont des CMI plus élevées,
- D'un point de vue statistique, une étude de non infériorité aurait nécessité beaucoup plus d'animaux, ce qui n'était éthiquement pas possible,
- Par ailleurs, nous avons utilisé un implant en élastomère de silicone et les résultats microbiologiques peuvent être modifiés par l'utilisation d'autres composés par exemple, des implants métalliques, tels que le titane ou l'acier inoxydable qui sont souvent utilisés en chirurgie orthopédique,
- Enfin, le traitement a été commencé 7 jours après l'inoculation pour simuler une infection postopératoire aigue et les antibiotiques pourraient être moins efficaces contre une infection plus chronique.

## H. Conclusion

La ceftaroline apparaît une alternative intéressante à la vancomycine, à un moment où l'écologie des infections ostéo-articulaires semble évoluer vers des germes résistants dans le cadre des infections péri prothétiques à SARM.

La combinaison avec la rifampicine permet d'obtenir une bi thérapie plus efficace que la mono thérapie.

La ceftaroline est déjà utilisée dans d'autres indications comme les infections pulmonaires à SARM ou les infections de la peau ou des tissus mous à ce même genre de germes.

Une récente étude chez l'homme (70) a montré que la ceftaroline pouvait être intéressante dans un certain nombre d'infections péri prothétiques chez l'homme. Des études cliniques prospectives sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

## IV. Création d'un modèle d'infection péri prothétique à *Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapénémase, et étude de l'efficacité de la colistine locale seule ou associée à la colistine systémique et/ou au méropénème systémique

### A. Introduction

Depuis le début du 21ème siècle, nous sommes confrontés à l'émergence dramatique des bacilles à Gram négatif multi résistants aux antibiotiques, notamment les entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre élargi (ESBL) et de carbapénémases (EPC) (71) nécessitant le recours à des agents antibactériens déjà anciens et souvent abandonnés en raison de leur toxicité.

La plupart des infections sévères liées à des EPC sont des bactériémies ou des atteintes pulmonaires et urinaires survenant chez des patients hospitalisés avec des pathologies sous-jacentes (72). Cependant dans une récente étude (72), 10% des patients ayant des prélèvements microbiologiques (tous confondus) positifs à KPC étaient atteints d'une infection ostéo-articulaire (1,3% avaient une infection péri prothétique).

Dans ce type d'infection, la morbidité (amputations notamment), mais surtout la mortalité est très élevée (près d'un tiers de décès chez ces patients atteints d'une infection péri prothétique à KPC (19)). Les KPC sont souvent résistantes à presque tous les antibiotiques disponibles en dehors de la colistine et de la tigécycline.

Le traitement optimal de ces infections est largement méconnu et est difficile à évaluer cliniquement en raison de l'hétérogénéité des infections (24).

La colistine, un antibiotique polypeptidique des années 1950, a été abandonnée dans les années 1970 en raison de sa néphrotoxicité et a été réintroduit dans les années 2000 en raison de l'augmentation des entérobactéries multi résistantes aux antibiotiques (73) et de l'absence de nouveaux antibiotiques efficaces. Elle est administrée par voie systémique sous la forme de colistine méthanesulfonate (CMS) hydrolysée en colistine qui est la forme active. La néphrotoxicité et la neurotoxicité de la colistine sont dose-dépendantes ce qui limite la posologie utilisable par voie systémique (73).

Dans un travail en cours concernant les ostéites expérimentales à KPC, nous avons montré que la colistine associée au méropénème était le traitement le plus efficace par voie systémique. Cependant cette efficacité était limitée puisque aucun animal n'était stérilisé. De

plus, des bactéries résistantes à la colistine ont été isolées après traitement des animaux par voie systémique.

Pour essayer de contourner le problème de la néphrotoxicité, la colistine méthanesulfonate a été utilisée par voie locale dans les infections liées à des BMR et difficiles à traiter telles que les infections pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucovicirose (74) ou chez des patients sous ventilation mécanique (75). Ces infections sont en effet difficiles à éradiquer en raison de la présence de biofilm (76).

En orthopédie, les ciments imprégnés d'antibiotiques sont utilisés en prophylaxie mais aussi en curatif notamment lors de la reprise en 2 temps des infections sur prothèse (77). L'objectif de ces ciments est d'augmenter la concentration locale des antibiotiques tout en évitant la toxicité liée à leur utilisation systémique (78). Des ciments à la colistine ont été utilisés en prophylaxie pré opératoire (79-80) ou en curatif (81) dans certains cas d'infections ostéoarticulaires liée à des bactéries à Gram négatif résistantes à tous les antibiotiques sauf la colistine et notamment des *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants (81-82). L'incorporation au ciment est rendu possible par la stabilité de cette molécule (83). L'augmentation récente des entérobactéries productrice de carbapénemases a renouvelé l'intérêt du ciment imprégné de colistine pour le traitement des infections péri prothétiques à KPC.

## **B. Objectifs de cette étude**

- 1- Créer un modèle d'infection péri prothétique aigue à KPC.
- 2- Tester dans ce modèle l'efficacité de la colistine locale, seule ou en association avec l'administration systémique de colistine ou de l'association de colistine-méropénème et étudier l'éventuelle émergence de mutants résistants.

## C. Matériels et méthodes

### a. Description du modèle d'infection péri prothétique aigue à *Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapénémase et du deux temps chirurgical

Le modèle mis au point s'est largement inspiré du modèle créé pour les infections staphylococciques dans notre équipe (25). Seules les différences par rapport à ce modèle sont précisées ici.

Immédiatement après la chirurgie, les animaux étaient infectés avec  $5.10^8$ CFU de KPC99YC dans un volume de 0,5 ml, dans le genou, directement au contact de la prothèse. A j2 des hémocultures étaient prélevées.

Sept jours après le début de l'infection, l'ablation de la prothèse et une synovectomie étaient réalisées ainsi qu'un prélèvement local à visée bactériologique. Un espaceur en ciment était mis à la place, imprégné ou non d'antibiotiques.

Le délai de 7 jours a été choisi après avoir effectué des séries préliminaires qui ont montré qu'avec des temps plus tardifs de reprise (J10, J14 et J31) la cicatrice était souvent ouverte au moment du sacrifice, avec des co-contaminations fréquentes et parfois même des animaux ayant spontanément stérilisé leur articulation.

Les animaux étaient sacrifiés 14 jours après la chirurgie initiale par injection de pentobarbital (4 ml pour chaque lapin), en intraveineux dans une veine latérale auriculaire. La cicatrice était reprise et l'espaceur retiré. Les 3 premiers centimètres supérieurs du tibia en contact avec l'espaceur étaient prélevés pour compte bactérien selon la technique déjà décrite plus haut. Le pus péri espaceur était également prélevé.

Des prélèvements ont également été effectués sur les reins et sur la rate chez l'ensemble des lapins dans ce protocole, les infections généralisées étant fréquentes avec ce type de bactérie.

Pour cela, des fragments de rein et de rate étaient prélevés dans des flacons stériles puis pesés et broyés dans 1 ml de sérum physiologique avant ensemencement de géloses au sang, permettant un compte bactérien au bout de 24 à 48 heures.

Par ailleurs, avant chaque opération, reprise, ou sacrifice, tous les lapins étaient pesés, en comparaison avec le poids de référence précédent, car l'absence de perte de poids est un des critères objectifs d'absence de diffusion systémique de la bactérie, en temps réel, ne nécessitant pas le sacrifice des animaux.

b. Choix de la souche

Notre choix s'est porté sur la KPC99YC car elle représente une souche (84) relativement résistante, tous en restant sensible à la colistine comme l'indique l'antibiogramme réalisé ci-dessous (**Tableau 6**) :

Tableau 6 : Antibiogramme de la souche KPC99YC

	E-test	Diamètre (en mm)	Vitek
Colistine :	0.25	18	Sensible
Imipénème :	0.5	21	8 Intermédiaire
Ertapénème :	3		Résistant
Méropénème :	1.5		
Doripénème :	1.5		
Fosfomycine :	12 + repiquage 24	15	Sensible
Gentamicine :	8	19	4 Intermédiaire ou Résistant
Rifampicine :	>32		

Elle est issue d'un patient ayant eu une bactériémie à point de départ urinaire et isolée par le laboratoire de bactériologie de la Croix Rouse à Lyon.

Nous avons choisi un inoculum élevé ( $5.10^8$  soit  $1.10^9$  par ml) en rapport avec les inoculi utilisés dans la littérature en matière d'infection ostéo-articulaire (en particulier ostéomyélites) à bactéries à Gram négatif (28).

### c. Préparation de l'inoculum

Elle est proche de la préparation de l'inoculum pour le SARM :

- Une colonie isolée sur gélose au sang a été placée dans 10 ml de BHI pendant 24 heures, milieu riche et permettant une prolifération bactérienne,
- puis ce bouillon a été centrifugé 15 minutes à 3000 tours par minute,

- un culot de colonies a alors été récupéré,
- 5 ml de sérum physiologique ont été ajoutés à ce culot, puis le tout a été homogénéisé par passage dans un vortex,
- ce dernier culot constituait l'inoculum à  $1.10^9$  CFU/ml.

#### d. Traitement antibiotique

##### a. Fabrication des espaceurs chargés à la colistine

La dose choisie pour l'incorporation de la colistine dans le ciment était celle décrite dans la littérature (78), élevée, de 3 MUI (million d'unités internationales)/40g de ciment.

L'espaceur en ciment imprégné d'antibiotiques a été obtenu en mélangeant 3 MUI de poudre de sulfate de colistine (Sanofi-Aventis, France) avec 40 g de polymère de ciment en poudre avant l'addition de méthacrylate de méthyle, comme en pratique clinique et selon les instructions du fabricant (CMW Ciment osseux radio-opaque, DePuy CMW, Blackpool, Angleterre). Il a ensuite été moulé pour reproduire un fac-similé de la prothèse de silicone dans un moule stérile.

Le choix de l'antibiotique est très important car celui-ci doit être actif sur la souche choisie et se mélanger correctement au ciment pour ne pas altérer ses propriétés mécaniques. Cependant, le choix du ciment lui-même est important pour la même raison de maintien des propriétés mécaniques de celui-ci. Une étude récente (85) a montré qu'en mélangeant une matrice de ciment existant (CMW1® du laboratoire DePuy, PMMA (polyméthylméthacrylate)), avec 2,5 % de minocycline et 10% de lactose, on obtenait un ciment aux mêmes propriétés mécaniques et structurales que le ciment original, et une activité antibactérienne (anti-staphylococcique) de 7 jours. Dans une autre étude (86), 2 g de daptomycine dans 40 g de ciment PMMA ne modifiait pas les propriétés mécaniques.

D'autres types de ciment ont été testés, dont un, biodégradable, qui aurait pu nous intéresser, le polypropylène fumarate, qui est complexe à reconstituer, et l'étude (87) dans laquelle il a été utilisé pour traitement d'ostéomyélites expérimentales chez le rat ne montrait pas de différence significative sur son efficacité avec le PMMA, et donc ne présentait pas d'intérêt particulier.

Un autre ciment a été créé (88), plus poreux, afin d'augmenter la quantité d'antibiotique, et la durée d'action de celui-ci. Mais là aussi, le protocole de fabrication était fastidieux, et aucune analyse biomécanique n'ayant été réalisée, nous n'avons pas opté pour ce ciment.

La plupart des ciments utilisés aujourd'hui dans les études, citées ci-dessus, pour l'imprégnation d'antibiotiques, sont des ciments de type PMMA, précisément pour ses propriétés mécaniques particulièrement proches de l'os humain. C'est celui qui est utilisé depuis les années 70 dans ce but et que nous avons choisi pour notre étude.

Par ailleurs, le dernier problème posé par l'incorporation au ciment est la température de polymérisation de celui-ci, qui étant élevée, pourrait rendre inefficace certains antibiotiques. Nous avons vu que cela n'était pas le cas pour la colistine (83 ; 89). Le ciment chauffé jusqu'à une température proche de 80°C au cœur de celui-ci. Or la colistine est stable jusqu'à 100°C pendant 15 minutes (83). Ceci nous a permis de confirmer la possibilité de l'incorporer au ciment.

b. Etude de l'éluion *in vitro* de colistine à partir du ciment à la  
colistine

L'évaluation *in vitro* de la diffusion de colistine à partir de six échantillons congelés des espaceurs imprégnés a été mesurée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

avec détection de spectrométrie de masse. La limite inférieure de quantification était de 62,5 ng / ml de colistine (A + B).

Six échantillons d'espaceur ont été immergés dans 10 ml d'une solution saline isotonique placée à 37 ° C sous agitation à 125 tours / minute.

250 µl de la solution saline ont été éliminés après 1, 4, 8, 24, 48, 72 heures et 7 jours. Les échantillons d'éluion ont été stockés à 20 ° C jusqu'à l'analyse.

c. Choix des posologies de colistine et de méropénème administrés par voie systémique

Afin de déterminer les doses de colistine et de méropénème pour le traitement systémique, nous avons tout d'abord étudié la littérature, assez pauvre sur le sujet.

Un article (90), utilisant de faibles doses de colistine (5 mg/kg toutes les 12 heures) avec une souche d'*Acinetobacter baumannii* dans un protocole d'endocardite expérimentale a servi à fixer la posologie initiale. Celle-ci a été secondairement augmentée pour obtenir des concentrations comparables à celles obtenues chez l'homme après utilisation des posologies recommandées (3MUI trois fois par jour en i.v.).

Nous n'avons retrouvé aucune étude expérimentale concernant l'étude du méropénème, et nous avons donc décidé de réaliser des cinétiques concernant cet antibiotique pour déterminer la posologie idéale.

e. Courbes de bactéricidie

La méthodologie utilisée est la même que pour la souche de SARM.

f. Recherche de mutants résistants

Des analyses ont été faites de façon complémentaire à nos résultats afin de connaître l'éventuelle émergence de sous-population résistante à la colistine.

Seuls les lapins dont les cultures de broyat d'os, de passage dans un vortex des prothèses ou du pus présentaient au moins une colonie de notre souche ont été analysés.

Ces analyses ont été effectuées par le Centre de Référence des Staphylocoques de Lyon.

g. Analyse statistique

L'analyse a été réalisée par un biostatisticien à l'aide du logiciel R.

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écarts types. La densité bactérienne dans l'os a été comparée entre les différents groupes de traitement par analyse de variance, suivi par un test de Scheffé pour analyse multivariée.

Un résultat est significativement différent en cas de p. value inférieure à 0.05.

## **D. Résultats**

a. Cinétique de la colistine

Nous avons donc étudié la cinétique de la colistine en injectant chez 4 lapins sains 12 mg/kg de colistine et en mesurant les deux sous-composés A et B de la colistine par chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse. Nous avons obtenu les résultats suivants (**Figure 22**).

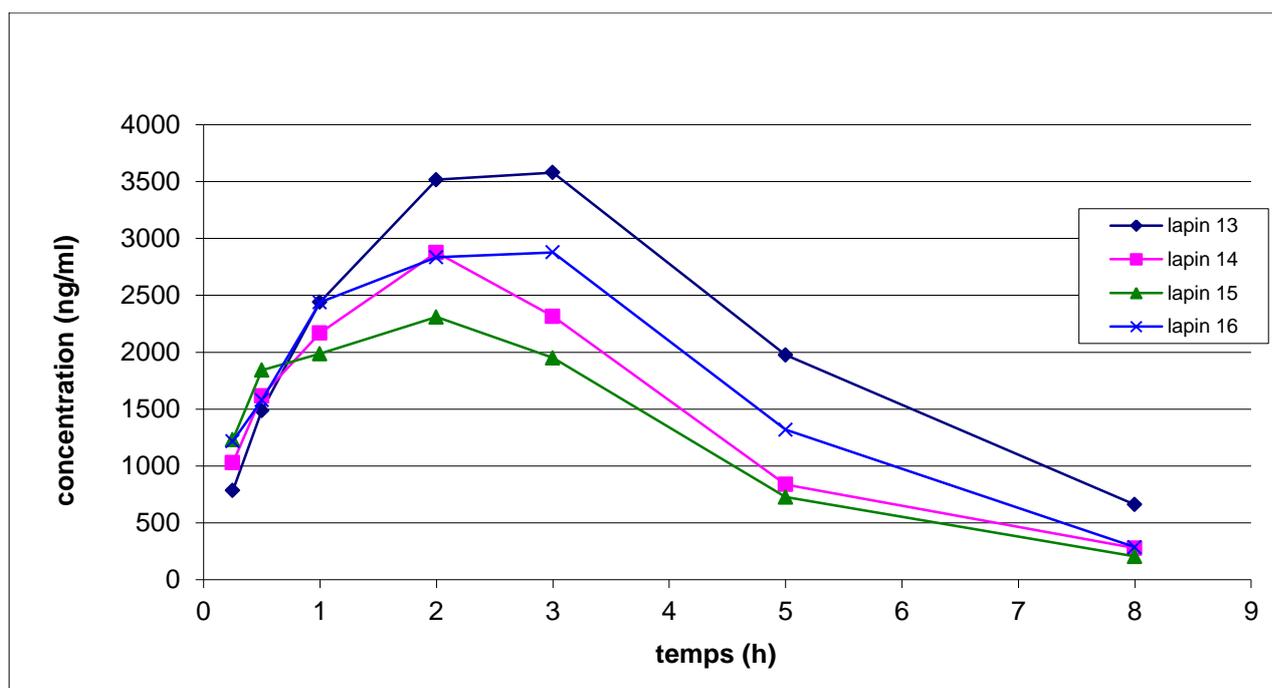


Figure 22 : Dosages colistine (A+B) lapins 13-16

Cette courbe a été comparée à la courbe observée chez l'homme (91).

Les données étant comparables aux données humaines, cette dose de 12 mg/kg toutes les 8 heures a été conservée.

#### b. Cinétique du méropénème

Aucune donnée expérimentale concernant le méropénème chez le lapin n'étant présente dans la littérature, nous avons déterminé la dose administrée à nos animaux par étude de la cinétique à différentes doses : 250 mg/kg et 125 mg/kg. Ces deux posologies entraînaient des diarrhées profuses, et parfois mortelles chez les lapins, ce qui nous a amenés à finalement utiliser la dose de 80 mg/kg toutes les 8 h dont les pics et résiduelles ont été dosés chez les animaux infectés et la cinétique sur 24 heures modélisée.

c. Elution de la colistine dans l'espaceur en ciment

Les résultats *in vitro* sont exprimés en pourcentages de colistine libérée des espaceurs en ciment vers un milieu d'immersion (quantité libérée chaque jour / quantité totale) (**Figures 23 et 24**).

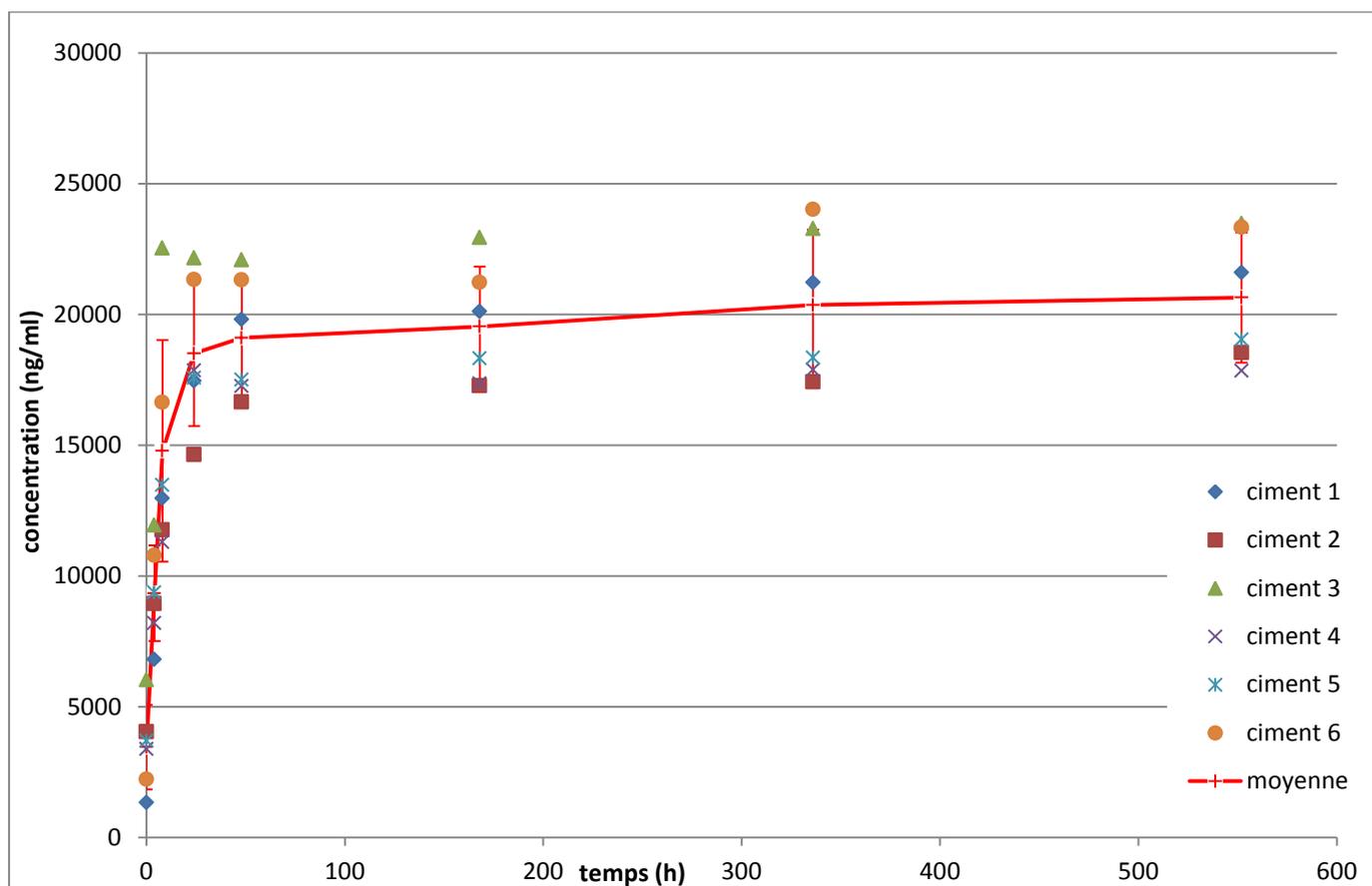


Figure 23 : Concentrations de colistine (A+B) mesurées dans les éluats de ciment surchargés et baignés dans le NaCl 0,9%

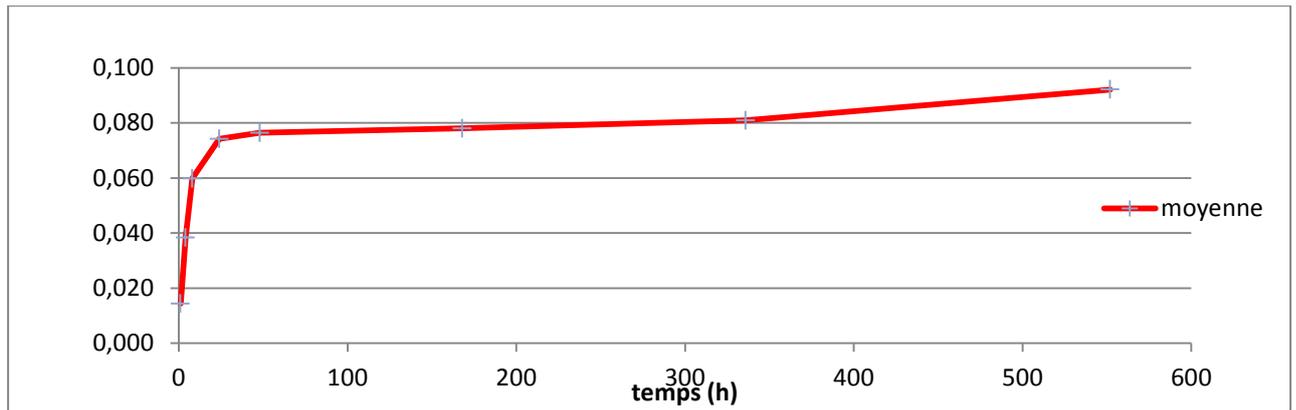


Figure 24 : Pourcentage de colistine élué par rapport à la quantité initiale

Au total le pourcentage de colistine éluée à partir de l'espaceur était de 0.09% (plus faible que les 3.4% retrouvés dans l'étude de Gasparini (78), mais qui ne portait pas sur la même formulation de colistine).

La souche choisie étant résistante aux carbapénèmes, seule la colistine a été mise en place dans les espaceurs.

#### d. Courbes de bactéricidie

Les courbes ont été étudiées pour un inoculum à  $5.10^4$  CFU/ml, correspondant à 4 fois la CMI (**Figure 25**).

On voit sur ces courbes une bonne activité de la colistine seule jusque vers 9h, et une synergie importante de l'association colistine-méropénème.

Colis : Colistine

Mero : Méropénème

Manip : manipulation

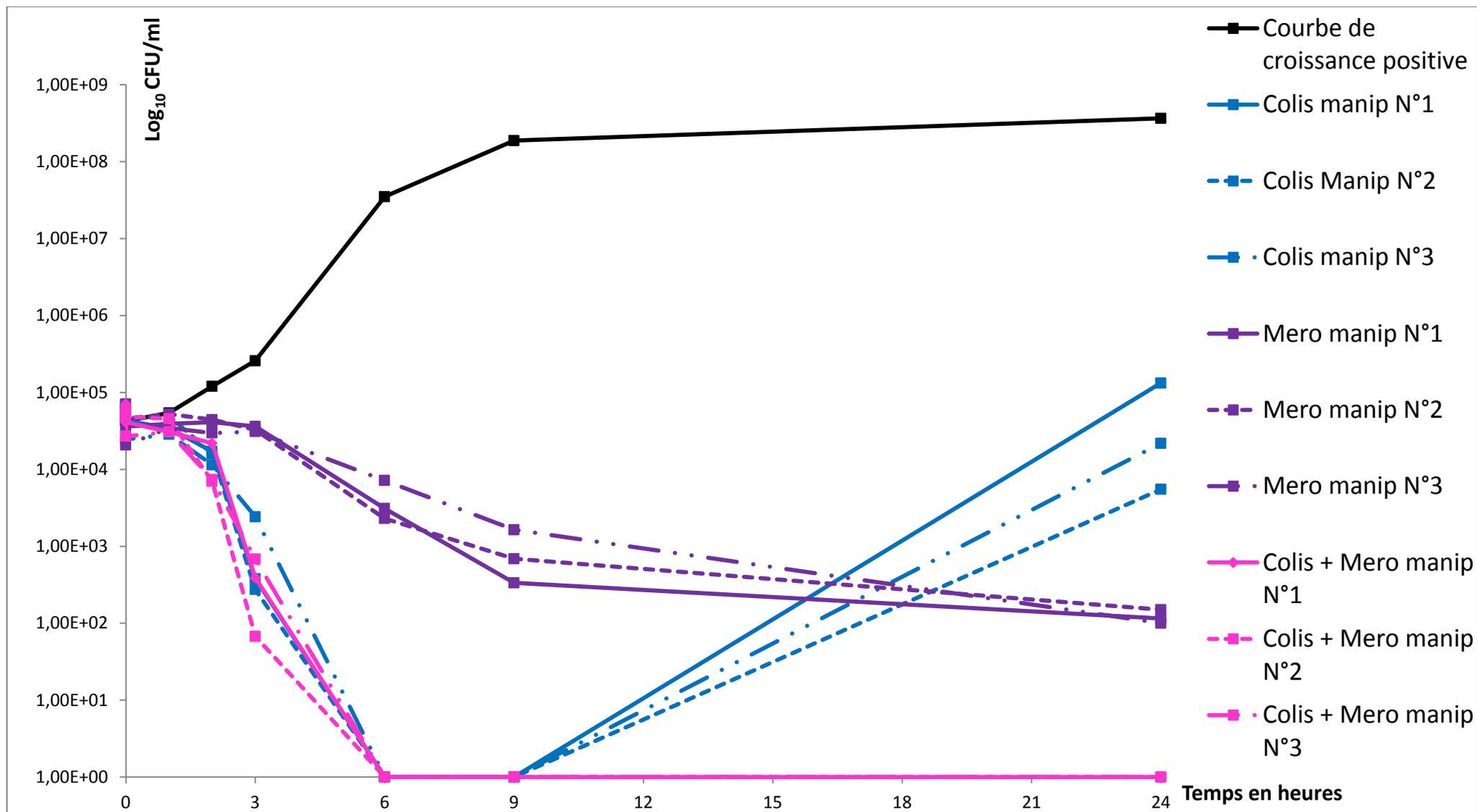


Figure 25 : Courbes de bactéricidie de la souche KPC99YC en présence de colistine à 4 mg/l, de méropénème à 16 mg/l (= 4xCMI), et d'une association, colistine-méropénème

e. Résultats de l'étude *in vivo* (Tableau 7)

Nous n'avons pris en compte dans l'analyse de nos résultats, que les lapins qui ne sont pas morts prématurément :

- les lapins morts avant j7 n'ont pas pu recevoir de traitement donc ne peuvent entrer dans le protocole complet de l'étude,
- les lapins non infectés à j7 (sur les prélèvements bactériologiques effectués au moment de la reprise chirurgicale) ont été exclus de l'analyse.

Tableau 7 : Efficacité comparative des antibiothérapies dans un modèle d'infection péri prothétique à KPC chez le lapin

Traitement <sup>a</sup>	Nombre d'animaux avec un os stérile/ nombre total d'animaux	log <sub>10</sub> CFU/g d'os (moyenne ± Ecart type)
Aucun	1/11	5.9±1.6
Colistine systémique <sup>a</sup>	3/10	4.1±2.0 <sup>c</sup>
Colistine locale <sup>b</sup>	3/12	4.0±2.4
Colistine systémique <sup>a</sup> et locale <sup>b</sup>	5/9 <sup>c</sup>	2.5±1.5 <sup>c</sup>
Colistine + méropénème <sup>a</sup> systémique <sup>a</sup> + colistine locale <sup>b</sup>	8/12 <sup>c</sup>	3.0±2.0 <sup>c</sup>
Colistine + méropénème systémique <sup>a</sup>	2/12	4.0±2.1 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Pendant 7 jours, les lapins ont reçu de la colistine (12 mg/kg i.m. trois fois par jour), seule ou en association avec du méropénème (80 mg/kg i.m. trois fois par jour).

<sup>b</sup> L'espaceur mis en place contenait 3 MUI de colistine pour 40g de ciment.

<sup>c</sup> Significativement différent versus les contrôles (P<0.05).

En terme de densité bactérienne dans l'os, des différences significatives ont donc été observées entre le groupe témoin et les groupes traités par :

- colistine systémique seule,
- colistine systémique associée à la colistine locale,

- colistine + méropénème systémique associé à la colistine locale.

Cependant seuls les schémas thérapeutiques comportant de la colistine locale ont permis d'obtenir des différences significatives avec les témoins en termes de pourcentages d'animaux stérilisés, ce qui est un argument en faveur de l'efficacité du traitement local.

Voici la représentation graphique de ces résultats (**Figure 26**).

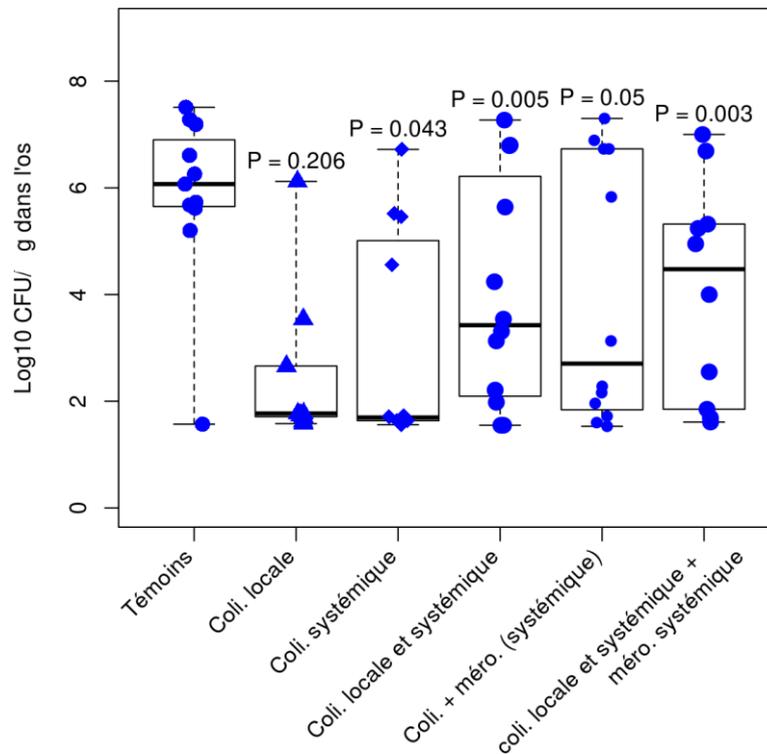


Figure 26 : Représentation graphique des résultats pour la souche KPC99YC

Coli : colistine

Méro : méropénème

#### f. Recherche de mutants résistants

Sur l'ensemble des lapins étudiés (11 lapins témoins, 12 lapins traités par colistine locale, 10 lapins traités par colistine systémique seule, 9 lapins traités par colistine systémique et locale,

12 lapins traités par l'association colistine locale et méropénème systémiques, 12 lapins traités par l'association colistine locale et systémique et méropénème systémique soit 66 lapins), un seul, dans le groupe traité par colistine locale seule présentait des mutants résistants à la colistine, avec une CMI à 32 mg/l pour la colistine.

## **E. Discussion**

La colistine en traitement local a permis d'augmenter le nombre d'animaux stériles et de diminuer de façon significative, en association au traitement systémique, la densité bactérienne dans l'os par rapport au groupe témoin. Cette étude est donc en faveur de l'efficacité du traitement par colistine locale dans le traitement des infections sur prothèses à *Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapénémase. Il est à noter que le traitement local seul est insuffisant puisqu'il ne permet pas de diminuer significativement la densité bactérienne dans l'os par rapport au groupe contrôle.

Dans notre étude seul 0,09% de la colistine présente dans l'espaceur était élué. Cela peut paraître très faible, mais en comparant avec la littérature (78), il apparaît que ce résultat était attendu avec les études d'élution à partir du ciment. Dans un article de notre équipe (47), portant sur l'étude de l'élution d'espaceurs en ciment contenant de la teicoplanine, seulement 1.5% de teicoplanine était éluee, au bout de 15 jours. Dans deux autres articles (92-93), les pourcentages d'élution sont très différents selon les antibiotiques testés et selon la longueur du protocole, avec parfois des relargages assez tardifs (94). Enfin, deux articles (79-80) ont étudié l'élution de la colistine dans le ciment, avec des ciments un peu différents, et des formulations de colistine différentes, et retrouvaient, comme dans notre étude, des élutions de l'ordre de 10 µg/ml lors des deux premiers jours, pour des doses identiques de colistine initialement mises en place dans les espaceurs. D'autres vecteurs ont été utilisés pour améliorer le relargage des antibiotiques locaux (95-96).

L'émergence de mutants résistants aux antibiotiques locaux est un des arguments fréquemment avancé pour l'utilisation prudente d'antibiotique dans les ciments orthopédiques (97). Un mutant résistant à la colistine a été mis en évidence dans le groupe colistine locale. Cependant, cette résistance n'a pas été retrouvée en cas d'association de la colistine locale avec la colistine systémique. Dans ce contexte, où l'efficacité des espaceurs imprégnés d'antibiotiques est controversée (13), cette étude, ainsi qu'un travail expérimental de notre équipe portant sur les infections sur prothèse à SARM qui avait déjà retrouvé que l'association de teicoplanine locale permettait d'améliorer l'efficacité de la teicoplanine systémique et d'augmenter le nombre d'animaux stérilisés (47), montre que ce débat est toujours ouvert et que les traitements locaux peuvent avoir leur place dans l'arsenal thérapeutique des infections difficiles à traiter sur matériel en orthopédie.

Cet effet local, malgré le pourcentage d'élution faible de la colistine, pourrait être lié à la possibilité d'atteindre de fortes concentrations locales, ce qui entrainerait une meilleure efficacité notamment sur des bactéries quiescentes, moins sensibles à l'action des antibiotiques administrés par voie systémique (98).

La prévention de la transmission de ces infections gravissimes pourrait également être améliorée, afin de diminuer leur incidence (21).

#### **F. Limites de cette étude**

- Nous n'avons pas réalisé d'étude biomécanique de résistance de notre ciment imprégné aux antibiotiques. Cependant nous avons pris pour références les études déjà publiées, dans lesquelles la biomécanique du ciment utilisé (PMMA) était bonne. Par ailleurs, ce ciment n'est pas destiné à rester dans le corps, mais bien à être retiré dans un second temps et peut donc avoir de moins bonnes qualités biomécaniques pour ce laps de temps court,

- Nous n'avons pas réalisé d'étude de sécurité d'un point de vue toxicologique, en partant du principe que la délivrance des antibiotiques se faisait de façon locale et non systémique, la dose effectivement présente dans le sang est obligatoirement faible, et négligeable par rapport aux concentrations d'antibiotiques retrouvées lors des traitements systémiques qui sont instaurés simultanément en clinique humaine. Cependant, pour certains auteurs, les traitements locaux peuvent induire une certaine toxicité, non exclusivement locale (77 ; 99), mais notamment rénale, ce que nous n'avons pas constaté dans notre étude,
- Enfin, une seule souche de KPC a été testée alors que ces bactéries ont des profils de sensibilité aux antibiotiques très différents et ces résultats pourraient ne pas être extrapolables à toutes les KPC.

## **G. Conclusion**

Dans les gravissimes infections péri prothétiques à KPC, un certain nombre de thérapeutiques sont testées, qu'elles soient par voie systémiques ou locales. Il semblerait que l'association colistine systémique et locale dans un espaceur en ciment au cours d'une procédure de deux temps chirurgicaux et de méropénème systémique, permette une nette diminution de la quantité bactérienne sur le site opératoire. D'autres études doivent encore étayer ces résultats qui conforteraient le concept de l'intérêt du traitement local dans les infections péri prothétiques.

## V. Références

1. Darouich R.O. Treatment of infections associated with surgical implants. NEJM 2004;350:1422-1429
2. Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S, Lecuyer AI, Gaborit C, Rosset P, Rusch E, Bernard L. Surveillance hospitalière des infections ostéo-articulaires en France : analyse des données médico-administratives, PMSI 2008. BEH 4-5 / 5 février 2013
3. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. N Engl J Med 2004;351:1645- 54
4. Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhave A, Mont MA. Periprosthetic joint infection. Lancet 2016;387:386–94
5. TIRESIAS-Volume IV. Infection des prothèses de hanche. Édition la prévention médicale 2008
6. Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, Jarvis WR, Emori TG. CDC definitions of nosocomial surgical site infections, 1992 : a modification of CDC definitions of surgical wound infections. Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am 1992;13:606-8
7. Tsukayama DT, Estrada R, Gustilo RB. Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections. J Bone Joint Surg Am 1996;78:512-23
8. Tseng SW, Chi CY, Chou CH, Wang YJ, Liao CH, Ho CM, Lin PC, Ho MW, Wang JH. Eight years experience in treatment of prosthetic joint infections at a teaching hospital in Central Taiwan. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 2012;45:363-9

9. Zimmerli W, Ochsner PE. Management of infection associated with prosthetic joints. *Infection* 2003;2:99-108
10. Toms AD, Davidson D, Masri BA, Duncan CP. The management of peri-prosthetic infection in total joint arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 2006;88-B:149-55
11. Tattevin P, Crémieux AC, Pottier P, Hutten D, Carbon C. Prosthetic Joint Infection : When Can Prosthesis Salvage Be Considered? *Clinical Infectious Diseases* 1999;29:292–5
12. Moran E, Masters S, Berendt AR, McLardy-Smith P, Byren I, Atkins BL. Guiding empirical antibiotic therapy in orthopaedics: The microbiology of prosthetic joint infection managed by debridement, irrigation and prosthesis retention. *Journal of Infection* 2007;55:1-7
13. Bistolfi A, Massazza G, Verne E, Masse A, Deledda D, Ferraris S, Miola M, Galetto F, Croval M. Antibiotic-Loaded Cement in Orthopedic Surgery: A Review. *International Scholarly Research Network ISRN Orthopedics* Volume 2011, Article ID 290851, 8 pages
14. Gallo J, Holinka M, Moucha CS. Antibacterial Surface Treatment for Orthopaedic Implants. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15:13849-80
15. Berwanger Cabrita H, Tesconi Croci A, Pires de Camargo O, Lei Munhoz de Lima AL. Prospective study of the treatment of infected hip arthroplasties with or without the use of an antibiotic-loaded cement spacer. *Clinics* 2007;62:99-108
16. Del Pozzo J.L. and al. Infection associated with prosthetic joints. *NEJM* 2009;361:787-794

17. Liu C. and al. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. Clin. Infect. Dis. 2011;52:2
18. Crémieux AC, Saleh-Mghir A. Infections ostéo-articulaires en milieu chirurgical : l'exemple des infections sur prothèses articulaires. Apport du modèle expérimental pour le choix des thérapeutiques. In : SFAR, editor. Conférences d'actualisation. Paris : Elsevier ; 2003 [p 539-44]
19. de Sanctis J, Teixeira L, van Duin D, Odio C, Hall G, Tomford JW et al. Complex prosthetic joint infections due to carbapenemase-producing *Klebsiella pneumonia* : a unique challenge in the era of untreatable infections. International Journal of Infectious Diseases 2014;25:73-8
20. Chang Y, Tai CL, Hsieh PH, Ueng SWN. Gentamicin in bone cement. A potentially more effective prophylactic measure of infection in joint arthroplasty. Bone Joint Res 2013;2:220-6
21. Prévention de la transmission croisée des Bactéries Hautement Résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe). Haut Conseil de la Santé Publique. [www.hcsp.fr](http://www.hcsp.fr) .Collection Documents. 2013
22. Fernandes A, Dias M. The microbiological profiles of infected prosthetic implants with an emphasis on the organisms which form biofilms. Journal of Clinical and Diagnostic Research 2013;7:219-23
23. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae worldwide. Clin Microbiol Infect 2014;20:821-30

24. Perez-Jorge C, Gomez-Barrena E, Horcajada JP, Puig-Verdie L, Esteban J. Drug treatments for prosthetic joint infections in the era of multidrug resistance. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2016;17:1233-46
25. Belmatoug N, Crémieux AC, Bleton R, Volk A, Saleh-Mghir A, Grossin M et al. A new Model of Experimental Prosthetic Joint Infection Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* : A Microbiologic, Histopathologic, and Magnetic Resonance Imaging Characterization. *JID* 1996;174:414-7
26. Norden CW, Myerowitz RL, Keleti E. Experimental osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa* : a radiographic-pathological correlative analysis. *British Journal of Experimental Pathology* 1980;61:451-60
27. An YH, Friedman RJ. Animal Models of Orthopedic Implant Infection. *Journal of Investigative Surgery* 1998;11:139-46
28. Schurman DJ, Trindade C, Hirshman HP, Moser K, Kajiyama G, Stanford BS et al. Antibiotic-Acrylic Bone Cement Composites. Studies of Gentamicin and Palacos. *JBJS* 1978;60-A:978-84
29. Crémieux AC. Modèles expérimentaux d'infections ostéoarticulaires. In: MAPAR, editor. *Communications scientifiques*. Paris: MAPAR éditions; 1999 [p.397-390]
30. Blomgren G, Lindgren U. The susceptibility of total joint replacement to hematogenous infection in the early postoperative period: an experimental study in the rabbit. *Clin Orthop Relat Res* 1980;151:308-12
31. Blomgren G, Lindgren U. Late Hematogenous Infection in Total Joint Replacement. *Clin Orthop Relat Res* 1981;155:244-8

32. Southwood RT, Rice JL, McDonald PJ, Hakendorf PH, Rozenbils MA. Infection in experimental hip arthroplasties. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1985;67-B:229-31
33. Craig MR, Poelstra KA, Sherrell JC, Kwon MS, Belzile EL, Brown TE. A novel total knee arthroplasty infection model in rabbits. *Journal of Orthopaedic Research* 2005;23:1100-4
34. Alt V, Bitschnau A, Osterling J, Sewing A, Meyer C, Kraus R, et al. The effects of combined gentamicin-hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. *Biomaterials* 2006;27:4627-34
35. Poultsides LA, Papatheodorou LK, Karachalios TS, Khaldi L, Maniatis A, Petinaki E et al. Novel Model for Studying Hematogenous Infection in an Experimental Setting of Implant-Related Infection by a Community-Acquired Methicillin-Resistant *S. aureus* strain. *Journal of Orthopaedic Research* 2008;26:1355-62
36. Bernthal NM, Stavrakis AI, Billi F, Cho JS, Kremen TJ, Simon SI, et al. A Mouse Model of Post-Arthroplasty *Staphylococcus aureus* Joint Infection to Evaluate *In Vivo* the Efficacy of Antimicrobial Implant Coatings. *Plos One* 2010;5:e12580
37. Niska JA, Shahbazian JH, Ramos RI, Francis KP, Bernthal NM, Miller LS. Vancomycin-Rifampicin Combination Therapy Has Enhanced Efficacy against an Experimental *Staphylococcus aureus* Prosthetic Joint Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013;57:5080-6

38. Antoci V, Adams CS, Hickok NJ, Shapiro IM, Parvizi J. Vancomycin Bound to Ti Rods Reduces Periprosthetic Infection. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2007;461:88-95
39. Crémieux AC, Saleh-Mghir A, Bleton R, Manteau M, Belmatoug N, Massias L, et al. Efficacy of Sparfloxacin and Autoradiographic Diffusion Pattern of [14C]Sparfloxacin in Experimental *Staphylococcus aureus* Joint Prosthesis Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996;40:2111-6
40. Saleh-Mghir A, Crémieux AC, Bleton R, Ismael F, Manteau M, Dautrey S et al. Efficacy of Teicoplanin and Autoradiographic Diffusion Pattern of [14C]Teicoplanin in Experimental *Staphylococcus aureus* Infection of Joint Prostheses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998;42:2830-5
41. Sarda L, Saleh-Mghir A, Peker C, Meulemans A, Crémieux AC, Le Guludec D. Evaluation of 99mTc-Ciprofloxacin Scintigraphy in a Rabbit Model of *Staphylococcus aureus* Prosthetic Joint Infection. *J Nucl Med* 2002;43:239-45
42. Sarda-Mantel L, Saleh-Mghir A, Welling MM, Meulemans A, Vrigneaud JM, Raguin O et al. Evaluation of 99mTc-UBI 29-41 scintigraphy for specific detection of experimental *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:1302-9
43. Saleh-Mghir A, Ameur N, Muller-Serieys C, Ismael F, Lemaitre F, Massias L et al. Combination of Quinupristin-Dalfopristin (Synercid) and Rifampin Is Highly Synergistic in Experimental *Staphylococcus aureus* Joint Prosthetic Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002;46:1122-4
44. Muller-Serieys C, Saleh-Mghir A, Massias L, Fantin B. Bactericidal Activity of the Combination of Levofloxacin with Rifampin in Experimental Prosthetic

- Knee infection in Rabbits Due to Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009;53:2145-8
45. Saleh-Mghir A, Muller-Serieys C, Dinh A, Massias L, Crémieux AC. Adjunctive Rifampin Is Crucial to optimizing Daptomycin Efficacy against Rabbit Prosthetic Joint Infection Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011;55:4589-93
46. Crémieux AC, Pavon-Djavid G, Saleh-Mghir A, Héлары G, Migonney V. Bioactive polymers grafted on silicone to prevent *Staphylococcus aureus* prosthesis adherence: *in vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics* 2003;1:178-85
47. Ismael F, Bléton R, Saleh-Mghir A, Dautrey S, Massias L, Crémieux AC. Teicoplanin-Containing Cement Spacers for Treatment of Experimental *Staphylococcus aureus* Joint Prosthesis Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003;47:3365-7
48. Gatin L, Saleh-Mghir A, Tasse J, Ghout I, Laurent F, Crémieux AC. Ceftaroline-Fosamil Efficacy against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Rabbit Prosthetic Joint Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014;58:6496-500
49. Crémieux AC, Carbon C. Experimental Models of Bone and Prosthetic Joint Infections. *Clinical Infectious Diseases* 1997;25:1295-302
50. An YH, Hill CM, Friedman RJ. Animal Models of Orthopaedic Implant Infection. In : Wilson M, Devine D, editors. *Medical Implications of Biofilms*. Cambridge : Cambridge University Press; 2003. p.59-85
51. Mishra NN, Yang SJ, Chen L, Muller C, Saleh-Mghir A, Kuhn S, Peschel A, Yeaman MR, Nast CC, Kreiswirth BN, Crémieux AC, Bayer AS. Emergence

- of daptomycin resistance in daptomycin-naïve rabbits with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection is associated with resistance to host defense cationic peptides and mprFn polymorphisms. PLoS One 2013;8:e71151
52. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. Pathogens 2013;2:288-356
53. Gatin L, Saleh-Mghir A, Massin P, Crémieux AC. Critical analysis of experimental models of periprosthetic joint infection. Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research 2015;101:851–5
54. Portillo ME, Salvado M, Trampuz A, Plasencia V, Rodriguez-Villasante M, Sorli L, Puig L, Horcajada JP. Sonication versus vortexing of implants for diagnosis of prosthetic joint infection. J Clin Microbiol. 2013;51:591-4
55. Esteban J. and al. Evaluation of quantitative analysis of cultures from sonicated retrieved orthopedic implants in diagnosis of orthopaedic infection. Journal of Clinical Microbiology 2008;46:488-92
56. Duplessis C. and al. Ceftaroline: A New Cephalosporin with Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Clin. Med. Rev. Ther. 2011;10:1-24
57. Bazan J.A. and al. Newer Beta-lactam Antibiotics : Doripenem, Ceftobiprole, Ceftaroline, and Cefepime. Med. Clin. N. Am. 2011;95:743-60
58. Corey R. and al. Ceftaroline Applications for Therapy in the United States. CID 2012;55(supp3):171-2
59. Jacqueline C. and al. *In vivo* efficacy of Ceftaroline (PPI-0903), a new broad-spectrum cephalosporin, compared with Linezolid and Vancomycin against

- Methicillin-resistant and Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a rabbit endocarditis model. AAC 2007;51:3397-400
60. Jacqueline C. and al. Efficacy of the new cephalosporin Ceftaroline in the treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acute osteomyelitis. JAC 2010;65:1749-52
61. Sader H.S. and al. Activity analyses of Staphylococcal Isolates From Pediatric, Adult, and Elderly Patients : AWARE Ceftaroline Surveillance Program. CID 2012;55(supp 3)181-6
62. Hussar D.A. New drugs : Ceftaroline fosamil, pegloticase, and eribulin mesylate. JAPHA 2011;51:316-9
63. Riccobene T.A. and al. A single- and multiple-does study to determine the safety, tolerability, and pharmacokinetics of Ceftaroline Fosamil in combination with avibactam in healthy subjects. AAC 2013;57:1496-504
64. Sieradzki K., Tomasz A. Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 1997;179:2557–66
65. Bhalodi AA, Crandon JL, Biek D, Nicolau DP. Efficacy of ceftaroline–fosamil in a staphylococcal murine pneumonia model. Antimicrob. Agents Chemother. 2012;56:6160–5
66. Chen CJ, Huang YC, Chiu CH. Multiple pathways of cross-resistance to glycopeptides and daptomycin in persistent MRSA bacteraemia. J Antimicrob Chemother. 2015;70:2965-72
67. Rose WR, Schulz LT, Andes D, Striker R, Berti AD, Hutson PR, Shukla SK. Addition of ceftaroline to daptomycin after emergence of daptomycin-non

- susceptible *Staphylococcus aureus* during therapy improves antibacterial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56:5296–5302
68. Werth BJ, Sakoulas G, Rose WE, Pogliano J, Tewhey R, Rybak MJ. Ceftaroline increases membrane binding and enhances the activity of daptomycin against daptomycin-nons usceptible vancomycine intermediate *Staphylococcus aureus* in a pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57:66–73
69. Sader HS, Castanheira M, Flamm RK, Farrell DJ, Jones RN. Antimicrobial activity of ceftazidime-avibactam against Gram-negative organisms collected from U.S. Medical Centers in 2012. *AAC* 2013;58:1684-92
70. Park KH, Greenwood-Quaintance KE, Patel R. *In vitro* activity of ceftaroline against staphylococci from prosthetic joint infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2016;84:141–3
71. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. Bad bugs, no drugs : no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009, 48:1-12
72. Castanheira M, Farrell SE, Krause KM, Jones RN, Sader HS. Contemporary diversity of  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae in the nine U.S. census regions and ceftazidime-avibactam activity tested against isolates producing the most prevalent  $\beta$ -lactamase groups. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:833-8
73. Karaiskos I, Souli M, Galani I, Giamarellou, H. Colistin still a lifesaver for the 21st century? *Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology.* 2017;13:59-71

74. Fiel SB. Aerosolized antibiotics in cystic fibrosis : an update. *Expert Rev Respir Med.* 2014 Jun;8:305-14
75. Tumbarello M, De Pascale G, Treçarichi EM, De Martino S, Bello G, Maviglia R, Spanu T, Antonelli M. Effect of aerosolized colistin as adjunctive treatment on the outcomes of microbiologically documented ventilator-associated pneumonia caused by colistin-only susceptible gram-negative bacteria. *Chest.* 2013 Dec;144:1768-1775
76. Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Biofilm-related infections : bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014 Sep;78:510-43
77. Iarikov D, Demian H, Rubin D, Alexander J, Nambiar S. Choice and Doses of Antibacterial Agents for Cement Spacers in Treatment of Prosthetic Joint infections : Review of Published Studies. *Clinical Infectious Diseases* 2012;55:1474-80
78. Gasparini G, De Gori M, Calonego G, Della Bora T, Caroleo B, Galasso O. Drug elution from high-dose antibiotic-loaded acrylic cement : a comparative, *in vitro* study. *Orthopedics.* 2014;37:999-1005
79. Shi M, Kretlow JD, Nguyen A, Young S, Baggett LS, Wong ME, Kasper FK, Mikos AG. Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate constructs for osseous space maintenance and infection control. *Biomaterials.* 2010;31:4146-56
80. Shi M, Kretlow JD, Spicer PP, Tabata Y, Demian N, Wong ME, Kasper FK, Mikos AG. Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate/gelatin antibiotic constructs for craniofacial tissue engineering. *J Control Release.* 2011;152:196-205

81. Krajewski J, Bode-Böger SM, Tröger U, Martens-Lobenhoffer J, Mulrooney T, Mittestädt H, Russlies M, Kirchner R, Knobloch JKM. Successful treatment of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis using a colistin- and tobramycin-impregnated PMMA spacer. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2014;44:363-6
82. Papagelopoulos PJ, Mavrogenis AF, Giannitsioti E, Kikilas A, Kanellakopoulou K, Soucacos PN. Management of a multidrug-resistant *Pseudomonas Aeruginosa* infected total knee arthroplasty using colistin. A case report and review of the literature. *The Journal of Arthroplasty*. 2007;22:457-63
83. Hsieh MK, Shyu CL, Franje CA, Huang YJ, Chang SK, Shih PY, Chou CC. Correlation analysis of heat stability of veterinary antibiotics by structural degradation, changes in antimicrobial activity and genotoxicity. *Veterinarni Medicina*. 2011;56:274-85
84. Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate from France. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005;49:4423-4
85. Matos AC, Gonçalves LM, Rijo P, Vaz MA, Almeida AJ, Bettencourt AF. A novel modified acrylic bone cement matrix. A step forward on antibiotic delivery against multiresistant bacteria responsible for prosthetic joint infections. *Materials Science and Engineering C* 2014;38:218-26
86. Hsu YM, Liao CH, Wei YH, Fang HW, Hou HH, Chen CC et al. Daptomycin-Loaded Polymethylmethacrylate Bone Cement for joint Arthroplasty Surgery. *Artificial Organs* 2014;38:484-92

87. Gerhart TN, Roux RD, Hanff PA, Horowitz GL, Renshaw AA, Hayes WC. Antibiotic-Loaded Biodegradable Bone Cement for Prophylaxis and Treatment of Experimental Osteomyelitis in Rats. *Journal of Orthopaedic Research* 1993;11:250-5
88. Simon D, Manuel S, Varma H. Novel nanoporous bioceramic spheres for drug delivery application : a preliminary in vitro investigation. *Oral and Maxillofacial Surgery* 2013;115:e7-14
89. Webb JCJ, Spencer RF. The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg [Br]*.2007;89:851-7
90. Rodriguez-Hernandez MJ, Jimenez-Mejias ME, Pichardo C, Cuberos L, Garcia-Curiel A, Pachon J. Colistin efficacy in an experimental model of *Acinetobacter baumannii* endocarditis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004;10:581-4
91. Plachouras D, Karvanen M, Friberg LE, Papadomichelakis E, Antoniadou A, Tsangaris I, Karaiskos I, Poulakou G, Kontopidou F, Armaganidis A, Cars O, Giamarellou H. Population Pharmacokinetic Analysis of Colistin Methanesulfonate and Colistin after Intravenous Administration in Critically Patients with Infections Caused by Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:3430–6
92. Galvez-Lopez R, Pena-Monje A, Antelo-Lorenzo R, Guardia-Olmedo J, Moliz J, Hernandez-Quero J et al. Elution kinetics, antimicrobial activity, and mechanical properties of 11 different antibiotic loaded acrylic bone cement. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2014;78:70-4

93. Goltzer O, McLaren A, Overstreet D, Galli C, McLemore R. Antimicrobial Release From Prefabricated Spacers Is Variable and the Dose Is Low. *Clin Orthop Relat Res.* 2015;473:2253–61
94. Watts AE, Nixon AJ, Papich MG, Sparks HD, Schwark WS. In vitro elution of amikacin and ticarcillin from a resorbable, self-setting, fibre reinforced calcium phosphate cement. *Veterinary Surgery.* 2011;40:563-70
95. Koort JK, Maniken TJ, Veiranto M, Jalava J, Knuuti J et al. Efficacy of Ciprofloxacin-Releasing Bioabsorbable Osteoinductive bone Defect Filler for Treatment of Experimental Osteomyelitis Due to *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;29:1502-8
96. Korkusuz F, Uchida A, Shinto Y, Araki N, Inoue K, Ono K. Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-calcium hydroxyapatite ceramic composites. *J Bone Joint Surg* 1993;75-B:111-4
97. Walker LC, Baker P, Holleyman R, Deehan D. Microbial resistance related to antibiotic- loaded bone cement : a historical review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2016 [Epub ahead of print]
98. Chuard C1, Lucet JC, Rohner P, Herrmann M, Auckenthaler R, Waldvogel FA, Lew DP. Resistance of *Staphylococcus aureus* recovered from infected foreign body *in vivo* to killing by antimicrobials. *J Infect Dis.* 1991;163:1369-73
99. James A, Larson T. Acute renal failure after high-dose antibiotic bone cement: case report and review of the literature. *Renal Failure* 2015;37:1061-6

## Annexes

### **A. Posters présentés**

- 29 octobre 2016 : ID Week 2016 à la Nouvelle-Orléans (LA, USA) : « Efficacy of colistin-loaded cement spacer in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* experimental prosthetic joint infection »
- 16 septembre 2016 : 24ème congrès de l'EORS à Bologne (ER, Italie): « Colistin treatment in an experimental model of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* prosthetic joint infection »
- 25 au 28 avril 2015 : 25<sup>ème</sup> congrès de l'ECCMID, à Copenhague (Danemark) : « New experimental models of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* prosthetic joint infections and post-traumatic osteomyelitis »
- 4 mars 2015 : 1<sup>ère</sup> Journée de l'Ecole Doctorale SDSV, Gif Sur Yvette : « New experimental models of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* prosthetic joint infections and post-traumatic osteomyelitis »
- 2-4 juillet 2014: 22ème congrès de l'EORS, à Nantes : « Periprosthetic joint infection animal models : literature review and description of our model »
- 11 septembre 2013: 53ème congrès de l'ICAAC, à Denver (Colorado, USA): « Ceftaroline Efficacy against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Rabbit Prosthetic Joint Infection »

### **B. Communications orales**

- 10 novembre 2016 : 91ème congrès de la SOFCOT, à Paris : « Traitement par colimycine des infections péri-prothétiques à *Klebsiella pneumoniae* résistante aux carbapénèmes dans un modèle d'infection péri-prothétique »

- 17 janvier 2016 : 40ème congrès du GECCO aux Arcs : « Efficacité de la Ceftaroline versus la Vancomycine dans un modèle lapin d'infection péri-prothétique de genou à *Staphylococcus aureus* résistant à la Métiline (SARM) »
- 22 novembre 2013: 33ème congrès de la RICAI, à Paris: « Efficacité de la Ceftaroline versus la Vancomycine dans un modèle lapin d'infection péri-prothétique de genou à *Staphylococcus aureus* résistant à la Métiline (SARM) »

### **C. Publications**

- Gatin L, Saleh-Mghir A, Massin P, Crémieux AC. Critical analysis of experimental models of periprosthetic joint infection. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2015;101:851-5
- Gatin L, Saleh-Mghir A, Tasse J, Ghout I, Laurent F, Crémieux AC. Ceftaroline-Fosamil Efficacy against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Rabbit Prosthetic Joint Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:6496-500



## Efficacy of colistin-loaded cement spacer in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* experimental prosthetic joint infection

L. GATIN<sup>1</sup>, A. SALEH MGHIR<sup>1</sup>, F. LAURENT<sup>2</sup>, M.C. VERDIER<sup>3</sup>, I. GHOUT<sup>1</sup>, P. TATTEVIN<sup>4</sup> and A.C. CREMIEUX<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR 1173 Université Versailles St-Quentin, Hôpital Raymond Poincaré, GARCHES, France, <sup>2</sup>Laboratoire de Bactériologie, Hôpital de la Croix Rousse, Centre National de Référence des Staphylocoques Unité Inserm 851, Faculté de Médecine Lyon Est, LYON, France, <sup>3</sup>Laboratoire de Pharmacologie Biologique, Hôpital Pontchaillou, CHU de Rennes, RENNES, France <sup>4</sup>URC Paris-Ouest, Laboratoire de Bio statistiques, Hôpital Ambroise Paré, BOULOGNE-BILLANCOURT, France, <sup>5</sup>Service de Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, Hôpital Pontchaillou, CHU de Rennes, RENNES, France

Poster number :2037

### ABSTRACT

**BACKGROUND:** In a new rabbit model of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* knee-prosthesis infection, we studied the efficacy of colistin cement alone or in combination with systemic intramuscular (i.m.) injections of colistin.

**METHODS:** Seven days after infection, surgical debridement and removal of the infected prostheses were performed, and rabbits were randomly assigned to one of four different treatment groups of twelve rabbits: prosthesis replacement by drug-free cement spacer (control) prosthesis replacement by colistin-loaded cement spacer (3 MUI of colistin/40 g of cement) (colistin local), prosthesis replacement by drug-free cement spacer and i.m. colistin (12 mg/kg of body weight, three time a day for 7 days), or colistin local + i.m.

**RESULTS:** We observed a statistically significant difference ( $p = 0.049$ ) between the colistin local + systemic group and the control group in the criteria of number of rabbits with sterile bone under the total number of rabbits.

### INTRODUCTION

Prosthetic joint infections (PJI) entails major morbidity and high costs. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) are emerging multidrug-resistant bacteria responsible for a broad range of invasive infections, including PJI, with limited therapeutic options. Although experts recommend various treatment combinations, data from clinical studies are scarce, and innovative experimental models are warranted to evaluate new medical and surgical treatments.

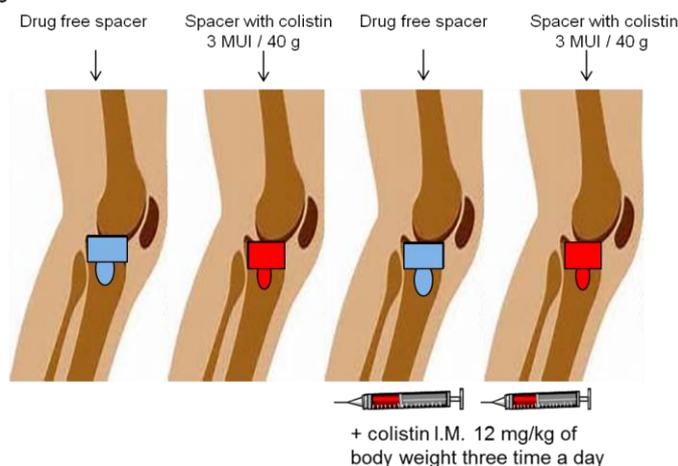
Colistin is often the only remaining option for treating CRKP. However, parenteral administration of colistin poses a high risk of adverse effects, including nephrotoxicity and neurotoxicity. Local administration is therefore a tempting approach to reduce the risk of side effects. Colistin elution from bone cement has been studied in vitro. Colistin-loaded bone cement also be used for the prevention of infection in total joint replacement.

### STUDY OBJECTIVE

The aim of this study was to evaluate the efficacy of a colistin-impregnated cement spacer alone or combined with systemic colistin, using a new rabbit model of CRKP knee -prosthesis infection that closely mimics human infection, inspired by a previous model.

### MATERIAL AND METHODS

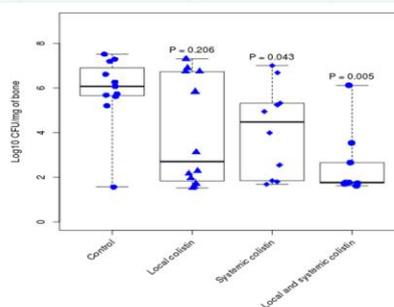
Different treatment groups seven days after prosthesis implantation and infection by 0.5 ml of  $1.10^8$  KPC 99 YC



### RESULTS

#### Antibiotic efficacy against experimental carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* prosthetic knee infection model in rabbits

Treatment	No. of rabbits with sterile bone/total no. of rabbits	P versus control group (significant if <0.05)	log <sub>10</sub> CFU/g of bone (mean ± SD)	P versus control group (significant if <0.05)
Control	0/10		5.9 ± 1.6	
Colistin local	3/12	0.590	4.0 ± 2.4	0.206
Colistin i.m.	3/10	0.311	4.1 ± 2.0	0.043
Colistin local + i.m.	5/9	0.049	2.5 ± 1.5	0.005



### CONCLUSION

Combination of systemic and local colistin could be an interesting therapeutic option to cure carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* peri prosthetic joint infection.

### REFERENCES

- Zimmerli W. N Engl J Med. 14 oct 2004
- Nordmann P. Clin Microbiol Infect 2014
- deSanctis J. International Journal of Infectious Diseases 2014
- Belmatoug N. JID 1996

Figure 27 : 29 octobre 2016 : ID Week 2016 à la Nouvelle-Orléans (LA, USA) : « Efficacy of colistin-loaded cement spacer in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* experimental prosthetic joint infection »

**EOERS 2016 BOLOGNA**  
EUROPEAN ORTHOPAEDIC RESEARCH SOCIETY  
24<sup>th</sup> ANNUAL MEETING  
14-16 SEPTEMBER 2016  
BOLGNA (ITALY)

**Colistin treatment in an experimental model of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* prosthetic joint infection**

L. GATIN<sup>1</sup>, A. SALEH MGHIR<sup>1</sup>, F. LAURENT<sup>2</sup>, M.C. VERDIER<sup>3</sup>, I. GHOUT<sup>1</sup>, P. TATTEVIN<sup>5</sup> and A.C. CREMIEUX<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>UMR 1173 Université Versailles St-Quentin, Hôpital Raymond Poincaré, GARCHES, France, <sup>2</sup>Laboratoire de Bactériologie, Hôpital de la Croix Rousse, Centre National de Référence des Staphylocoques Unité Inserm 851, Faculté de Médecine Lyon Est, LYON, France, <sup>3</sup>Laboratoire de Pharmacologie Biologique, Hôpital Pontchaillou, CHU de Rennes, RENNES, France <sup>4</sup>URC Paris-Ouest, Laboratoire de Bio statistiques, Hôpital Ambroise Paré, BOULOGNE-BILLANCOURT, France, <sup>5</sup>Service de Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, Hôpital Pontchaillou, CHU de Rennes, RENNES, France

financial disclosure statement : none

**ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** In a new rabbit model of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* knee-prosthesis infection, we studied the efficacy of colistin cement alone or in combination with systemic intramuscular (i.m.) injections of colistin.

**METHODS:** Seven days after infection, surgical debridement and removal of the infected prostheses were performed, and rabbits were randomly assigned to one of four different treatment groups of twelve rabbits: prosthesis replacement by drug-free cement spacer (control) prosthesis replacement by colistin-loaded cement spacer (3 MUI of colistin/40 g of cement) (colistin local), prosthesis replacement by drug-free cement spacer and i.m. colistin (12 mg/kg of body weight, three time a day for 7 days), or colistin local + i.m.

**RESULTS:** We observed a statistically significant difference ( $p = 0.049$ ) between the colistin local + systemic group and the control group in the criteria of number of rabbits with sterile bone under the total number of rabbits.

**INTRODUCTION**

Prosthetic joint infections (PJI) entails major morbidity and high costs. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) are emerging multidrug-resistant bacteria responsible for a broad range of invasive infections, including PJI, with limited therapeutic options. Although experts recommend various treatment combinations, data from clinical studies are scarce, and innovative experimental models are warranted to evaluate new medical and surgical treatments.

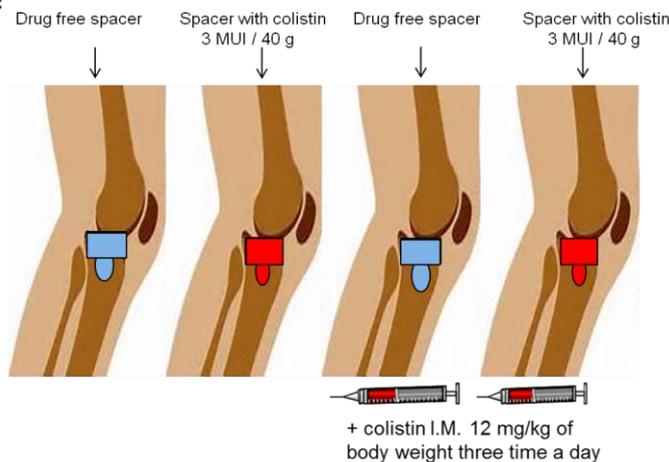
Colistin is often the only remaining option for treating CRKP. However, parenteral administration of colistin poses a high risk of adverse effects, including nephrotoxicity and neurotoxicity. Local administration is therefore a tempting approach to reduce the risk of side effects. Colistin elution from bone cement has been studied in vitro. Colistin-loaded bone cement also be used for the prevention of infection in total joint replacement.

**STUDY OBJECTIVE**

The aim of this study was to evaluate the efficacy of a colistin-impregnated cement spacer alone or combined with systemic colistin, using a new rabbit model of CRKP knee -prosthesis infection that closely mimics human infection, inspired by a previous model.

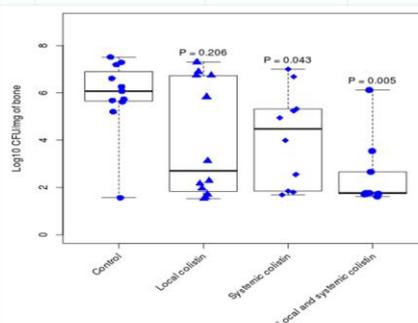
**MATERIAL AND METHODS**

Different treatment groups seven days after prosthesis implantation and infection by 0.5 ml of 1.10<sup>8</sup> KPC 99 YC

**RESULTS**

Antibiotic efficacy against experimental carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* prosthetic knee infection model in rabbits

Treatment	No. of rabbits with sterile bone/total no. of rabbits	P versus control group (significant if <0.05)	log <sub>10</sub> CFU/g of bone (mean ± SD)	P versus control group (significant if <0.05)
Control	0/10		5.9 ± 1.6	
Colistin local	3/12	0.590	4.0 ± 2.4	0.206
Colistin i.m.	3/10	0.311	4.1 ± 2.0	0.043
Colistin local + i.m.	5/9	0.049	2.5 ± 1.5	0.005

**CONCLUSION**

Combination of systemic and local colistin could be an interesting therapeutic option to cure carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* peri prosthetic joint infection.

**REFERENCES**

1. Zimmerli W. N Engl J Med. 14 oct 2004
2. Nordmann P. Clin Microbiol Infect 2014
3. de Sanctis J. International Journal of Infectious Diseases 2014
4. Belmatoug N. JID 1996

Figure 28 : 16 septembre 2016 : 24<sup>ème</sup> congrès de l'EOERS à Bologne (ER, Italie): « Colistin treatment in an experimental model of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* prosthetic joint infection »

## New experimental models of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* prosthetic joint infections and post-traumatic osteomyelitis

L. GATIN<sup>1</sup>, A. SALEH MGHIR<sup>1</sup>, F. LAURENT<sup>2</sup>, M.C. VERDIER<sup>1</sup>, I. GHOUT<sup>1</sup>, P. TATTEVIN<sup>3</sup> and A.C. CRÉMIEUX<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EA 3847 Université Versailles St-Quentin, Hôpital Raymond Poincaré, GARCHES, France, <sup>2</sup>Laboratoire de Bactériologie, Hôpital de la Croix Rousse, Centre National de Référence des Staphylocoques Unité Inserm 851, Faculté de Médecine Lyon Est, LYON, France, <sup>3</sup>Laboratoire de Pharmacologie Biologique, Hôpital Pontchaillou, CHU de Rennes, RENNES, France <sup>4</sup>URC Paris-Ouest, Laboratoire de Bio statistiques, Hôpital Ambroise Paré, BOULOGNE-BILLANCOURT, France, <sup>5</sup>Service de Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, Hôpital Pontchaillou, CHU de Rennes, RENNES, France



### ABSTRACT

**Objectives:** Prosthetic joint infections (PJI) and post-traumatic osteomyelitis (PTO) entails major morbidity and high costs. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) are emerging multidrug-resistant bacteria responsible for a broad range of invasive infections, including osteomyelitis and PJI, with limited therapeutic options. Although experts recommend various treatment combinations, data from clinical studies are scarce, and innovative experimental models are warranted to evaluate new medical and surgical treatments. The objective of this study was to develop experimental models of CRKP PJI and PTO.

**Methods:** KPC99YC is a clinical strain isolated from blood cultures in a patient with sepsis, resistant to gentamicin (MIC, 8 mg/L) intermediate to imipenem (MIC, 4mg/L), and susceptible to colistin (MIC, 0.25 mg/L), and fosfomycin (MIC, 12mg/L). For the PJI model, partial knee arthroplasty was performed using a silicone-elastomer implant in PJI. Immediately after closing the surgical wound, an inoculum of  $1.10^9$  CFU of the KPC99YC strain was injected into the joint. For the PTO model, a sclerosing agent combined with  $1.10^9$  CFU of the KPC99YC strain was injected through the medial side of the proximal tibia metaphysis. In both models, rabbits (n=12) were euthanized 4 weeks after inoculation. Bone, kidney and spleen were sampled to quantify the bacterial concentrations. Blood cultures were performed at 24 hours and 4 weeks post-inoculation.

**Results:** All rabbits lost weight during the first week and then gained weight until sacrifice. Three rabbits died prematurely, all in the PJI model. In this model, 9 rabbits (75%) had positive kidney and spleen cultures. Blood, kidney and spleen cultures were sterile in all rabbits after 4 weeks in the PTO model. PJI and osteomyelitis developed in all but one animal in each group: macroscopic lesions were similar to bone infection in Humans, with bone remodeling, purulent bone marrow, purulent arthritis in the PJI model, and necrosis in the PTO model, except for one rabbit in each group. The mean number of CFU 4 weeks after infection was  $4.62 \log_{10}$  CFU/g of bone  $\pm 1.58$  (SD) in the PJI model, and  $5.11 \log_{10}$  CFU/g of bone  $\pm 1.45$  (SD) in the PTO model.

**Conclusion:** The two experimental models of KPC99YC PJI and PTO mimic very well human infections, and may be used to evaluate various combinations of antibacterial agents for carbapenem-resistant enterobacteriaceae bone and joint infections.

### INTRODUCTION

Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) are emerging multidrug-resistant bacteria responsible for a broad range of invasive infections, including osteomyelitis and PJI, with limited therapeutic options. Although experts recommend various treatment combinations, data from clinical studies are scarce, and innovative experimental models are warranted to evaluate new medical and surgical treatments.

### STUDY OBJECTIVE

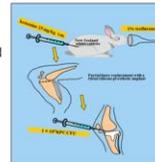
The objective of this study was to develop experimental models of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* prosthetic joint infections and post-traumatic osteomyelitis to mimic very well human infections.

### MATERIAL AND METHODS

KPC99YC is a clinical strain isolated from blood cultures in a patient with sepsis, resistant to gentamicin (MIC, 8 mg/L) intermediate to imipenem (MIC, 4mg/L), and susceptible to colistin (MIC, 0.25 mg/L), and fosfomycin (MIC, 12mg/L).

#### Experimental prosthetic joint infection

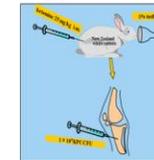
A silicone elastomer implant, was implanted as a tibial prosthetic component in 12 New Zealand white rabbits. Immediately after surgery, animals were infected by injection of a 0.5 ml containing  $1 \times 10^9$  CFU of KPC.



**D1:** Inoculum ( $1 \times 10^9$  KPC) CFU.  
**D2:** Blood cultures.  
**D31:** Animals were euthanized after blood cultures.

#### Experimental post-traumatic osteomyelitis

An 18-gauge needle was inserted percutaneously through the lateral right tibial metaphysis into the medullary cavity. Infection was induced by direct injection of sclerosing agent (0.1 ml of 3% sodium tetradecyl sulphate (Fibroven®)), followed by 0.2 ml of KPC inoculum ( $1 \times 10^9$  CFU) and 0.1 ml of saline.



**D1:** Inoculum ( $1 \times 10^9$  KPC) CFU.  
**D2:** Blood cultures.  
**D31:** Animals were euthanized after blood cultures.

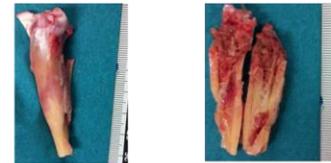
For quantitative bacterial counts, the upper third of the tibia, spleen and kidney were isolated, split and crushed in an auto-pulverizer. Results are expressed as mean  $\log_{10}$  CFU/g of bone  $\pm$  SD. A smear of the prosthesis was performed.

### RESULTS

#### Experimental prosthetic joint infection (D31)



#### Experimental post-traumatic osteomyelitis (D31)



All rabbits lost weight during the first week and then gained weight until sacrifice. 1/3 of rabbits died prematurely. 1/3 of blood cultures were positives 24 hours after inoculation, and not at 31 days. PJI developed in all but one animal. Macroscopic lesions were similar to bone infection in Humans, with bone remodeling, purulent bone marrow, purulent arthritis, except for one rabbit. The mean number of CFU 4 weeks after infection was  $4.62 \log_{10}$  CFU/g of bone  $\pm 1.58$  (SD). 9 rabbits (75%) had positive kidney and spleen cultures.

All rabbits lost weight during the first week and then gained weight until sacrifice. No rabbit died prematurely. 1/3 of blood cultures were positives 24 hours after inoculation, and not at 31 days. PTO developed in all but one animal. Macroscopic lesions were similar to bone infection in Humans, with bone remodeling, purulent bone marrow, and necrosis, except for one rabbit. The mean number of CFU 4 weeks after infection was  $5.11 \log_{10}$  CFU/g of bone  $\pm 1.45$  (SD). No rabbit had positive kidney and spleen cultures.

### CONCLUSION

The two experimental models of KPC99YC prosthetic joint infection and post-traumatic osteomyelitis mimic very well human infections, and may be used to evaluate various combinations of antibacterial agents for carbapenem-resistant enterobacteriaceae bone and joint infections.

### REFERENCES

- Crémieux AC. PLoS One. 2009 Sep 25;4(9):e7204
- Crémieux AC. Clin Infect Dis. 1997;25:1295-1302
- De Sanctis J. Int J of Infect Dis. 2014 Aug;25:73-8
- Naas T. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:4423-4

Figure 29 : 25 au 28 avril 2015 : 25<sup>ème</sup> congrès de l'ECCMID, à Copenhague (Danemark) : « New experimental models of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* prosthetic joint infections and post-traumatic osteomyelitis »

## New experimental models of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* prosthetic joint infections and post-traumatic osteomyelitis

L. GATIN<sup>1</sup>, A. SALEH MGHIR<sup>1</sup>, F. LAURENT<sup>2</sup>, M.C. VERDIER<sup>3</sup>, I. GHOUT<sup>4</sup>, P. TATTEVIN<sup>5</sup> and A.C. CRÉMIEUX<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EA 3647 Université Versailles St-Quentin, Hôpital Raymond Poincaré, GARCHES, France, <sup>2</sup>Laboratoire de Bactériologie, Hôpital de la Croix Rousse, Centre National de Référence des Staphylocoques Unité Inserm 851, Faculté de Médecine Lyon Est, LYON, France, <sup>3</sup>Laboratoire de Pharmacologie Biologique, Hôpital Pontchaillou, CHU de Rennes, RENNES, France <sup>4</sup>URC Paris-Ouest, Laboratoire de Bio statistiques, Hôpital Ambroise Paré, BOULOGNE-BILLANCOURT, France, <sup>5</sup>Service de Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, Hôpital Pontchaillou, CHU de Rennes, RENNES, France



Pr. Anne Claude Crémieux  
Maladies infectieuses et  
Hôpital Raymond Poincaré  
Tel: 33(0)1 47 10 77 30  
Fax: 33(0)1 47 10 77 67  
anne.cremieux@ypc-  
hp.fr

### ABSTRACT

**Objectives:** Prosthetic joint infections (PJI) and post-traumatic osteomyelitis (PTO) entails major morbidity and high costs. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) are emerging multidrug-resistant bacteria responsible for a broad range of invasive infections, including osteomyelitis and PJI, with limited therapeutic options. Although experts recommend various treatment combinations, data from clinical studies are scarce, and innovative experimental models are warranted to evaluate new medical and surgical treatments. The objective of this study was to develop experimental models of CRKP PJI and PTO.

**Methods:** KPC99YC is a clinical strain isolated from blood cultures in a patient with sepsis, resistant to gentamicin (MIC, 8 mg/L) intermediate to imipenem (MIC, 4mg/L), and susceptible to colistin (MIC, 0.25 mg/L), and fosfomycin (MIC, 12mg/L). For the PJI model, partial knee arthroplasty was performed using a silicone-elastomer implant in PJI. Immediately after closing the surgical wound, an inoculum of  $1.10^9$  CFU of the KPC99YC strain was injected into the joint. For the PTO model, a sclerosing agent combined with  $1.10^9$  CFU of the KPC99YC strain was injected through the medial side of the proximal tibia metaphysis. In both models, rabbits (n=12) were euthanized 4 weeks after inoculation. Bone, kidney and spleen were sampled to quantify the bacterial concentrations. Blood cultures were performed at 24 hours and 4 weeks post-inoculation.

**Results:** All rabbits lost weight during the first week and then gained weight until sacrifice. Three rabbits died prematurely, all in the PJI model. In this model, 9 rabbits (75%) had positive kidney and spleen cultures. Blood, kidney and spleen cultures were sterile in all rabbits after 4 weeks in the PTO model. PJI and osteomyelitis developed in all but one animal in each group: macroscopic lesions were similar to bone infection in Humans, with bone remodeling, purulent bone marrow, purulent arthritis in the PJI model, and necrosis in the PTO model, except for one rabbit in each group. The mean number of CFU 4 weeks after infection was  $4.62 \log_{10}$  CFU/g of bone  $\pm 1.58$  (SD) in the PJI model, and  $5.11 \log_{10}$  CFU/g of bone  $\pm 1.45$  (SD) in the PTO model.

**Conclusion:** The two experimental models of KPC99YC PJI and PTO mimic very well human infections, and may be used to evaluate various combinations of antibacterial agents for carbapenem-resistant enterobacteriaceae bone and joint infections.

### INTRODUCTION

Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) are emerging multidrug-resistant bacteria responsible for a broad range of invasive infections, including osteomyelitis and PJI, with limited therapeutic options. Although experts recommend various treatment combinations, data from clinical studies are scarce, and innovative experimental models are warranted to evaluate new medical and surgical treatments.

### STUDY OBJECTIVE

The objective of this study was to develop experimental models of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* prosthetic joint infections and post-traumatic osteomyelitis to mimic very well human infections.

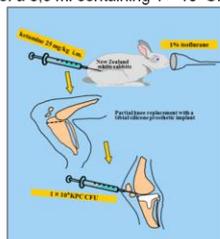
### MATERIAL AND METHODS

KPC99YC is a clinical strain isolated from blood cultures in a patient with sepsis, resistant to gentamicin (MIC, 8 mg/L) intermediate to imipenem (MIC, 4mg/L), and susceptible to colistin (MIC, 0.25 mg/L), and fosfomycin (MIC, 12mg/L).

#### Experimental prosthetic joint infection

A silicone elastomer implant was implanted as a tibial prosthetic component in 12 New Zealand white rabbits.

Immediately after surgery, animals were infected by injection of a 0,5 ml containing  $1 \times 10^9$  CFU of KPC.



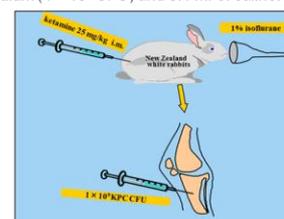
D1: Inoculum ( $1 \times 10^9$  KPC) CFU.

D2: Blood cultures.

D31: Animals were euthanized after blood cultures.

#### Experimental post-traumatic osteomyelitis

An 18-gauge needle was inserted percutaneously through the lateral right tibial metaphysis into the medullary cavity. Infection was induced by direct injection of sclerosing agent (0.1 ml of 3% sodium tetracycl sulphate (Fibrovein®)), followed by 0.2 ml of KPC inoculum ( $1 \times 10^9$  CFU) and 0.1 ml of saline.



D1: Inoculum ( $1 \times 10^9$  KPC) CFU.

D2: Blood cultures.

D31: Animals were euthanized after blood cultures.

For quantitative bacterial counts, the upper third of the tibia, spleen and kidney were isolated, split and crushed in an auto-pulverizer. Results are expressed as mean  $\log_{10}$  CFU/g of bone  $\pm$  SD. A smear of the prosthesis was performed.

### RESULTS

#### Experimental prosthetic joint infection (D31)



All rabbits lost weight during the first week and then gained weight until sacrifice.  
 $\frac{1}{4}$  of rabbits died prematurely.

$\frac{1}{3}$  of blood cultures were positives 24 hours after inoculation, and not at 31 days.

PJI developed in all but one animal.

Macroscopic lesions were similar to bone infection in Humans, with bone remodeling, purulent bone marrow, purulent arthritis, except for one rabbit.

The mean number of CFU 4 weeks after infection was  $4.62 \log_{10}$  CFU/g of bone  $\pm 1.58$  (SD).

9 rabbits (75%) had positive kidney and spleen cultures.

#### Experimental post-traumatic osteomyelitis (D31)



All rabbits lost weight during the first week and then gained weight until sacrifice.  
No rabbit died prematurely.

$\frac{1}{3}$  of blood cultures were positives 24 hours after inoculation, and not at 31 days.

PTO developed in all but one animal.

Macroscopic lesions were similar to bone infection in Humans, with bone remodeling, purulent bone marrow, and necrosis, except for one rabbit.

The mean number of CFU 4 weeks after infection was  $5.11 \log_{10}$  CFU/g of bone  $\pm 1.45$  (SD).

No rabbit had positive kidney and spleen cultures.

### CONCLUSION

The two experimental models of KPC99YC prosthetic joint infection and post-traumatic osteomyelitis mimic very well human infections, and may be used to evaluate various combinations of antibacterial agents for carbapenem-resistant enterobacteriaceae bone and joint infections.

### REFERENCES

1. Crémieux AC. *PLoS One*. 2009 Sep 25;4(9):e7204
2. Crémieux AC. *Clin Infect Dis*. 1997;25:1295-1302
3. De Sanctis J. *Int J of Infect Dis*. 2014 Aug;25:73-8
4. Naas T. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:4423-4



# Periprosthetic joint-infection animal models: literature review and description of our model



L. GATIN<sup>1</sup>, A. SALEH-MGHIR<sup>1</sup> and A.-C. CRÉMIEUX<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EA 3647, Université Versailles-Saint-Quentin, Hôpital Raymond-Poincaré, AP-HP, GARCHES, France

Poster no. 0175

## ABSTRACT

**Background:** Few animal models of orthopedic periprosthetic infections have been developed to date (1, 2). However, they represent a major challenge, given the current demographics, constantly increasing the numbers of prostheses implanted and, thus, the incidence of periprosthetic joint infections (3) (PJIs).

**Aim of the Study:** The type of inoculation (local or intravenous; pre-, intra- or postoperative) strongly influences the natural history of experimental PJIs. An "ideal" model, faithfully reproducing human PJIs (with the same biomechanical constraints and survival) should obtain an infection rate close to 100% and mortality approaching zero (main criteria). A comprehensive literature review on experimental PJI models and their comparison with our model was undertaken to identify the best model available using those criteria as a framework for analysis.

**Material and Methods:** We searched PubMed for all articles containing the words *Experimental Orthopedics + Infection*. Each model was described according to the inoculation route, the bacterium used (and the possibility to reproduce its calibration) and its further use for pathophysiological or therapeutic studies.

**Results:** According to our criteria, the ideal model would obtain PJI by direct local inoculation during the immediate postoperative period, preferably with a bacterium responsible for the majority of nosocomial infections, such as *Staphylococcus aureus*.

**Conclusions:** Our model closely duplicates human chronic PJIs, meets the desired specifications and is appropriate for experimental studies. Other models more closely reproduce hematogenous PJIs.

## MATERIALS AND METHODS

Our PubMed search for all articles containing the words *Experimental Orthopedics + Infection* found 285 and 463 items, respectively; only those dealing with orthopedic PJIs were considered.

Eight original models have been described in the literature, in addition to our model. Ten articles based on our model (Figure 1) have been published to date.

Four main inoculation routes can be distinguished:

- intraarticular just before or during surgery
- intramedullary just before or during surgery
- intravenous route after surgery
- intraarterial route after surgery

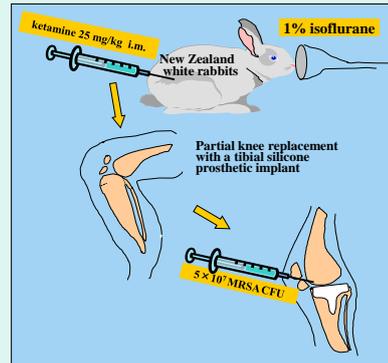


Figure 1. Our methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) PJI model

## INTRODUCTION

Only a few periprosthetic joint infection (PJI) models are currently available. The persistent main question seems to be what type of inoculation should be used. Finding its ideal route may help meet all specifications for a model that should duplicate, as closely as possible, the conditions of human PJIs (including the absence of spontaneous healing and chronic evolution without death); be reproducible and easy to induce (with an simple and reproducible inoculation route); be ethically acceptable for animal use (Ethics Committee approval); and be relatively inexpensive.

## RESULTS

Table 1. Comparison of the different PJI models described in the literature

Inoculation type	First author	Publication year	Control infection rate (when antibiotics tested)	Mortality rate	Pathogen used	Implant type	Animal	Aim of the study
Intraarticular intraoperative	Schurman <sup>1</sup>	1978	81%	9%	<i>Escherichia coli</i>	Hemiarthroplasty of the knee: femoral cement and stainless steel cylinder	New Zealand rabbit	Evaluate the efficacy of gentamicin-containing cement and duration of effect
	Craig <sup>2</sup>	2005	75%	5%	MRSA	Hemi-knee arthroplasty with cement surrounding a screw inserted into the distal femur	New Zealand rabbit	Develop of a PJI model
	Bernthal <sup>3</sup>	2010	100%	Not reported	<i>S. aureus</i>	Kirchner's stainless steel nail in the distal femur	Mouse	Test the efficacy of minocycline + rifampin-impregnated resorbable polymer to prevent PJIs
	Niska <sup>4</sup>	2013	77%	Not reported	<i>S. aureus</i>	Titanium-coated nail with or without vancomycin in the distal femur	Wistar rat	Assess the ability of vancomycin + rifampin to treat <i>S. aureus</i> PJI
	Antoci <sup>5</sup>	2007	100%	Not reported	<i>S. aureus</i>	Titanium-coated nail with or without vancomycin in the distal femur	Wistar rat	Test the ability of vancomycin coating of the nail to prevent PJIs
Our model <sup>11-20</sup>	1996-2011	93%	23% (when specified)	<i>S. aureus</i>	Hemiarthroplasty of the right knee: silicone implant	New Zealand rabbit	Develop the model, test antibiotics, assess diagnostic methods, evaluate bioactive polymers, test antibiotic-containing cements	
Intramedullary intraoperative	Southwood <sup>6</sup>	1985	70%	17%	<i>S. aureus</i>	Hemiarthroplasty of the hip with a femoral component: ball bearing and cemented pin	Short hair rabbit	Investigate resistance to infection in the presence of a foreign body
Intramedullary preoperative	Alt <sup>7</sup>	2006	88%	11%	<i>S. aureus</i>	Tibial intramedullary nail (distal extremity intraarticular)	New Zealand rabbit	Test nail coatings, impregnated or not with gentamicin
Intravenous postoperative	Blomgren <sup>8,9</sup>	1980	50% 70%	56% Not reported	<i>S. aureus</i>	Total knee arthroplasty	New Zealand rabbit	Study postoperative hematogenous bacterial spread to a prosthetic joint Assess the effectiveness of gentamicin-impregnated cement
	Southwood <sup>6</sup>	1985	47%	28%	<i>S. aureus</i>	Hemiarthroplasty of the hip with a femoral component: ball bearing and cemented pin	Short hair rabbit	Examine resistance to infection in the presence of a foreign body
Intraarterial postoperative	Poulsides <sup>10</sup>	2008	100%	37%	<i>S. aureus</i>	Porous tantalum implant in the proximal tibia	New Zealand rabbit	Develop a model of periprosthetic joint infection

<sup>1</sup>Schurman DJ. *JBS* 1978;60-A(7):978-984; <sup>2</sup>Craig MR. *Journal of Orthopaedic Research* 2005;23:1100-1104; <sup>3</sup>Bernthal NM. *Plos One* 2010;5(9):e12580; <sup>4</sup>Niska JA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013;57(10):5080-5086; <sup>5</sup>Antoci V. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2007;461:88-95; <sup>6</sup>Southwood RT. *The Journal of Bone and Joint Surgery B* 1985;67-B:229-231; <sup>7</sup>Alt V. *Biomaterials* 2006;27:4627-4634; <sup>8</sup>Blomgren G. *Clin Orthop Relat Res* 1980;151:308-312; <sup>9</sup>Blomgren G. *Clin Orthop Relat Res* 1980;155:244-248; <sup>10</sup>Poulsides LA. *Journal of Orthopaedic Research* 2008;26:2355-2362; <sup>11</sup>Belmatoug N. *JID* 1996;174:414-417; <sup>12</sup>Crémieux AC. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996;40(9):2111-2116; <sup>13</sup>Saleh-Mghir A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002;46(4):1122-1124; <sup>14</sup>Muller-Saieys C. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009;53(5):2145-2148; <sup>15</sup>Sarda L. *J Nucl Med* 2002;43:239-245; <sup>16</sup>Sarda-Martel L. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:1302-1309; <sup>17</sup>Saleh-Mghir A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002;46(4):1122-1124; <sup>18</sup>Muller-Saieys C. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009;53(5):2145-2148; <sup>19</sup>Saleh-Mghir A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011;55(10):4589-4593; <sup>20</sup>Crémieux AC. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics* 2003;1:178-185; <sup>21</sup>Antsel F. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003;47(10):3365-3367

The results of our comparative analysis showed that, among the different PJI models reported in the literature (Table 1), intra-articular inoculation more closely reproduces human chronic PJIs, achieving the highest rate of infection (>75%) and the lowest mortality rate (<25%).

However, it must be noted that mortality (~10% in our model) rose when rabbits were treated with rifampin because they frequently developed severe diarrhea.

## CONCLUSION

In light of this analysis, our model, which obtains PJIs very similar to those occurring in humans, without spontaneous healing, and using human strains of bacteria routinely found in orthopedic PJIs, clearly satisfies the desired criteria, i.e., it is reproducible, reliable and can be used to examine a wide variety of relevant parameters: antibiotic efficacy, antibiotic-impregnated cements, prosthesis coatings.

## References

1. Crémieux AC. *Clin Infect Dis* 1997;25:1295-1302; 2. An YH. *Medical Implication of Biofilms*, Cambridge University Press. 2003;59-85; 3. Zimmerli W. *N Engl J Med* 14;351:1645-1654

Figure 31 : 2-4 juillet 2014: 22ème congrès de l'EORS, à Nantes : « Periprosthetic joint infection animal models : literature review and description of our model »

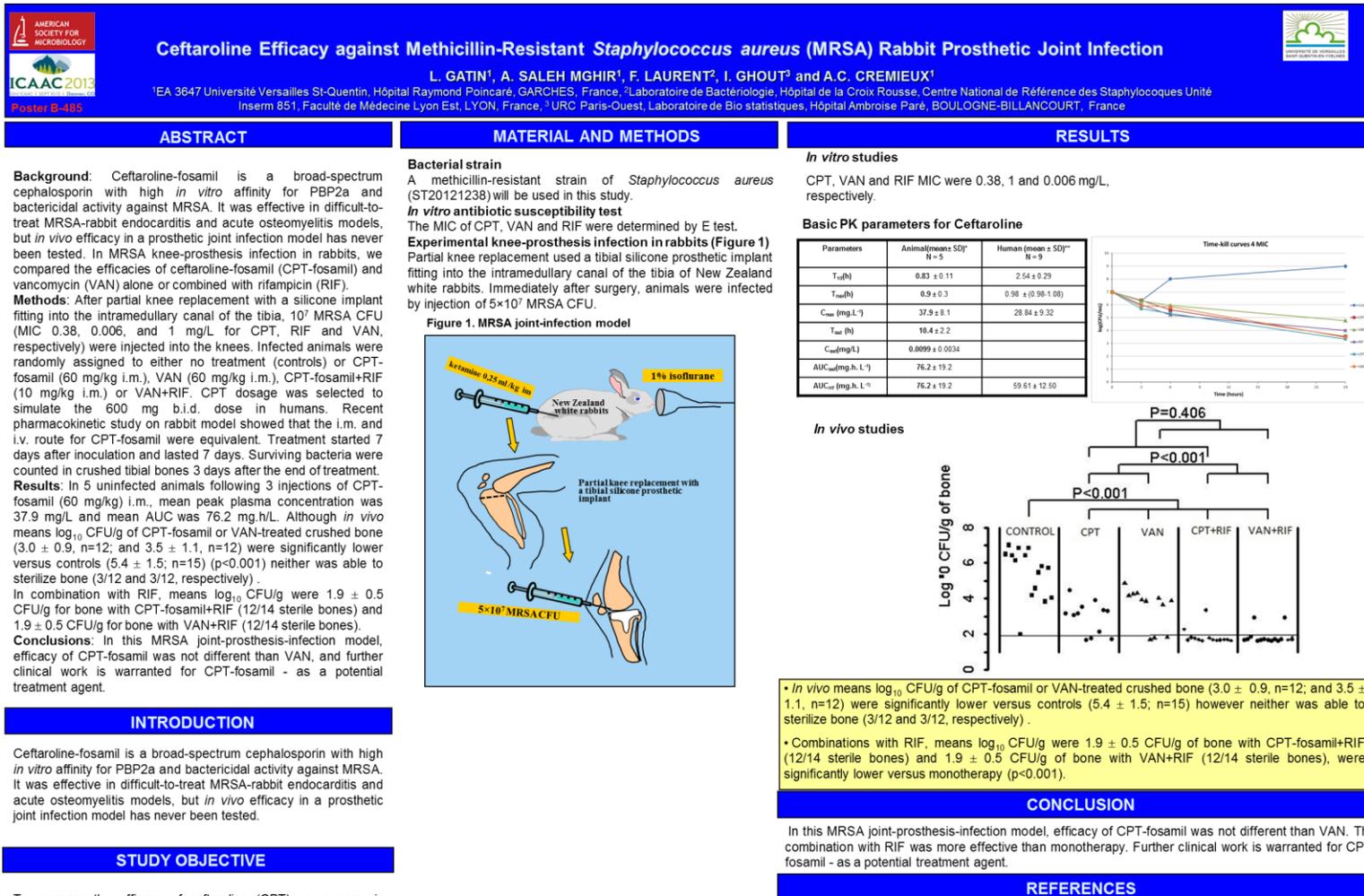


Figure 32 : 11 septembre 2013: 53ème congrès de l'ICAAC, à Denver (Colorado, USA): « Ceftaroline Efficacy against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Rabbit Prosthetic Joint Infection »

**10 novembre 2016 : 91ème congrès de la SOFCOT, à Paris : «Traitement par colimycine des infections péri-prothétiques à *Klebsiella pneumoniae* résistante aux carbapénèmes dans un modèle d'infection péri-prothétique »**

L. Gatin<sup>1,2</sup>, A. Saleh-Mghir<sup>1</sup>, F. Laurent<sup>3</sup>, M.C. Verdier<sup>4</sup>, I. Ghout<sup>5</sup>, P. Tattevin<sup>6</sup> and A.C. Crémieux<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EA 3647 Université Versailles St-Quentin, Hôpital Raymond Poincaré, GARCHES, France

<sup>2</sup>Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique, Hôpital Raymond Poincaré, GARCHES, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Bactériologie, Hôpital de la Croix Rousse, Centre National de Référence des Staphylocoques, Inserm Unité 851, Faculté de Médecine Lyon-Est, LYON, France

<sup>4</sup>Laboratoire de Pharmacologie Biologique, Hôpital Pontchaillou, CHU de Rennes, RENNES, France

<sup>5</sup>URC Paris-Ouest Laboratoire de Bio statistiques, Hôpital Ambroise Paré, BOULOGNE-BILLANCOURT, France

<sup>6</sup>Service de Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, Hôpital Pontchaillou, CHU de Rennes, RENNES, France

**Introduction:** Les infections péri-prothétiques sont responsables de morbidité et coûts financiers importants. Parmi ces infections, les infections à *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes (KPC) commencent à émerger, et imposent de nouveaux défis thérapeutiques. Après avoir mis au point un modèle d'infection péri-prothétique de genou chez le lapin à KPC, nous avons voulu tester des antibiothérapies systémiques et locales, seules ou en association, par colimycine.

**Matériel et Méthode:** La souche KPC99YC, issue d'une hémoculture chez un patient bactériémique, est résistante à la gentamicine (CMI, 8 mg/L) intermédiaire à l'imipénème (CMI, 4mg/L), sensible à la colimycine (CMI, 0.25 mg/L), et à la fosfomycine (CMI, 12mg/L). Notre modèle d'infection péri-prothétique consistait en le remplacement partiel de l'articulation du genou chez des lapins Néo-Zélandais femelles par un implant en silicone. Immédiatement après la fermeture de l'articulation,  $1.2 \cdot 10^9$  UFC de KPC99YC était injecté dans l'articulation? Les animaux étaient euthanasiés à j14, et des échantillons de rate, de rein étaient prélevés pour compte bactérien. Des hémocultures étaient également réalisées le lendemain de l'inoculation. Quatre bras de traitement ont été réalisés : 12 lapins témoins, 12 lapins traités par colimycine dans un espaceur en ciment (colimycine locale 3 MUI dans 40g de ciment), 12 lapins traités par colimycine systémique (12 MUI/kg 3 fois par jour pendant 7 jours) et 12 lapins traités par colimycine systémique et locale (aux mêmes doses que précédemment).

**Résultats:** Tous les lapins témoins étaient infectés. Au moment du sacrifice, la moyenne d'UFC/g d'os retrouvait 4.62 log10 dans le groupe témoin, 3.99 log 10 dans le groupe colimycine locale, 4.56 log10 dans le groupe colimycine systémique et 2.62 log 10 dans le groupe association colimycine locale et systémique. Aucun lapin n'était stérile dans le groupe témoin, 3 dans le groupe colimycine locale, 3 dans le groupe colimycine systémique et 7 dans le groupe colimycine locale et systémique.

**Conclusion:** Le modèle créé est un modèle fiable et reproductible. La colimycine, surtout en association en traitement systémique et local dans un espaceur en ciment est un traitement qui semble prometteur pour les infections à KPC.

**17 janvier 2016 : 40ème congrès du GECO aux Arcs : « Efficacité de la Ceftaroline versus la Vancomycine dans un modèle lapin d'infection péri-prothétique de genou à *Staphylococcus aureus* résistant à la Métilcilline (SARM) »**

L. Gatin<sup>1,2</sup>, A. Saleh-Mghir<sup>1</sup>, F. Laurent<sup>3</sup>, and A.C. Crémieux<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EA 3647 Université Versailles St-Quentin, Hôpital Raymond Poincaré, GARCHES, France

<sup>2</sup>Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique, Hôpital Raymond Poincaré, GARCHES, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Bactériologie, Hôpital de la Croix Rousse, Centre National de Référence des Staphylocoques, Inserm Unité 851, Faculté de Médecine Lyon-Est, LYON, France

La ceftaroline (CPT), le métabolite actif de la pro drogue ceftaroline-fosamil (CPT-F), a démontré une activité bactéricide in vitro contre le *Staphylococcus aureus* résistant à la métilcilline (SARM) et est efficace dans les modèles d'endocardite et d'ostéomyélite aiguë difficiles à traiter chez le lapin. Cependant, son efficacité in vivo dans un modèle d'infection péri-prothétique (IPP) est inconnue. Nous avons utilisé un modèle d'IPP de genou à SARM chez le lapin, pour comparer les efficacités de la CPT-F à la vancomycine (VAN) seule et combinée à la rifampicine (RIF). Après remplacement partiel du genou avec un implant de silicone dans le canal médullaire tibial,  $5 \times 10^7$  SARM CFU (CMI de 0,38, 0,006, et 1 mg / litre pour CPT, RIF, et VAN, respectivement) était injecté dans le genou. Les animaux infectés ont été randomisés pour recevoir aucun traitement (contrôles) ou CPT-F (60 mg / kg de poids par voie intramusculaire [Im]), VAN (60 mg / kg Im), CPT-F plus RIF (10 mg / kg Im), ou VAN plus RIF en commençant 7 jours après l'inoculation et durant 7 jours. Les bactéries survivantes dans les tibias écrasés ont été comptées 3 jours après la fin du traitement. Bien que la moyenne de la quantification bactérienne ( $\log_{10}$  UFC / g d'os traité par CPT ( $3,0 \pm 0,9$ , n = 12) et par VAN ( $3,5 \pm 1,1$ , n = 12) dans les tibias écrasés a été significativement inférieure à celle des témoins ( $5,6 \pm 1,1$ , n = 14) ( $p < 0,001$ ), aucun de ces traitements n'a entièrement stérilisé l'os (3/12 animaux étaient stériles pour chaque traitement). Les valeurs moyennes  $\log_{10}$  UFC / g pour les antibiotiques en combinaison avec la RIF étaient de  $1,9 \pm 0,5$  (12/14 étaient stériles) pour la CPT-F et  $1,9 \pm 0,5$  (12/14 étaient stériles) pour la VAN. Dans ce modèle d'IPP à SARM, les efficacités de la CPT-F et de la VAN ne diffèrent pas; ainsi, la CPT semble être un agent antimicrobien prometteur pour le traitement de SARM les IPP.

**22 novembre 2013 : 33ème congrès de la RICAI, à Paris: « Efficacité de la Ceftaroline versus la Vancomycine dans un modèle lapin d'infection péri-prothétique de genou à *Staphylococcus aureus* résistant à la Méricilline (SARM) »**

L. Gatin<sup>1,2</sup>, A. Saleh-Mghir<sup>1</sup>, F. Laurent<sup>3</sup>, and A.C. Crémieux<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EA 3647 Université Versailles St-Quentin, Hôpital Raymond Poincaré, GARCHES, France

<sup>2</sup>Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique, Hôpital Raymond Poincaré, GARCHES, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Bactériologie, Hôpital de la Croix Rousse, Centre National de Référence des Staphylocoques, Inserm Unité 851, Faculté de Médecine Lyon-Est, LYON, France

La ceftaroline (CPT), le métabolite actif de la pro drogue ceftaroline-fosamil (CPT-F), a démontré une activité bactéricide in vitro contre le *Staphylococcus aureus* résistant à la méricilline (SARM) et est efficace dans les modèles d'endocardite et d'ostéomyélite aiguë difficiles à traiter chez le lapin. Cependant, son efficacité in vivo dans un modèle d'infection péri-prothétique (IPP) est inconnue. Nous avons utilisé un modèle d'IPP de genou à SARM chez le lapin, pour comparer les efficacités de la CPT-F à la vancomycine (VAN) seule et combinée à la rifampicine (RIF). Après remplacement partiel du genou avec un implant de silicone dans le canal médullaire tibial,  $5 \times 10^7$  SARM CFU (CMI de 0,38, 0,006, et 1 mg / litre pour CPT, RIF, et VAN, respectivement) était injecté dans le genou. Les animaux infectés ont été randomisés pour recevoir aucun traitement (contrôles) ou CPT-F (60 mg / kg de poids par voie intramusculaire [Im]), VAN (60 mg / kg Im), CPT-F plus RIF (10 mg / kg Im), ou VAN plus RIF en commençant 7 jours après l'inoculation et durant 7 jours. Les bactéries survivantes dans les tibias écrasés ont été comptées 3 jours après la fin du traitement. Bien que la moyenne de la quantification bactérienne ( $\log_{10}$  UFC / g d'os traité par CPT ( $3,0 \pm 0,9$ ,  $n = 12$ ) et par VAN ( $3,5 \pm 1,1$ ,  $n = 12$ ) dans les tibias écrasés a été significativement inférieure à celle des témoins ( $5,6 \pm 1,1$ ,  $n = 14$ ) ( $p < 0,001$ ), aucun de ces traitements n'a entièrement stérilisé l'os (3/12 animaux étaient stériles pour chaque traitement). Les valeurs moyennes  $\log_{10}$  UFC / g pour les antibiotiques en combinaison avec la RIF étaient de  $1,9 \pm 0,5$  (12/14 étaient stériles) pour la CPT-F et  $1,9 \pm 0,5$  (12/14 étaient stériles) pour la VAN. Dans ce modèle d'IPP à SARM, les efficacités de la CPT-F et de la VAN ne diffèrent pas; ainsi, la CPT semble être un agent antimicrobien prometteur pour le traitement de SARM les IPP.



Available online at  
**ScienceDirect**  
[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
[www.em-consulte.com/en](http://www.em-consulte.com/en)



Original article

## Critical analysis of experimental models of periprosthetic joint infection



L. Gatin<sup>a,\*</sup>, A. Saleh-Mghir<sup>a,b</sup>, P. Massin<sup>c,d</sup>, A.-C. Crémieux<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> EA 3647, université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, 78000 Versailles, France

<sup>b</sup> Service de maladies infectieuses, hôpital Raymond-Poincaré, 92380 Garches, France

<sup>c</sup> Département de chirurgie orthopédique et traumatologique, hôpitaux universitaires Paris Nord-Val-de-Seine, 46, rue Henri-Huchard, 75877 Paris cedex 18, France

<sup>d</sup> EA 7334 REMES (recherche clinique coordonnée Ville, hôpital, méthodologies et société), université Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75010 Paris, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 March 2015

Accepted 25 August 2015

#### Keywords:

Prosthetic joint infection

Animal models

Orthopaedics

### ABSTRACT

**Introduction:** Because the extreme diversity of clinical situations makes formal clinical trials difficult to carry out, animal models of periprosthetic infection in orthopaedics are needed to understand the aetiology and pathology of these infections, and to test new treatment methods. These experimental models must reproduce the features of the infections encountered in clinical practice. One of the model variables is the method of inoculation: local (intra-articular), intravenous or intra-arterial. Another is the timing of the inoculation: intra-operative or postoperative. Together, these options simulate the different contamination methods: direct, by proximity or blood-borne. However, the chosen inoculation route can also affect the infection rate and severity in the various models, and in some cases do not accurately reproduce the postoperative infections encountered clinically.

**Hypothesis:** The direct inoculation method is the most effective for inducing a local infection on a foreign body in a joint, and the least iatrogenic.

**Methods:** A critical analysis of published studies was carried out to evaluate each model against three endpoints, according to the type of inoculation. The primary endpoint was the infection rate, which should be as close as possible to 100%. The secondary endpoints were the mortality rate and rate of spontaneous healing, both of which should be as low as possible. Twenty-one articles were reviewed.

**Results:** Intra-articular and intra-medullary inoculations had induction rates between 70 and 100%; intra-arterial inoculations had an induction rate of 100%, while intravenous inoculation had a rate of 47 to 77%. The mortality rates were lower with the intra-articular and intramedullary inoculations (5 to 23%) than for the intra-arterial inoculations (37%) and intravenous inoculations (28 to 56%). The spontaneous healing rate was 0 to 30% for intra-articular and intramedullary inoculations, 30 to 53% for intravenous inoculations and 0% for intra-arterial inoculations.

**Conclusion:** Direct inoculation methods are most effective at reproducing chronic periprosthetic joints infections, without putting the animal's life at risk or allowing for spontaneous healing. The simulation of blood-borne infections is more random.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

### 1. Introduction

Many animal models have been created to study musculoskeletal infections, particularly ones that reproduce osteomyelitis. Most of the models are based on Norden's work [1] in the late 1970s. Extrapolations have been made from this initial model to help us better understand periprosthetic joint infections (PJI) [2]. These

infections are a major issue because of the increasing number of prostheses being implanted. Each year, more than 200,000 joint prostheses are implanted in France, with 1 to 1.5% becoming infected. *Staphylococcus* is the most prevalent bacterial species implicated [3]. However, the clinical scenarios vary greatly, making it difficult to plan comparative or even randomized clinical trials.

Animal models are good for studying the prophylactic and therapeutic effects of antibiotics on prosthesis-related infections because infections can be induced homogeneously and reproducibly under experimental conditions. They help us understand the pathophysiology of PJI and to test new treatments, such as

\* Corresponding author. Tel.: +33 06 76 73 38 82.  
 E-mail address: [gatinlaure@gmail.com](mailto:gatinlaure@gmail.com) (L. Gatin).

systemic antibiotics, antibiotic-loaded bone cements and implant coatings. For these models to be applicable to humans, they must reproduce the infection method and progression of the human PJI as closely as possible, namely the absence of spontaneous healing and progression to chronic infection, while being reproducible and easy to carry out. In addition, they must be ethically acceptable (approved by research ethics committee) and low cost. One of the important considerations is the method of inoculation: intra-operative intra-articular, postoperative intra-articular and intravenous (blood-borne) or by proximity (intramedullary). Each type of inoculation simulates one of the various contamination methods encountered during clinical practice. For example, local inoculation (intra-articular) is the inoculation method that best reproduces the conditions of nosocomial infection, which is the most common type of infection. It is attributed to direct contamination of the surgical wound or implant. No matter its form, inoculation should consistently produce an infection that is likely to become chronic, without leading to the animal's death. This reproduces the features of most PJIs in humans. This led us to evaluate the contamination method used in all published PJI models, which was classified using certain criteria. First, the contamination must result in a 100% or nearly 100% infection rate. Second, the rate of mortality and spontaneous healing must be as close to 0% as possible.

We hypothesized that the direct inoculation method was the most effective for inducing a local infection on a foreign body in the joint, and the least iatrogenic.

## 2. Material and methods

A search was performed using PubMed to identify relevant articles using the keywords *experimental* or *model + joint + infection* or *periprosthetic + infection* (Fig. 1).

Articles were included if they featured an orthopaedic periprosthetic joint infection model.

Articles were excluded when:

- the infection did not reproduce a PJI, in particular models of subcutaneous cage implantation that reproduce a foreign body infection that is dissimilar to PJI in humans because of subcutaneous abscess is formed that does not infect the bone or joint [3,4];
- the model induced osteomyelitis without arthritis.

Twenty-one articles were retained and analysed that encompassed nine different models of PJI [5–25]: 7 in rabbits, 1 in mice, and 1 in rats.

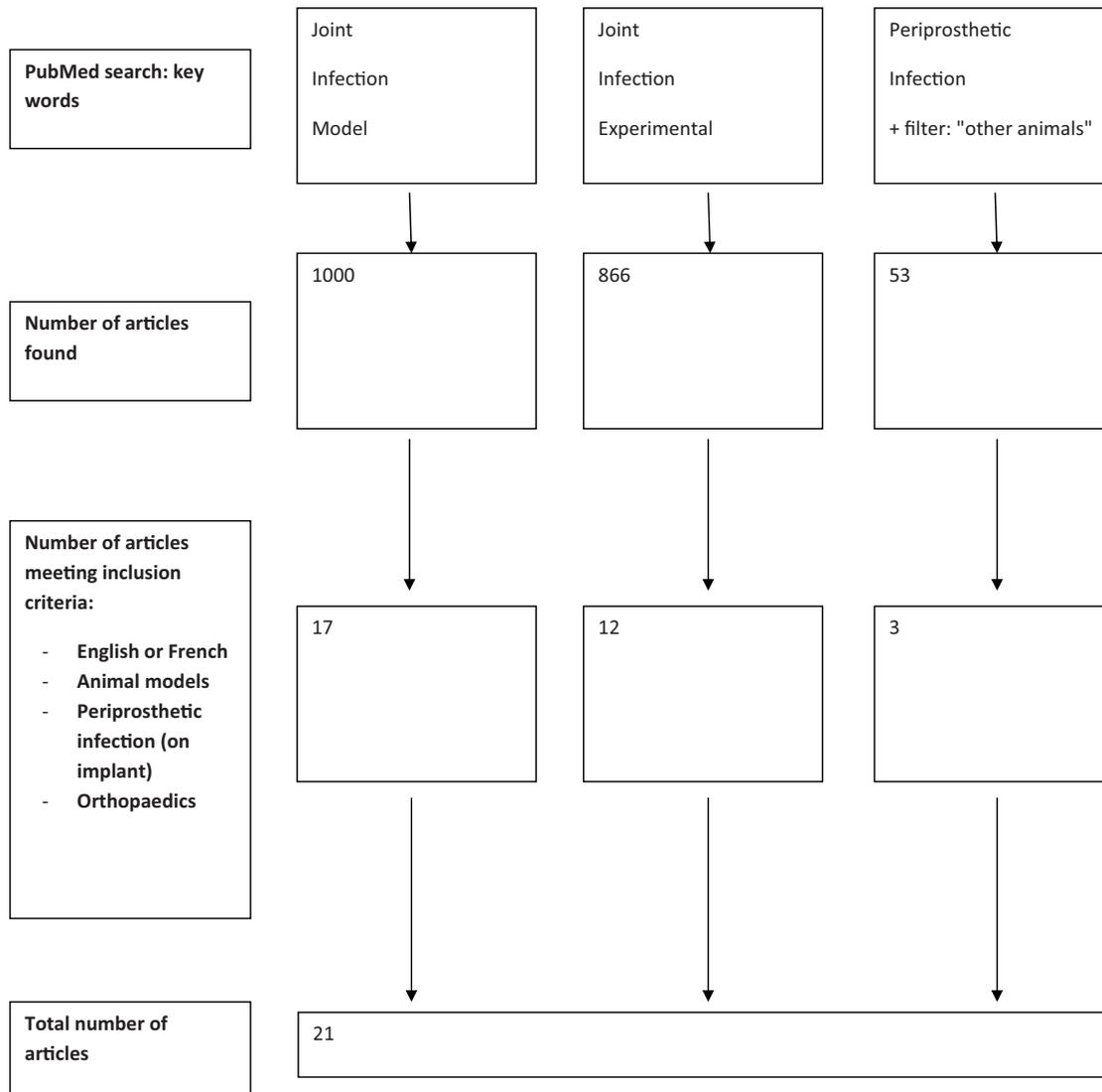


Fig. 1. Study flow chart.

**Table 1**

Comparison of different animals models by inoculation method (NZW: New Zealand white, PJI: periprosthetic joint infection).

Type of inoculation	First author	Year of publication	Microorganism used	Implant used	Type and number of animals used	Goal of study
Intra-operative intra-articular	Schurman [6]	1978	<i>Escherichia coli</i>	Hemiarthroplasty of knee: cement and stainless steel cylinder in femur	30 NZW rabbits	Test efficacy of gentamicin cement and duration of this effect
	Craig [10]	2005	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>	Hemiarthroplasty of knee: cement around screw in distal femur	22 NZW rabbits	Development of model for PJI
	Bernthal [13] Niska [14]	2010 [13] 2013 [14]	<i>S. aureus</i>	Stainless steel K-wires in distal femur (distal end placed intra-articular)	12 mice 8 mice	[13] evaluate the efficacy of resorbable polymer loaded with rifampicin and minocycline for preventing PJI [14] evaluate the benefits of combining vancomycin and rifampicin for treating <i>S. aureus</i> infection of joint implants
	Our model [5,16–25]	1996–2011	<i>S. aureus</i>	Hemiarthroplasty of right knee: silicone implant	NZW rabbits [5] 35 animals, [16] 20 animals, [17] 31 animals, [18] 13 animals, [19] 20 animals, [20] 52 animals, [21] 45 animals, [22] 52 animals, [23] 11 animals, [24] 56 animals, [25] 66 animals	Model development [5], antibiotic testing [16,17,20–22,25], evaluation of diagnostic methods [18,19], evaluation of bioactive polymers [23], evaluation of antibiotic-loaded cements [24]
Intra-articular intramedullary	Southwood [9]	1985	<i>S. aureus</i>	Hemiarthroplasty of hip: femoral component with ball bearings and cemented pins	125 short-haired rabbits	Demonstrate reduced resistance to infection in the presence of foreign body
	Alt [11]	2006	<i>S. aureus</i>	Tibial intramedullary locked nail (distal end placed intra-articular)	30 NZW rabbits	Test implant coatings, some of which were gentamicin impregnated
	Antoci [15]	2007	<i>S. aureus</i>	Titanium nail ± vancomycin coating in distal femur (distal end placed intra-articular)	24 Wistar Rats	Test benefits of using vancomycin coating for preventing PJIs
Postoperative intravenous	Blomgren [7] Blomgren [8]	1980 1981	<i>S. aureus</i>	Total knee arthroplasty (cemented femoral and tibial components)	23 NZW rabbits in each study	[7] study the postoperative dissemination of bacteria in the blood after joint replacement [8] test effectiveness of gentamicin cement
	Southwood [9]	1985	<i>S. aureus</i>	Hemiarthroplasty of hip: femoral component with ball bearings and cemented pins	125 short-haired rabbits	Demonstrate reduced resistance to infection in the presence of foreign body
Postoperative intra-arterial	Poultides [12]	2008	<i>S. aureus</i>	Porous tantalum implant in proximal tibia (proximal end placed intra-articular)	30 NZW rabbits	Development of model for PJI

*Staphylococcus aureus*: *S. aureus*.

Each article was analysed to determine the method of inoculation, bacterium used, surgical technique (and more generally the methods, including ethics approval), resemblance of the PJI to the human condition (particularly in terms of function, bone appearance and absence of spontaneous healing), and the goal of the study (development of model, test of local or systemic antibiotics, etc.) (Table 1).

Four methods of inoculation were found:

- intra-operative intra-articular inoculation [5,6,10,13,14,16–25]. This consisted of injecting the inoculum (0.1 to 0.5 ml depending on the protocol) into the joint after a device had been implanted (Table 1) and the skin closed; a 1 cc syringe with a 16G needle was used in these cases;
- intra-operative intramedullary inoculation [9,11,15]. This consisted of injecting the inoculum into the bone's medullary canal before implantation, at the time of the diaphyseal

catheterization (generally using a syringe with a 16G needle, and injecting 0.002 to 0.1 ml of bacterial suspension, depending on the animal species);

- postoperative intravenous inoculation [7–9]. This consisted of injecting the inoculum (1 ml bacterial suspension) in a peripheral vein (ear vein in rabbits) after implantation using a 22–24G catheter;
- postoperative intra-arterial inoculation [12]. This consisted of injecting the inoculum into the femoral artery after implantation; this method required exposing the femoral artery 2 cm above the knee joint and then introducing a 26G catheter to inject 1 ml of bacterial suspension.

For all the models, independent of the method of inoculation, the infection diagnosis was made based on microbiological analysis (particularly, bacterial counts) of the bone harvested during the

**Table 2**  
Comparison of infection, mortality and spontaneous healing rates in the various animal models found in the literature search.

Type of inoculation	First author	Year of publication	Infection rate (in controls if antibiotics being tested) (%)	Mortality rate	Spontaneous healing rate (%)
Intra-operative intra-articular	Schurman [6]	1978	81	9%	19
	Craig [10]	2005	75	5%	25
	Bernthal [13]	2010 [13]	100	Not specified	0
	Niska [14]	2013 [14]	77	Not specified	23
	Our own model [5,16–25]	1996–2011	93	23% (average mortality rate when specified)	7
Intra-operative intramedullary	Southwood [9]	1985	70	17%	30
	Alt [11]	2006	88	11%	12
	Antoci [15]	2007	100	Not specified	0
Postoperative intravenous	Blomgren [7]	1980	50	56%	50
	Blomgren [8]	1981	70	Not specified	30
	Southwood [9]	1985	47	28%	53
Postoperative intra-arterial	Poultides [12]	2008	100	37%	0

animals' autopsy. In most studies, the diagnosis was supplemented with histological or radiographical analysis.

### 3. Results

Local injection of the inoculum (intra-articular or intramedullary) was the method of the inoculation that led to the highest infection rate (75–100% for intra-articular and 70–100% for intramedullary) and the lowest mortality rate (Table 2). Even though the mortality rate was not always reported [5,8,13–15,20–22,24,25], it was estimated to be 5 to 23% for intra-articular inoculation [6,10,16–19,23], and 11 to 17% for intramedullary inoculation [8,10]. In our own rabbit model of intra-articular inoculation [5,16–25], the number of deaths increased when rifampicin was given; the observed 23% rate in the last study was due to profuse diarrhoea in rabbits (non-published data).

The spontaneous healing rate was 0 to 25% for intra-articular inoculation and 0 to 30% for intramedullary inoculation.

The other inoculation methods, namely intravenous and intra-arterial, produced lower infection rates (47–70% infection rate after IV inoculation with 30–53% spontaneous healing, possibly due to a lavage effect of rabbit serum) or led to excess mortality (37% for intra-articular and 28–56% for intravenous inoculation).

### 4. Discussion

Direct local inoculation (either intramedullary or intra-articular) is the most effective inoculation method in studies of chronic PJIs, resulting in a high infection rate and low mortality rate relative to the other methods of inoculation. The other methods (intra-arterial and intravenous) led to higher mortality rate, probably due to the technical challenges associated with arterial catheterization in the lower limbs of small animals and likely bacteraemia with severe secondary infection [9]. This may explain why few studies have been published with these methods of inoculation.

Although the direct inoculation model does not simulate blood-borne infections, it makes it possible to study the large majority of early PJIs. For this reason, it has been used during animal model development, study of the pathophysiology of infection and also treatments.

The implant used is an important element to consider, particularly because of biofilm formation. It would be interesting to test new materials or materials that resemble those used in humans.

Other variables affect the infection rate, mortality rate and spontaneous healing rate, such as the animal species and type of microorganism.

Most of the models reviewed use rabbits because of their reactions to infection, which mimic human joint infections (inflammatory scar, skin fistula, osteitis on radiographs, reduced joint range of motion) and the ease of performing surgical procedures on them, including joint replacement [26]. The pharmacokinetics of antibiotics in rabbits is close to that of humans, making it possible to evaluate new treatments and other pathophysiological features, such as the effect of the virulence of *Staphylococcus aureus* in vivo. And finally, these animals are more susceptible to infection than rats or mice, and do not cost too much, especially in comparison to large animals such as sheep and pigs [27]. However, they have poor digestive tolerance to certain antibiotics (namely rifampicin), which can induce severe diarrhoea and cause elevated mortality.

Most models use a strain of *S. aureus* because this is a very common pathogen found in musculoskeletal infections, particularly in PJIs in humans. There is joint and bone tropism, which is the subject of other studies. But other bacteria can cause certain PJIs, and the strains used do not necessarily represent the causative agents in humans [28]. The main limitation of this review is that none of the models used a strain of coagulase-negative staphylococci, which is common in humans [29]. The goal of developing models of PJI in animals revolves around the possibility of studying the pathophysiology of such infections, and the treatment possibilities that ensue. This requires research into the microorganisms representative of the bacterial population found in musculoskeletal infections in humans. Moreover, the use of different species of animals and different types of implants can make it difficult to compare the various models; this is another important limitation of this review.

### 5. Conclusion

Direct inoculation is the most effective experimental contamination method used to obtain a PJI, but this procedure does not model infection disseminated through the blood or by proximity. Experimental models of blood-borne infections are trickier to implement, and they induce lower infection rates and excessive mortality.

### Funding

None.

## Disclosure of interest

L.G. and A.S.M. declare that they have no competing of interest.

P.M.: consulting activity and conference participation: Ceram-concept, Zimmer, Evolutis, Synthes, Microport.

A.-C.C.: consulting activity and conference participation: Janssen-Cilag, Novartis, Astra Zeneca, Aventis, and Heraeus.

## References

- [1] Norden CW, Myerowitz RL, Keleti E. Experimental osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*: a radiographic-pathological correlative analysis. *Br J Exp Pathol* 1980;61:451–60.
- [2] An YH, Friedman RJ. Animal models of orthopedic implant infection. *J Invest Surg* 1998;11:139–46.
- [3] Crémieux AC, Saleh-Mghir A. Infections ostéo-articulaires en milieu chirurgical : l'exemple des infections sur prothèses articulaires. Apport du modèle expérimental pour le choix des thérapeutiques. In: SFAR, editor. Conférences d'actualisation. Paris: Elsevier; 2003. p. 539–44.
- [4] Crémieux AC. Modèles expérimentaux d'infections ostéoarticulaires. In: MAPAR, editor. Communications scientifiques. Paris: MAPAR éditions; 1999. p. 397–403.
- [5] Belmatoug N, Crémieux AC, Bleton R, Volk A, Saleh-Mghir A, Grossin M, et al. A new model of experimental prosthetic joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a microbiologic, histopathologic, and magnetic resonance imaging characterization. *JID* 1996;174:414–7.
- [6] Schurman DJ, Trindade C, Hirshman HP, Moser K, Kajiyama G, Stanford BS, et al. Antibiotic-acrylic bone cement composites. Studies of gentamicin and palacos. *JBJS* 1978;60-A:978–84.
- [7] Blomgren G, Lindgren U. The susceptibility of total joint replacement to hematogenous infection in the early postoperative period: an experimental study in the rabbit. *Clin Orthop Relat Res* 1980;151:308–12.
- [8] Blomgren G, Lindgren U. Late hematogenous infection in total joint replacement. *Clin Orthop Relat Res* 1981;155:244–8.
- [9] Southwood RT, Rice JL, McDonald PJ, Hakendorf PH, Rozenblids MA. Infection in experimental hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg* 1985;67-B:229–31.
- [10] Craig MR, Poelstra KA, Sherrell JC, Kwon MS, Belzile EL, Brown TE. A novel total knee arthroplasty infection model in rabbits. *J Orthop Res* 2005;23:1100–4.
- [11] Alt V, Bitschnau A, Osterling J, Sewing A, Meyer C, Kraus R, et al. The effects of combined gentamicin-hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. *Biomaterials* 2006;27:4627–34.
- [12] Poultsides LA, Papatheodorou LK, Karachalios TS, Khaldi L, Maniatis A, Petinaki E, et al. Novel model for studying hematogenous infection in an experimental setting of implant-related infection by a community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* strain. *J Orthop Res* 2008;26:1355–62.
- [13] Bernthal NM, Stavrakis AI, Billi F, Cho JS, Kremen TJ, Simon SI, et al. A mouse model of post-arthroplasty *Staphylococcus aureus* joint infection to evaluate in vivo the efficacy of antimicrobial implant coatings. *Plos One* 2010;5(9):e12580.
- [14] Niska JA, Shahbazian JH, Ramos RI, Francis KP, Bernthal NM, Miller LS. Vancomycin-rifampicin combination therapy has enhanced efficacy against an experimental *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5080–6.
- [15] Antoci V, Adams CS, Hickok NJ, Shapiro IM, Parvizi J. Vancomycin bound to Ti rods reduces periprosthetic infection. *Clin Orthop Relat Res* 2007;461:88–95.
- [16] Crémieux AC, Saleh-Mghir A, Bleton R, Manteau M, Belmatoug N, Massias L, et al. Efficacy of sparflaxacin and autoradiographic diffusion pattern of [14C] sparflaxacin in experimental *Staphylococcus aureus* joint prosthesis infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2111–6.
- [17] Saleh-Mghir A, Crémieux AC, Bleton R, Ismael F, Manteau M, Dautrey S, et al. Efficacy of teicoplanin and autoradiographic diffusion pattern of [14C] teicoplanin in experimental *Staphylococcus aureus* infection of joint prostheses. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2830–5.
- [18] Sarda L, Saleh-Mghir A, Peker C, Meulemans A, Crémieux AC, Le Guludec D. Evaluation of 99mTc-ciprofloxacin scintigraphy in a rabbit model of *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection. *J Nucl Med* 2002;43:239–45.
- [19] Sarda-Mantel L, Saleh-Mghir A, Welling MM, Meulemans A, Vrigneaud JM, Raguin O, et al. Evaluation of 99mTc-UBI 29–41 scintigraphy for specific detection of experimental *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:1302–9.
- [20] Saleh-Mghir A, Ameur N, Muller-Serieys C, Ismael F, Lemaitre F, Massias L, et al. Combination of quinupristin-dalfopristin (Synercid) and rifampicin is highly synergistic in experimental *Staphylococcus aureus* joint prosthetic infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1122–4.
- [21] Muller-Serieys C, Saleh-Mghir A, Massias L, Fantin B. Bactericidal activity of the combination of levofloxacin with rifampicin in experimental prosthetic knee infection in rabbits due to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2145–8.
- [22] Saleh-Mghir A, Muller-Serieys C, Dinh A, Massias L, Crémieux AC. Adjunctive rifampicin is crucial to optimizing daptomycin efficacy against rabbit prosthetic joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4589–93.
- [23] Crémieux AC, Pavon-Djavid G, Saleh-Mghir A, Hélarly G, Migonney V. Bioactive polymers grafted on silicone to prevent *Staphylococcus aureus* prosthesis adherence: in vitro and in vivo studies. *J Appl Biomater Biomech* 2003;1:178–85.
- [24] Ismael F, Bléton R, Saleh-Mghir A, Dautrey S, Massias L, Crémieux AC. Teicoplanin-containing cement spacers for treatment of experimental *Staphylococcus aureus* joint prosthesis infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3365–7.
- [25] Gatin L, Saleh-Mghir A, Tasse J, Ghout I, Laurent F, Crémieux AC. Ceftaroline-fofamid efficacy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rabbit prosthetic joint infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:6496–500.
- [26] Crémieux AC, Carbon C. Experimental models of bone and prosthetic joint infections. *Clin Infect Dis* 1997;25:1295–302.
- [27] An YH, Hill CM, Friedman RJ. Animal models of orthopaedic implant infection. In: Wilson M, Devine D, editors. Medical implications of biofilms. Cambridge: Cambridge University Press; 2003. p. 59–85.
- [28] Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens* 2013;2:288–356.
- [29] Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004;351:1645–54.

# Ceftaroline-Fosamil Efficacy against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Rabbit Prosthetic Joint Infection Model

Laure Gatin,<sup>a</sup> Azzam Saleh-Mghir,<sup>a</sup> Jason Tasse,<sup>b</sup> Idir Ghout,<sup>c</sup> Frédéric Laurent,<sup>b</sup> Anne-Claude Crémieux<sup>a</sup>

EA 3647, Faculté de Médecine Paris-Ile-de-France Ouest, Université Versailles Saint-Quentin en Yvelines, Hôpital Raymond Poincaré, Garches, France<sup>a</sup>; Laboratoire de Bactériologie, Hôpital de la Croix Rousse, Centre National de Référence des Staphylocoques, INSERM Unité 851, Faculté de Médecine Lyon-Est, Lyon, France<sup>b</sup>; URC Paris-Ouest Laboratoire de Biostatistiques, Hôpital Ambroise Pare, Boulogne-Billancourt, France<sup>c</sup>

**Ceftaroline (CPT), the active metabolite of the prodrug ceftaroline-fosamil (CPT-F), demonstrates *in vitro* bactericidal activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and is effective in rabbit models of difficult-to-treat MRSA endocarditis and acute osteomyelitis. However, its *in vivo* efficacy in a prosthetic joint infection (PJI) model is unknown. Using a MRSA-infected knee PJI model in rabbits, the efficacies of CPT-F or vancomycin (VAN) alone and combined with rifampin (RIF) were compared. After each partial knee replacement with a silicone implant that fit into the tibial intramedullary canal was performed,  $5 \times 10^7$  MRSA CFU (MICs of 0.38, 0.006, and 1 mg/liter for CPT, RIF, and VAN, respectively) was injected into the knee. Infected animals were randomly assigned to receive no treatment (controls) or CPT-F (60 mg/kg of body weight intramuscularly [i.m.]), VAN (60 mg/kg i.m.), CPT-F plus RIF (10 mg/kg i.m.), or VAN plus RIF starting 7 days postinoculation and lasting for 7 days. Surviving bacteria in crushed tibias were counted 3 days after ending treatment. Although the *in vivo* mean  $\log_{10}$  CFU/g of CPT-treated ( $3.0 \pm 0.9$ ,  $n = 12$ ) and VAN-treated ( $3.5 \pm 1.1$ ,  $n = 12$ ) crushed bones was significantly lower than those of controls ( $5.6 \pm 1.1$ ,  $n = 14$ ) ( $P < 0.001$ ), neither treatment fully sterilized the bones (3/12 were sterile with each treatment). The mean  $\log_{10}$  CFU/g values for the antibiotics in combination with RIF were  $1.9 \pm 0.5$  (12/14 were sterile) for CPT-F and  $1.9 \pm 0.5$  (12/14 were sterile) for VAN. In this MRSA PJI model, the efficacies of CPT-F and VAN did not differ; thus, CPT appears to be a promising antimicrobial agent for the treatment of MRSA PJIs.**

Orthopedic joint replacement is an increasingly common surgical procedure worldwide, reflecting the aging of the population (1). While prosthetic joint infection (PJI) is uncommon, it can be a serious complication which entails major morbidity and high costs (1). Perioperative contamination is responsible for most PJIs, which are mainly caused by *Staphylococcus aureus* or *Staphylococcus epidermidis* (2). These microorganisms are often resistant to many commonly used antibiotics. At present, vancomycin (VAN) or daptomycin (DAP) combined with rifampin (RIF) is recommended as the first-line therapy of device-related osteoarticular infections due to methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (3). However, the efficacy of VAN might not be optimal when the MIC of the responsible strain is  $> 1 \mu\text{g/ml}$  (3, 4). Strains with reduced susceptibilities to DAP were described in experimental PJI models and in patients without treatment and in those after VAN or DAP administration (4, 5). Thus, alternative therapies are still needed.

Ceftaroline (CPT) is a broad-spectrum cephalosporin with a high *in vitro* affinity for penicillin-binding protein 2a and bactericidal activity against MRSA. CPT is the active metabolite of the prodrug ceftaroline-fosamil (CPT-F). This compound was recently approved in the United States for the treatment of complicated skin and skin structure infections caused by Gram-positive bacteria. It was effective against rabbit models of difficult-to-treat MRSA endocarditis and acute osteomyelitis (6, 7), but the *in vivo* efficacy of CPT against a MRSA PJI model (4, 8, 9) has not been tested. This study was undertaken to compare the efficacies of CPT-F or VAN alone or combined with RIF against MRSA in a knee PJI model in rabbits that closely simulates human infection. The *in vivo* emergence of strains with reduced susceptibilities to VAN, DAP, RIF, or CPT in untreated and treated rabbits was also investigated.

(This work was presented in part at the 53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Denver, CO, 9 to 13 September 2013 [10]).

## MATERIALS AND METHODS

**Test strain.** This study used MRSA strain ST20121238, which had been isolated from a patient with an infected knee prosthesis. Its virulence was maintained by intraperitoneal injection into mice.

***In vitro* antibiotic susceptibility testing.** CPT, VAN, and RIF MICs were determined with the Etest method (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France), as recommended by the manufacturer. A single inoculum, which was adjusted to a McFarland standard of 0.5 in distilled water, was used. Mueller-Hinton agar plates (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) were inoculated with swabs that were saturated with a suspension of the test organism and incubated for 18 h at 37°C. The MIC was defined as the value at which the inhibition zone intersected the scale of the Etest strip.

**Time-kill curve studies.** The bactericidal activities of CPT or VAN alone or combined with RIF were determined. Overnight cultures were diluted in 10 ml of fresh Mueller-Hinton broth to yield an inoculum of  $10^6$  CFU/ml. The antibiotic concentrations used were equivalent to  $4 \times \text{MIC}$  for CPT, VAN, or RIF. After 0, 3, 6, and 24 h of incubation in a shaking water bath at 37°C, serial dilutions of 0.1-ml samples were subcultured on Mueller-Hinton agar plates (Bio-Rad) and incubated at 37°C for 24 h

Received 11 June 2014 Returned for modification 7 July 2014

Accepted 10 August 2014

Published ahead of print 18 August 2014

Address correspondence to Anne-Claude Crémieux, anne-claude.cremieux@rpc.aphp.fr.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.03600-14

before the numbers of CFU were counted. A bactericidal effect was defined as a  $\geq 3$ -log<sub>10</sub> decrease of the initial inoculum. Synergy was defined as a decrease of  $\geq 2$  log<sub>10</sub> CFU/ml for the combination versus its most active constituent after 24 h of incubation.

**Experimental PJI.** New Zealand White rabbits, each weighing 2.5 to 3 kg, were used. They were housed in individual cages with natural light-dark cycles. The experimental protocol was in keeping with French legislation on animal experimentation and was approved by the Animal Use Committee of Maisons Alfort Veterinary School.

This model was previously described in detail (11). Briefly, each rabbit underwent partial right knee replacement with a tibial component by an orthopedic surgeon. The surgery was carried out under general anesthesia induced by intramuscular (i.m.) injection of ketamine (Ketamine 1000; Virbac, Carros, France) (25 mg/kg of body weight) and 25 mg/kg of 2% xylazine (Rompun; Bayer Santé, Division Santé Animal, Puteaux, France) and then by continuous inhalation of 1% isoflurane (Vetflurane; Virbac). The skin overlying the right leg was shaved before the operation and cleaned with an iodine solution prior to surgery. A longitudinal skin incision was made, and the knee joint was exposed. After dislocation of the tibia, the epiphyseal plates were removed. The metaphysis was exposed, and the cancellous bone of the medullary cavity of the proximal metaphysis was reamed. A silicone elastomer implant, commonly used in arthroplasty of the first metatarsophalangeal joint (Silastic, great toe implant HP; Swanson Design, Dow-Corning [provided by Wright Medical France, Créteil, France]), was implanted as a tibial prosthetic component. The stem of the nail-shaped silicone implant (14 mm long) was inserted into the intramedullary canal of the tibia; the implant head (15 mm in diameter and 5 mm high) replaced the tibia plateau. Then, the deep fascia and the skin were closed. Immediately after surgery, the animals were inoculated with  $5 \times 10^7$  MRSA CFU in a final volume of 0.5 ml in phosphate-buffered saline by injection into the knee close to the prosthesis. Each rabbit was given patch analgesia (Durogesic; Janssen-Cilag SA, Issy-les-Moulineaux, France) for 7 days following surgery. At least 12 rabbits were randomly assigned to each untreated or treated group, with five groups in total.

**Plasma CPT levels.** Plasma CPT levels in the uninfected rabbits were determined. Initial doses were selected based on previous experimental studies in rabbits (6, 7), and we verified that they achieved pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) parameters equivalent to those obtained in humans who had received 600 mg of CPT intravenously (i.v.) twice daily (b.i.d.) (i.e., similar areas under the concentration-time curve from 0 to 24 h [AUC<sub>0-24</sub>]) and the plasma CPT concentration in this study was at least the MRSA strain ST20121238 MIC for 50% of the 12-h between-dose periods) (12). To achieve equivalence, five rabbits received three i.m. injections of CPT-F. To determine the CPT concentrations, blood was drawn after the injections at 15 min and at 1, 2, 4, 6, 8, and 12 h and frozen until assayed. Samples were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry with an API4000 triple-quadrupole mass spectrometer equipped with a Leap auto sampler and Shimadzu high-performance liquid chromatograph. Samples were processed on ice to minimize ceftaroline hydrolysis. Basic PK parameters were calculated by Phoenix WinNonlin V6.2 using noncompartmental analysis. The lower limit of quantitation was 0.001 mg/liter.

**Treatment and evaluation.** At 7 days postinfection, rabbits began treatment with CPT-F (60 mg/kg of body weight i.m. b.i.d.) or VAN (60 mg/kg i.m. b.i.d.) alone or combined with RIF (10 mg/kg i.m. b.i.d.). VAN and RIF doses were selected based on previous experiments (13) that showed that they obtained concentrations close to those recommended for humans (i.e., trough VAN concentrations of 15 to 20 mg/liter and RIF doses equivalent to a 900-mg daily dose) (3). The CPT-F dose was selected based on the PK study described above. Each regimen was administered for 7 days. Controls were untreated.

Each animal was killed by i.v. injection of pentobarbital 3 days after the end of therapy (i.e., on day 17) to allow for bacterial regrowth after stopping treatment while avoiding the persistence of residual antibiotic in the

bone. Untreated control rabbits were also killed on day 17. Each right hind leg was dissected, and the tibia and femur were separated from the surrounding soft tissues. A smear of the prosthesis was performed on a blood agar plate. For quantitative bacterial counts, the upper third of the tibia (3 cm long), including compact bone and marrow, was isolated, split with a bone crusher, weighed, cut into small pieces, and crushed in an autopulverizer (MM 200; Retsch GmbH, Haan, Germany). The pulverized bone was suspended in 20 ml of sterile water; serial dilutions were made (by adding 9 ml of sterile water to 1 ml of the first suspension and repeating this operation 5 times to obtain a 1/100,000 dilution) and plated (100  $\mu$ l of diluted suspensions) on Columbia agar with 5% sheep blood agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). After 24 h of incubation at 37°C, the number of viable microorganisms was determined. Results are expressed as means  $\pm$  standard deviations (SD) of the log<sub>10</sub> CFU/g of bone and as the number of animals with sterile bone. Bone was considered sterile when the culture showed no growth after incubation for 48 h at 37°C and the number of CFU recorded was the lowest detectable bacterial count (1.64 to 1.84 log<sub>10</sub> CFU/g of bone, depending on sample weight).

**In vivo selection of mutants.** Mutated MRSA resistant to CPT, VAN, or RIF was sought in all control and treated rabbits with positive bone cultures at the end of the treatment period. DAP-resistant strains were also sought in the control and treated rabbits, because previous findings (4) showed that they were found in untreated and VAN-treated rabbits. Each undiluted bone homogenate (50  $\mu$ l) was plated onto Mueller-Hinton II agar and onto Mueller-Hinton II agar supplemented with VAN (0.25, 0.5, 1, or 2 mg/liter), CPT (0.125, 0.25, or 0.5 mg/liter), or DAP (0.5, 1, or 2 mg/liter) plus calcium chloride (50 mg of Ca<sup>2+</sup>/liter) to detect potentially emerging resistant mutants after 72 h of incubation at 37°C. When bacterial growth was observed, the colonies were counted, and *S. aureus* identification was confirmed using matrix-assisted laser-desorption ionization-time of flight mass spectrometry (Vitek MS; bioMérieux). An inoculum at a 0.5 McFarland standard was used to determine the DAP, VAN, RIF, CPT, and oxacillin MICs with Etest (bioMérieux). The Etest was read after 20 h of incubation at 37°C. The results are expressed quantitatively as the number of bacteria grown on antibiotic-containing medium and are reported as the number of mutants/g of bone. Mutants were defined as having a 3-fold-greater MIC than that of the initial strain.

**Statistical analyses.** The results are expressed as means  $\pm$  SD. Bacterial densities in bone were compared among the experimental groups by analysis of variance, followed by Scheffe's test for multiple comparisons. *P* values of <0.05 defined significance.

## RESULTS

**In vitro studies.** The CPT, VAN, RIF, and DAP MICs were 0.38, 1, 0.006, and 0.064 mg/liter, respectively.

**In vitro killing.** Curves obtained at 4 $\times$  MIC (Fig. 1) showed CPT bactericidal activity with or without RIF. RIF enhanced the VAN and CPT killing rates by approximately 2 log<sub>10</sub> CFU and 1 log<sub>10</sub> CFU, respectively, at 24 h.

**CPT levels in rabbits.** After three CPT-F injections (60 mg/kg i.m. b.i.d.), the mean peak plasma concentration (15 min after injection) in five uninfected animals was 37.9 mg/liter at a maximum time of 1 h postinjection. The mean AUC<sub>0-24</sub> was 76.2 mg  $\cdot$  h/liter. With this dose, the plasma concentrations exceeded that of the test-strain MIC >50% of the time between two injections.

**Therapeutic studies.** All control animals infected with MRSA strain ST20121238 had positive prosthesis smear cultures, and the mean  $\pm$  SD bacterial count in these animals was  $5.66 \pm 1.15$  log<sub>10</sub> CFU/g of bone (Table 1). Only three of the 12 CPT-treated animals and three of the 12 VAN-treated animals had sterile bones, even though their mean bone bacterial densities were significantly lower than that of the control animals (*P* < 0.01). The mean bacterial counts of CPT- and VAN-treated animals were comparable. Adjunctive RIF with CPT or VAN was significantly more effective

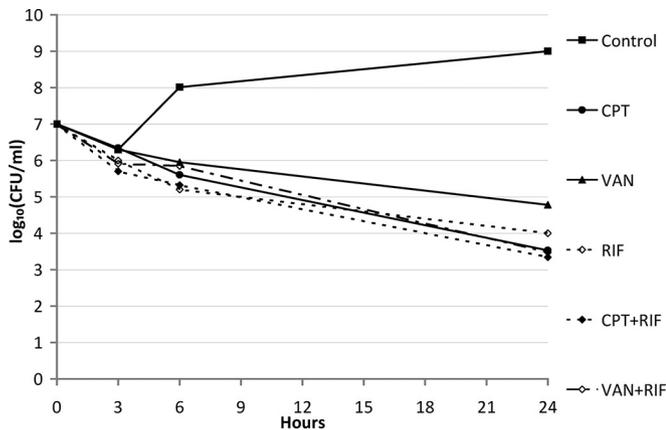


FIG 1 *In vitro* time-kill curves for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain ST20121238, using different antibiotics and combinations thereof at concentrations equivalent to  $4\times$  MIC. CPT, ceftaroline; VAN, vancomycin; RIF, rifampin.

than monotherapy. VAN-RIF and CPT-RIF achieved sterile bone in 12 of 14 rabbits in each group. The mean bacterial counts of the two groups were significantly lower than those of the untreated controls and of the groups treated with either agent alone (Fig. 2).

**Subpopulation analysis of untreated and treated rabbits.** No CPT-, VAN-, or RIF-resistant mutant strains were detected in the treated or untreated animals. Conversely, DAP-resistant mutant strains (i.e., MICs of 0.75 mg/liter [ $n = 2$ ] or 1 mg/liter [ $n = 1$ ]) emerged in 3/11 untreated rabbits, with  $>100$  mutant CFU/g of bone in each of the three animals. In 3/9 VAN-treated animals, DAP-resistant mutant strains emerged and had MICs of 0.5 mg/liter ( $n = 1$ ) and 1.5 mg/liter ( $n = 2$ ), and the strain with a 1.5-mg/liter MIC reached the DAP breakpoint of 1 mg/liter. Mutant density ranged from 3 to  $>100$  CFU/g (Tables 2 and 3). DAP-resistant mutant strains did not emerge with CPT alone, CPT-RIF, or VAN-RIF.

All six postinfection DAP-resistant mutant strains had reduced oxacillin MICs (i.e., a seesaw effect). In contrast, the CPT and VAN MICs remained stable in those mutant strains (Table 3).

## DISCUSSION

The results of this study show that VAN or CPT-F had comparable efficacies alone or combined with RIF in a rabbit model of MRSA PJI when a CPT dose equivalent to a human dose of 600 mg i.v. b.i.d. was administered (12). Indeed, the mean CPT  $AUC_{0-24}$  in the rabbits was 76.2 mg · h/liter versus 65 mg · h/liter in healthy

TABLE 1 Antibiotic efficacy against experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic knee infection model in rabbits

Treatment <sup>a</sup>	No. of rabbits with sterile bone/total no. of rabbits	$\log_{10}$ CFU/g of bone (mean $\pm$ SD)
None	0/14	5.66 $\pm$ 1.15
CPT-F	3/12	2.96 $\pm$ 0.92 <sup>b</sup>
VAN	3/12	3.51 $\pm$ 1.10 <sup>b</sup>
CPT-F plus RIF	12/14	1.87 $\pm$ 0.46 <sup>c</sup>
VAN plus RIF	12/14	1.91 $\pm$ 0.46 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> For 7 days, rabbits were injected with CPT-F (60 mg/kg i.m. b.i.d.) or VAN (60 mg/kg i.m. b.i.d.) alone or combined with RIF (10 mg/kg i.m. b.i.d.).

<sup>b</sup> Significantly different versus untreated controls ( $P < 0.01$ ).

<sup>c</sup> Significantly different versus monotherapy ( $P < 0.01$ ).

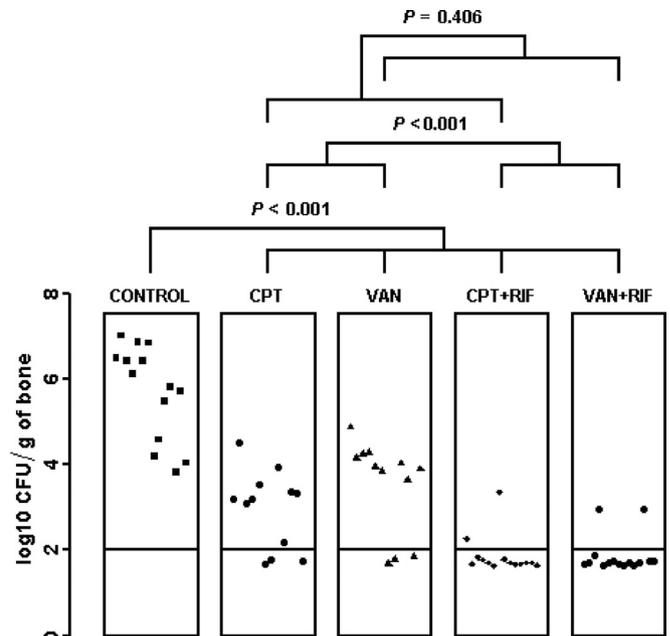


FIG 2 Antibiotic effect against a rabbit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain ST20121238 prosthetic knee infection model. Rabbits were injected for 14 days with ceftaroline (CPT) (60 mg/kg i.m. b.i.d.) or vancomycin (VAN) (60 mg/kg i.m. b.i.d.) alone or combined with rifampin (RIF) (10 mg/kg i.m. b.i.d.). Bone was considered sterile when the culture showed no growth after incubation for 48 h at 37°C and the number of recorded CFU was the lowest detectable bacterial count (1.64 to 1.84 CFU/g of bone, depending on the weight of the sample).

adults (12), and the mean peak plasma concentrations in the rabbits and in healthy adults were 38 mg/liter and 31 mg/liter, respectively. With this equivalent dose the plasma CPT concentration in this study exceeded the test strain MIC for  $>50\%$  of the 12-h between-dose periods; this concentration provided a suitable PD parameter to obtain a bactericidal effect *in vitro* and *in vivo* (14).

Unlike linezolid, CPT was bactericidal *in vivo* against a rabbit model of MRSA endocarditis (6). In that model, the efficacy of linezolid did not differ from that of VAN. In an acute MRSA-infected osteomyelitis rabbit model (7), CPT significantly decreased the bacterial densities in joint fluid, bone marrow, and bone, while VAN was poorly active and caused no significant reduction of the bacterial densities after 4 days of treatment. A combination with RIF was not tested.

In our PJI model, the VAN and CPT-F monotherapies were

TABLE 2 Emergence of DAP-resistant mutants<sup>a</sup> in rabbits with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic knee infection

Treatment group	DAP-resistant mutant emergence by antibiotic (MIC [mg/liter] of the initial strain) <sup>b</sup>		
	VAN (1)	DAP (0.064)	CPT (0.38)
Control	0/11	3/11	0/11
VAN	0/9	3/9	0/9
CPT-F	0/9	0/9	0/9

<sup>a</sup> A mutant strain was defined as having a 3-fold-greater MIC than that of the initial strain.

<sup>b</sup> Numbers of rabbits with DAP-resistant mutants appearing/total no. of rabbits in group.

TABLE 3 Antibiotic MICs of the DAP-resistant mutant strains that showed a seesaw effect in six rabbits

Treatment group and rabbit no.	MIC (mg/liter) (initial MIC, mg/l) for:			
	DAP (0.064)	VAN (1)	Oxacillin (1)	CPT (0.38)
Control				
1	0.75	2	0.19	0.5
2	0.75	2	0.25	0.5
4	1	2	0.38	1
VAN				
21	0.5	2	0.38	0.5
30	1.5	2	0.38	0.5
38	1.5	2	0.38	0.5

effective. The combination with RIF significantly increased their efficacies and sterilized bone in most of the animals. This remarkable efficacy achieved with additional RIF is not surprising. It was previously described in the same model (4) and in other experimental bone and joint models with other companion drugs long ago (9). It is thought to be due to the bactericidal activity of RIF against slow-growing enclosed bacteria (15). However, our results confirm its efficacy in combination with CPT-F, with no emergence of RIF-resistant strains in this model of difficult-to-treat infection, and its ability to allow retention of the infected prosthesis.

We previously showed that less susceptible DAP-resistant mutant strains were selected in untreated animals with PJI (4). The natural emergence of DAP-resistant mutant strains could reflect the organism's exposure to endogenous host defense cationic peptides, because those strains exhibited cross-resistance to those peptides (5). Similar mutant emergence was observed herein, which thereby confirms the reproducibility of this phenomenon. VAN did not prevent the emergence of DAP-resistant mutant strains, as in our previous study (4), despite the unchanged VAN MICs of those DAP-resistant mutant strains. In contrast, no DAP-resistant mutant strain could be detected in the CPT-treated rabbits. This absence may be explained by the bactericidal effect of CPT on the DAP-resistant strains (i.e., no cross-resistance). Indeed, DAP-resistant strains were susceptible to CPT; the MICs were unchanged compared to those of the initial strain. Interestingly, the oxacillin MICs of all of those mutant strains were diminished 2-fold, which suggests a so-called oxacillin-DAP seesaw effect (5). CPT-F might be a therapeutic option for treatment failures due to the emergence of DAP-resistant strains as either an alternative therapy or combined with DAP. Indeed, clinical observations (16) and *in vitro* data (17) suggest that adding CPT to DAP could restore DAP susceptibility to DAP-resistant strains (16).

Our study has several limitations. The main one is that, like most experimental studies, we used a single MRSA strain. The CPT MIC of this strain was less than the MIC<sub>90</sub> of MRSA (18), and a higher CPT-F dose might be necessary for strains that have higher MICs. Also, we used a silicone elastomer implant, and microbiological findings may be modified by the use of other compounds (e.g., metallic implants, such as titanium or stainless steel), which are often used in orthopedic surgery. Moreover, treatment was started 7 days postinoculation to simulate an acute postoperative infection, and antibiotics might be less effective against a more chronic infection. Advantages of the rabbit model used in this study include its similarity with human acute early postoperative PJI and its reproducibility.

In conclusion, in this experimental rabbit model of MRSA PJI, CPT-F was as effective as VAN. CPT-F appears to be a promising antimicrobial agent for the treatment of MRSA PJIs.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by a research grant from AstraZeneca, France.

We thank Omar Aimé and Thomas Lilin's team for their help during the experimental process.

A.-C.C. has received grants from Janssen-Cilag, Novartis, AstraZeneca, Aventis, and Heraeus for consultancies, workshops, and travel to meetings and accommodations. The other authors report no conflicts of interest regarding this study.

#### REFERENCES

- Darouiche RO. 2004. Treatment of infections associated with surgical implants. *N. Engl. J. Med.* 350:1422–1429. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMr035415>.
- Del Pozo JL, Patel R. 2009. Infection associated with prosthetic joints. *N. Engl. J. Med.* 361:787–794. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMcp0905029>.
- Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, Kaplan SL, Karchmer AW, Levine DP, Murray BE, Rybak JM, Talan DA, Chambers HF. 2011. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. *Clin. Infect. Dis.* 52:285–292. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir034>.
- Saleh-Mghir A, Muller-Serieys C, Dinh A, Massias L, Crémieux AC. 2011. Adjunctive rifampin is crucial to optimizing daptomycin efficacy against rabbit prosthetic joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:4589–4593. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00675-11>.
- Mishra NN, Yang SJ, Chen L, Muller C, Saleh-Mghir A, Kuhn S, Peschel A, Yeaman MR, Nast CC, Kreiswirth BN, Crémieux AC, Bayer AS. 2013. Emergence of daptomycin resistance in daptomycin-naïve rabbits with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection is associated with resistance to host defense cationic peptides and *mprF* polymorphisms. *PLoS One* 8:e71151. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071151>.
- Jacqueline C, Caillon J, Le Mabecque V, Miègeville AF, Hamel A, Bugnon D, Ge JY, Potel G. 2007. *In vivo* efficacy of ceftaroline (PPI-0903), a new-broad spectrum cephalosporin, compared with linezolid and vancomycin against methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a rabbit endocarditis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3397–3400. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01242-06>.
- Jacqueline C, Amador G, Caillon J, Le Mabecque V, Batard E, Miègeville AF, Biek D, Ge Y, Potel G, Hamel A. 2010. Efficacy of the new cephalosporin ceftaroline in the treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acute osteomyelitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:1749–1752. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq193>.
- Crémieux AC, Saleh-Mghir A, Bléton R, Manteau M, Belmatou N, Massias L, Garry L, Sales N, Mazière B, Carbon C. 1996. Efficacy of sparflaxacin and autoradiographic diffusion pattern of [<sup>14</sup>C]sparflaxacin in experimental *Staphylococcus aureus* joint prosthesis infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2111–2116.
- Crémieux AC, Carbon C. 1997. Experimental model of bone and prosthetic joint infections. *Clin. Infect. Dis.* 25:1295–1302. <http://dx.doi.org/10.1086/516135>.
- Gatin L, Saleh-Mghir A, Laurent F, Crémieux A-C. 2013. Abstr. 53rd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr B-485.
- Belmatou N, Crémieux AC, Bléton R, Volk A, Saleh-Mghir A, Grossin M, Garry L, Carbon C. 1996. A new model of experimental prosthetic joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a microbiologic, histopathologic and magnetic resonance characterization. *J. Infect. Dis.* 174:414–417. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/174.2.414>.
- Ricobene TA, Su SF, Rank D. 2013. A single- and multiple-dose study to determine the safety, tolerability, and pharmacokinetics of ceftaroline-fosamil in combination with avibactam in healthy subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:1496–1504. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02134-12>.
- Saleh-Mghir A, Ameur N, Muller-Serieys C, Ismael F, Lemaitre F,

- Massias L, Feger C, Bléton R, Crémieux AC. 2002. Combination of Synercid and rifampin is highly synergistic in experimental *Staphylococcus aureus* joint prosthesis infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1122–1124. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.4.1122-1124.2002>.
14. Bhalodi AA, Crandon JL, Biek D, Nicolau DP. 2012. Efficacy of ceftaroline–fosamil in a staphylococcal murine pneumonia model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:6160–6165. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01078-12>.
15. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. 2004. Prosthetic-joint infections. *N. Engl. J. Med.* 351:1645–1654. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra040181>.
16. Rose WR, Schulz LT, Andes D, Striker R, Berti AD, Hutson PR, Shukla SK. 2012. Addition of ceftaroline to daptomycin after emergence of daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* during therapy improves antibacterial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:5296–5302. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00797-12>.
17. Werth BJ, Sakoulas G, Rose WE, Pogliano J, Tewhey R, Rybak MJ. 2013. Ceftaroline increases membrane binding and enhances the activity of daptomycin against daptomycin-nonsusceptible vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:66–73. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01586-12>.
18. Sader HS, Flamm RK, Jones RN. 2013. Antimicrobial activity of ceftaroline-avibactam tested against clinical isolates collected from U.S. Medical Centers in 2010–2011. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:1982–1988. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02436-12>.

**Titre :** Infections péri prothétiques et bactéries multi résistantes : un challenge médico-chirurgical.

**Mots clés :** infection sur prothèse articulaire, modèles animaux, orthopédie, bactéries multi résistantes.

**Résumé :**

La survenue d'une infection péri prothétique (IPP) est la principale complication de la chirurgie prothétique articulaire, depuis son invention par Robert et Jean Judet en 1947. Comme le nombre de prothèses articulaires posées chaque année augmente de façon importante, ces infections sont de plus en plus fréquentes et l'optimisation de leur prise en charge est un enjeu important sur le plan médical et économique.

Les modèles animaux d'IPP permettent de comprendre les mécanismes étiopathogéniques et tester de nouvelles thérapeutiques. Une analyse critique de la littérature a été effectuée en évaluant chaque modèle selon son type d'inoculation qui influence les taux et la sévérité de l'infection expérimentale obtenue.

Un modèle expérimental d'IPP chez le lapin obtenu par remplacement partiel du genou et inoculation locale a été utilisé pour tester l'efficacité de nouvelles thérapeutiques au cours d'infections à deux bactéries multi résistantes qui posent des problèmes en thérapeutique humaine.

Dans un 1er temps nous avons évalué l'efficacité de la ceftaroline (CPT) céphalosporine bactéricide *in vivo* contre le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) en la comparant à la vancomycine en association ou non à la rifampicine.  $5.10^7$  UFC (Unités Formant Colonies) de SARM (Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de 0,38, 0,006, et 1 mg/l pour CPT, RIF, et VAN, respectivement) était injecté dans le genou. Les animaux infectés ont été randomisés et recevaient : aucun traitement (contrôles), CPT (60 mg/kg im), VAN (60 mg/kg im), CPT plus RIF (10 mg/kg im), ou VAN plus RIF débutant 7 jours après l'inoculation et durant 7 jours. L'efficacité des traitements a été évaluée sur la quantité de bactéries persistantes dans l'os (tibia proximal) après traitement. Ce travail a montré que la CPT et la VAN étaient efficaces en monothérapie mais que seule l'association avec la

rifampicine permettait de stériliser la quasi totalité des animaux. La CPT apparaît donc comme un traitement potentiellement efficace dans cette infection.

Dans un 2ème temps nous avons étudié l'efficacité de la colistine (COL) dans le ciment, seule ou en combinaison avec des injections intramusculaires (im) de COL et/ou de méropénème (MRP) dans des infections à *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes (KPC). Un modèle proche de celui décrit pour le SARM a été utilisé. La souche KPC99YC est une souche clinique, résistante à la gentamicine (CMI 8mg/l) intermédiaire à l'imipénème (CMI 4mg/l), et sensible à la COL (CMI 0,25mg/l). L'inoculum était de  $5.10^8$  UFC. Sept jours après l'infection, les prothèses étaient remplacées par espaceur sans antibiotique (contrôle), ou par espaceur imprégné de COL (3 MUI de COL/40g de ciment), ou par espaceur sans antibiotique et injections de COL (12 mg/kg im), ou l'association des deux, ou injections de COL avec espaceur en ciment imprégné de COL associé ou non à des injections de MRP (80 mg/kg im). Le traitement durait 7 jours. Tous les lapins témoins sauf un étaient infectés à J15, avec une moyenne de densité bactérienne de 6,17 [5,69, 7,04] CFU/g d'os. Contrairement à la COL locale, la COL systémique seule ou combinée avec le MRP était plus efficace que le contrôle sur le nombre de bactéries dans l'os à la fin du traitement. L'association COL locale + systémique était significativement plus efficace que le groupe témoin sur le dénombrement bactérien. D'ailleurs, c'était le seul schéma efficace sur le nombre de lapins avec un os stérile. Une souche résistante à la COL a été détectée dans le traitement local seul mais pas avec l'association de COL locale et systémique.

Les modes d'inoculation directs sont les plus efficaces pour reproduire une IPP aigue. Les études expérimentales permettent de tester des traitements innovants en particulier pour les infections à bactéries multi résistantes.

**Titre :** Peri prosthetic infections and multi-resistant bacteria: a medical-surgical challenge.

**Key words :** prosthesis joint infection, animal models, orthopedics, multi-resistant bacteria.

**Abstract :**

The occurrence of prosthetic joint infection (PJI) is the main complication of joint prosthetic surgery since its invention by Robert and Jean Judet in 1947. Since the number of articular prostheses placed each year increases significantly, these infections are more and more frequent and the optimization of their management is an important medical and economic stake.

The animal models of PJI make it possible to understand the etiopathogenic mechanisms and to test new therapeutics. A critical analysis of the literature was carried out by evaluating each model according to its type of inoculation which influences the rates and the severity of the experimental infection obtained.

An experimental model of PJI in rabbits obtained by partial replacement of the knee and local inoculation was used to test the efficacy of new therapeutics during infections with two multi-resistant bacteria which pose problems in human therapeutics.

In a first step we evaluated the efficacy of ceftaroline (CPT) cephalosporin bactericidal *in vivo* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by comparing it with vancomycin (VAN) in combination with or without rifampin (RIF).  $5.10^7$  UFC MRSA (Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 0.38, 0.006, and 1 mg/l for CPT, RIF, and VAN, respectively) was injected into the knee. Infected animals were randomized to receive no treatment (control), CPT (60 mg/kg im), VAN (60 mg/kg im), CPT plus RIF

(10 mg/kg im) or VAN plus RIF, 7 days after inoculation and for 7 days. The efficacy of treatments was evaluated on the amount of persistent bacteria in the bone (proximal tibia) after treatment. This work has shown that CPT and VAN were effective as monotherapy, but only the combination with RIF allowed the sterilization of almost all animals. CPT appears to be a potentially effective treatment in this infection.

In a second step we studied the efficacy of colistin (COL) in cement, alone or in combination with intramuscular (im) injections of COL and/or meropenem (MRP) in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections (KPC). A model close to that used for MRSA was used. The strain KPC99YC is a clinical strain, resistant to gentamicin (MIC 8mg/L) intermediate to imipenem (MIC 4mg/l), and sensitive to COL (MIC 0,25mg/l). The inoculum was  $5.10^8$  UFC. Seven days after the infection, the prosthesis were replaced by antibiotic-free spacer (control), or by COL-impregnated spacer (3 MIU of COL/40g of cement), or by antibiotic-free spacer and COL injections (12 mg/kg im), or the combination of the two, or COL injections with COL-impregnated cement spacer associated or not with MRP injections (80 mg/kg im). The treatment lasted 7 days. All control rabbits but one were infected at D15, with median and interquartile range (IQR) bone bacterial count of 6.17 [5.69, 7.04] CFU/g of bones. In contrast to local COL, systemic COL alone or combined with MRP was more effective than control on bacterial counts in bone at the end of treatment. The combination of COL local + systemic was significantly more effective than control group on bacterial counts. Interestingly it was the only effective regimen on the number of rabbits with sterile bone. One COL-resistant strain was detected in the COL local treatment alone but not with the combination of local and systemic COL.

Direct inoculation modes are most effective in reproducing an acute PJI. The experimental studies allow testing innovative treatments in particular for the infections with multi-resistant bacteria.

