

Diagnostic microbiologique des Infections Ostéo-Articulaires

Dr Céline DUPIEUX-CHABERT

celine.dupieux-chabert@chu-lyon.fr

Laboratoire de Bactériologie – Institut des Agents Infectieux - Hôpital de la Croix Rousse

Centre de Référence des Infections Ostéo-Articulaires Complexes Rhône-Alpes

Diagnostic bactériologique des IOA

- IOA très majoritairement **bactériennes** (97%)
- **Diagnostic bactériologique indispensable** pour affirmer l'infection et choisir le traitement adapté (antibiogramme)
- **Avant antibiothérapie** ou après arrêt prolongé
- Diagnostic bactériologique parfois **difficile**
 - microorganismes très variés, isolement parfois laborieux
 - infections polymicrobiennes
 - interprétation parfois délicate
- Résultats dépendent
 - qualité des **prélèvements**
 - rapidité du **transport** (<2-4h)
 - **techniques** utilisées au laboratoire



Les prélèvements bactériologiques

■ Fistule / cicatrice

- écouvillonnage : à proscrire, mauvaise concordance avec prélèvements profonds
*Mackowiack, JAMA 1978 ;
Treteault et al, J Arthroplasty 2013*
- aspiration profonde après rinçage de la fistule : non recommandée, peu contributif sauf isolement de *S. aureus* (VPP 78%)



■ **Hémocultures** en cas d'infection aiguë

■ **Prélèvements profonds** : liquide articulaire, prélèvements per-opératoires +++

■ **Liquides de drainage** : surveillance du site infecté opéré ; si +, risque accru de récurrence ; ne pas utiliser à visée diagnostique

Prélèvements profonds 1/2

■ Liquide articulaire

- ponction pré-opératoire : documentation utile au choix de la prise en charge chirurgicale en 1 ou 2 temps
- pour la bactériologie :
poudrier ou **tube sec stérile**,
ET **flacons d'hémocultures** aéro/anaérobie ou pédiatrique (mais pas à la place du tube)
- pour la cytologie : tube avec anti-coagulant
(héparine ou citrate)



- Biopsie sous scan (très petite biopsie)
en tube avec un peu de sérum phy stérile

Prélèvements profonds 2/2

■ Prélèvements tissulaires per-opératoires

Ni trop, ni trop peu...

Objectifs : augmenter la sensibilité tout en limitant les contaminations

- Avant antibiothérapie ou après fenêtre antibiotique
- Prélèvements **multiples** +++

Recommandations :

- **minimum 3 prélèvements**
- **optimum 5** à 7 prélèvements

sites anatomiques différents, macroscopiquement pathologiques si possible : os, synoviale, liquide articulaire, pus ...

privilégier tissus d'interface

- 1 prélèvement pour **anatomo-pathologie** (PNN, autres étiologies)



identification du prélèvement, nature, localisation, traitement antibiotique, ATCD...



Prise en charge des prélèvements au laboratoire

- Prélèvements précieux, non renouvelables
- Impératif = **éviter la contamination**
 - Hotte à flux laminaire PSM2
 - Matériel stérile
 - Limiter les manipulations
- Nécessité d'un **prétraitement** des prélèvements solides
- Après ensemencement, **congélation** des surplus de prélèvements jusqu'au rendu définitif (et souvent plus) pour
 - colorations spécifiques
 - éventuelles recherches complémentaires : mycobactéries, champignons, ...
 - techniques moléculaires

Prétraitement des prélèvements

- Les prélèvements solides (fragments d'os ou de tissus) doivent être impérativement **broyés avant ensemencement**




Chronophage
Risque de
contaminations



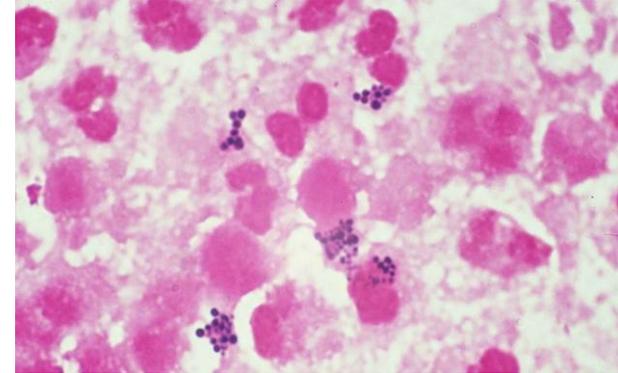
ex : poudrier à billes (prêt à l'emploi, usage unique)

- transport, broyage et conservation des prélèvements
- limite les manipulations donc les risques de contaminations
- libération des bactéries de matrice osseuse/biofilm : ↗ sensibilité

Examen direct

Orientation diagnostique : réaction cellulaire ? présence de bactéries ?

- Coloration de Gram : bactéries
 - sensibilité faible (6 à 30 %, faible sur prothèse)
 - spécificité élevée (99 %)
- Appréciation semi-quantitative des leucocytes
- Cytologie du liquide articulaire
 - Quantification des leucocytes, formule leucocytaire
 - Recherche de microcristaux



	Arthrite septique	Infection de prothèse
Seuil GB	> 10 000/mm ³	> 1 700/mm ³
Seuil PNN	> 90 %	> 65 %

Mise en culture

Bactéries d'IOA chroniques : biofilm / intracellulaire / métaboliquement peu actives + très diverses → **milieux riches variés, nombreux et incubation longue**

Recommandations Référentiel de Microbiologie REMIC

- Gélose au sang en aérobiose
- Gélose au sang cuit, supplémentée, sous 5% de CO₂
- Gélose au sang en anaérobiose
- Milieu liquide Bouillon Schaedler et/ou Bouillon Cœur-Cervelle

Lecture régulière → résultats rendus progressivement à J1, J2... jusqu'aux **résultats définitifs à J14**



attention pousse tardive ou infections polymicrobiennes

- Utilisation possible des **flacons d'hémocultures** avec incubation prolongée jusqu'à J14 dans un automate :
 - ensemencement du liquide articulaire :
 - directement par le préleveur
 - enfant +++
 - ensemencement du broyat en remplacement du milieu liquide

Mise en culture

Incubation longue (14 jours)

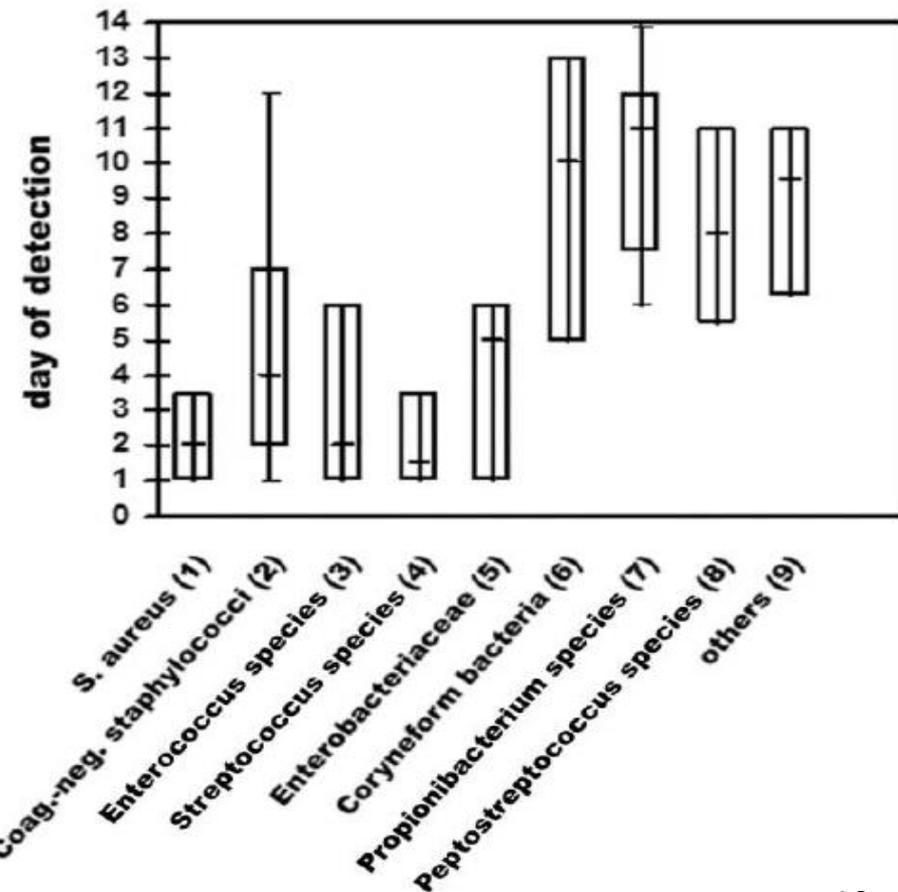
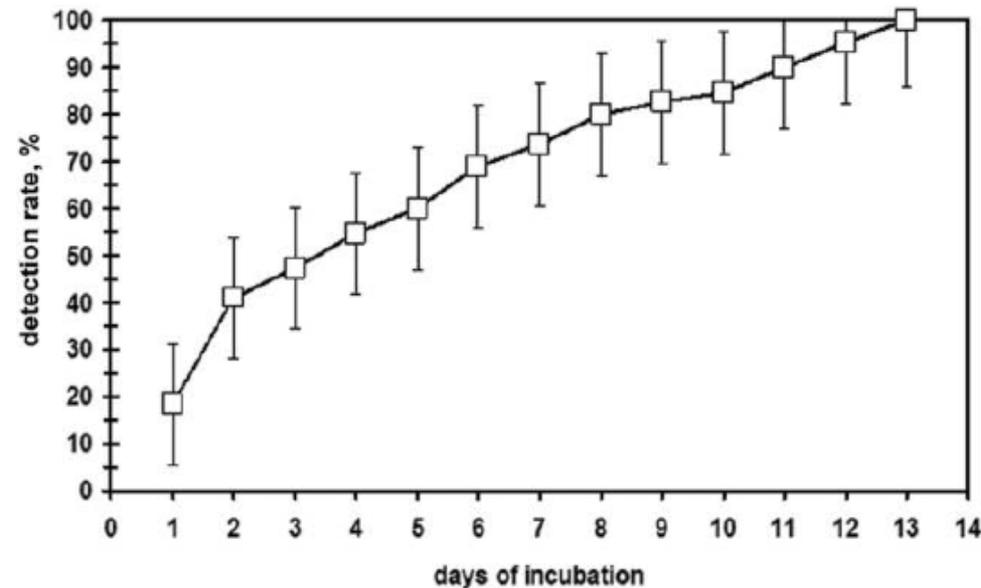
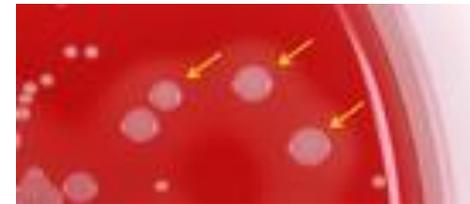


Figure 1. Time to diagnosis of infection by culture. Whisker lines span the 95% Hall-Wellner CI.

Lecture des cultures

■ Lecture attentive :

- détection d'infections **plurimicrobiennes** ($\approx 15\%$)
- recherche des **différents aspects** de colonies même si même espèce
-> différents antibiogrammes
- recherche des **micro-colonies/Small Colony Variants (SCV)** :
 - variants au métabolisme ralenti, d'où croissance retardée
 - parfois difficultés d'identification phénotypique
 - potentiellement plus résistants aux antibiotiques
 - perte activité bactéricide des antibiotiques
 - sources de récives



S. aureus SCV

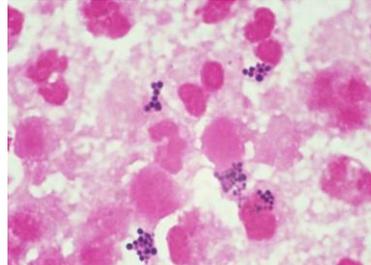
- D'où : observation des cultures par du personnel formé
identification et antibiogramme sur chaque aspect de colonie
conservation de toutes les souches

Interprétation +/- complexe

■ Infections aiguës à espèces classiques

Bactéries « normales »

- ED +
- réaction cellulaire ++
- culture rapide



S. aureus

■ Infections chroniques

Bactéries « stressées »

- ED –
- peu de PNN
- culture lente >> 48 heures
- peu de colonies
- bactéries de la flore cutanée fréquentes sur matériel
- aspects polymorphes des cultures +/- SCV
- antibiogrammes différents

J2



J10



Staphylocoques à coagulase négative

Interprétation des cultures

Fonction de :

- **contexte clinique** (infection aiguë vs chronique, ostéomyélite vs arthrite primitive vs infection sur prothèse, antibiothérapie préalable)
- la ou les **espèces** identifiées
- la nature et le **nombre** des **prélèvements positifs** et éventuellement, pour ces derniers, le **nombre de milieux positifs et de colonies** observées

Mais : pas de consensus définitif

Interprétation des cultures

■ Retenir le diagnostic d'IOA quand

- ≥ 2 ou 3 prélèvements per-opératoires

ou 2 prélèvements espacés dans le temps (1 per-op + 1 liq articulaire ou 1 hémoc)

positifs à la même bactérie (**même espèce et même antibiogramme**) appartenant à la **flore cutanée** (SCN, *C. acnes*, corynébactéries, ...)

- ≥ 1 prélèvement (per-op ou pré-op ou hémoc) positif à une bactérie virulente, n'appartenant pas à la flore cutanée ou pour laquelle la question d'une contamination ne se pose pas (*Staphylococcus aureus*, entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Campylobacter* spp., *Pasteurella*, ...)

■ Infection probablement exclue

En absence de signe histologique, cytologique ou clinique

- tous les prélèvements per-opératoires stériles (à condition d'avoir été réalisés après 15 jours d'arrêt de toute antibiothérapie)
- 1 seul prélèvement per-opératoire positif à une bactérie de la flore cutanée ou avirulente

Que faire des prélèvements restés stériles ?

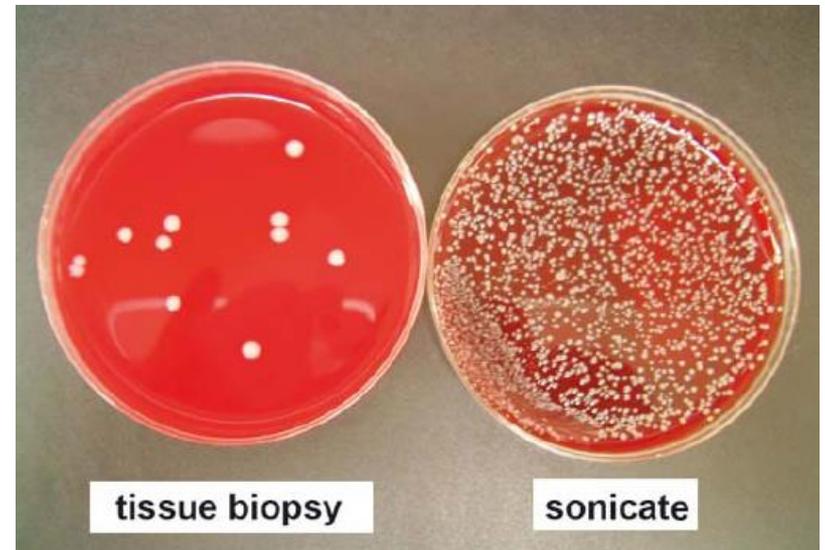
➡ 10 à 25 % des IOA selon les séries et les contextes épidémiocliniques

- patient sous antibiotique (arrêt minimum 15 j)
- prélèvement mal fait
- transport trop long
- culture inadéquate
- bactérie trop fragile
- mycobactérie
- espèce particulière et/ou non cultivable

Comment améliorer le diagnostic ?

Sonication des implants

- Objectif : décoller les bactéries engluées dans le biofilm sur le matériel
- Sonication des prothèses et matériels dans soluté de Ringer puis ensemencement du liquide *(Trampuz et al. N Engl J Med 2007)*



Sonicate considéré positif si ≥ 5 UFC / 0,5 mL

↗ sensibilité de la culture (Se 78,5 % ; Spé 98,8 %)

Intérêt quand fenêtre antibiotique trop courte ou inexistante
Mais pas d'étude comparative par rapport au broyage (équivalent ?)
et lourdeur pour le laboratoire

Approches moléculaires

■ Pour documenter l'infection

• PCR universelle 16S

Avantage : pas d'a priori

Problèmes : manque de sensibilité (< à la culture) -> **contributive que si +**
pb pour les infections plurimicrobiennes
laboratoires spécialisés, délais et coûts

Bemer et al, J Clin Microbiol 2014 ; Levy et al, Am J Med 2013

• PCR ciblées : + sensibles que PCR 16S

- *Kingella kingae* (enfant < 4 ans)
- *Staphylococcus spp* et *S. aureus*
- *Streptococcus spp* et *S. pneumoniae*
- *Cutibacterium acnes*

Chometon et al, Pediatr Infect Dis J 2007

■ **Indications plutôt limitées** : à réserver quand culture – et forte suspicion d'IOA, notamment si patient sous ATB

Avenir :
métagénomique ?

Approches moléculaires rapides

■ Pour orienter le traitement probabiliste

- **Diagnostic en \approx 1h des IOA à SASM et SARM** par le test GeneXpert MRSA (détection *S. aureus* et gène *mec*)
 - **sensibilité et spécificité excellentes** → adaptation précoce du traitement probabiliste (stop vancomycine ou daptomycine)
 - pb coût : sur combien de prélèvements le faire et lesquels ?

*Dubouix-Bourandi et al, J Clin Microbiol 2011 ;
Valour et al, Diagn Microbiol Infect Dis 2014*

■ Tests PCR multiplex (« syndromiques »)

- Unyvero ITI, Biofire FilmArray JI...
- Problèmes : espèces ciblées limitées, manque de sensibilité quand faible inoculum
- Uniquement quelques marqueurs de résistance

Malandain et al, Clin Microbiol Infect 2018



A RETENIR Diagnostic microbiologique des IOA

- Rôle fondamental dans le diagnostic et le traitement des IOA (**antibiogramme**)
- **Points clés du diagnostic microbiologique**
 - Qualité (asepsie) et gestion des prélèvements
 - Conditions de cultures
 - Résultats échelonnés parfois longs à obtenir
 - Collaboration indispensable bactériologiste - chirurgien - infectiologue
- **Nouveaux outils** : doivent trouver leur place
 - Amélioration des cultures
 - Outils moléculaires
 - Biomarqueurs

CULTURE !

Références bibliographiques

- Recommandations de pratique clinique « Infections ostéo-articulaires sur matériel (prothèse, implant, ostéo-synthèse) ». SPILF, 2009
- Recommandation de bonne pratique « Prothèse de hanche ou de genou : diagnostic et prise en charge de l'infection dans le mois suivant l'implantation ». HAS, 2014
- Second International Consensus Meeting (ICM) on orthopaedic infections. 2018
- Référentiel en microbiologie médicale, 6ème édition. Société Française de Microbiologie, 2018