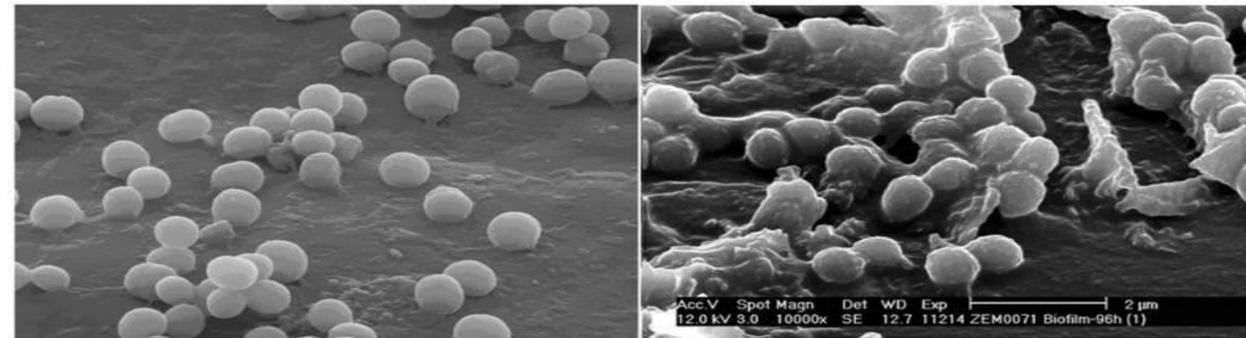




# Diagnostic microbiologique des infections ostéo-articulaires



Chloé PLOUZEAU



Laura CHAUFOUR



Laboratoire de Bactériologie CHU de POITIERS

Groupe Microbiologie du CRIOGO

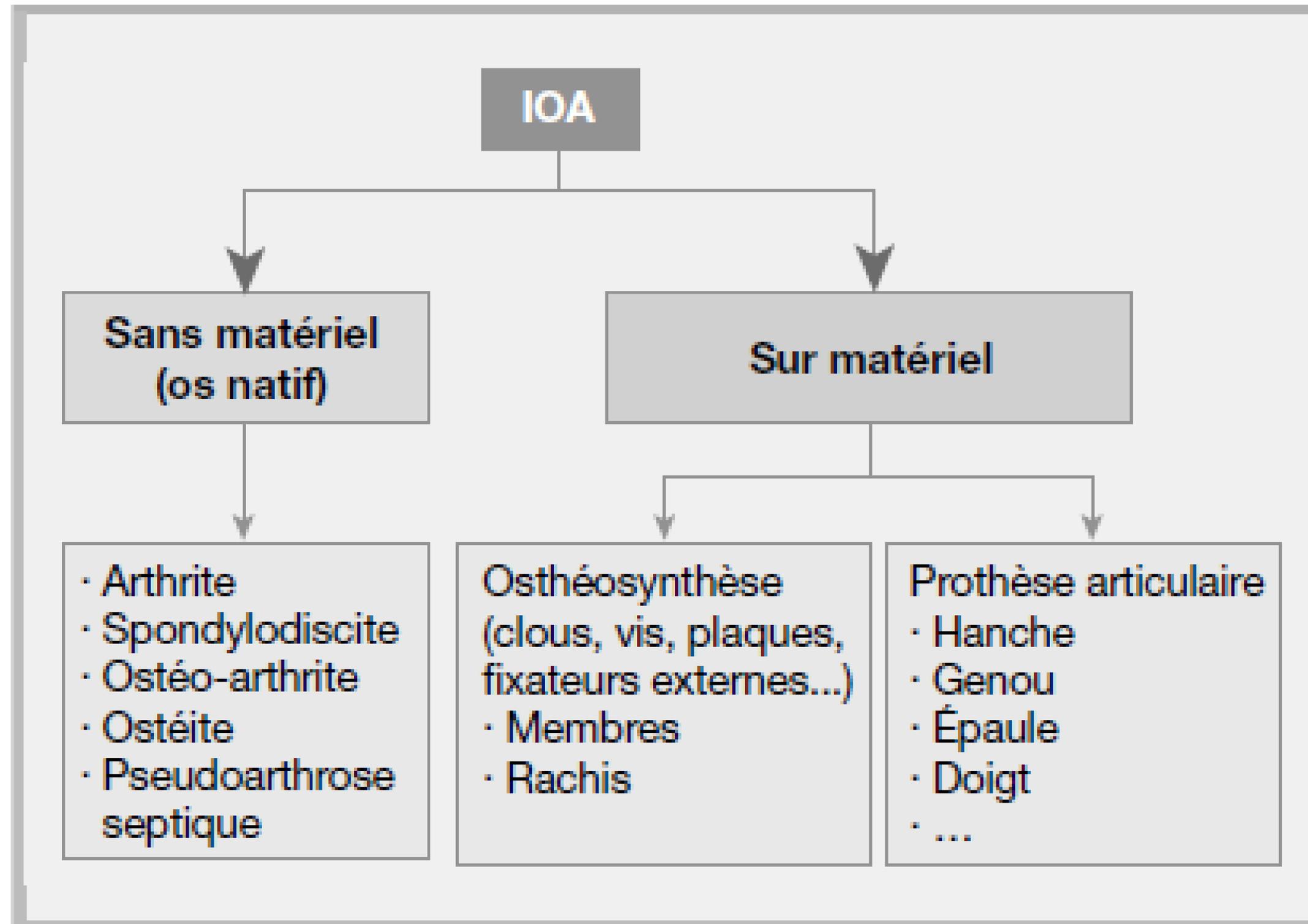
[chloe.plouzeau-jayle@chu-poitiers.fr](mailto:chloe.plouzeau-jayle@chu-poitiers.fr)

Laboratoire de Bactériologie CHU de Tours

Groupe Microbiologie du CRIOGO

[l.chaufour@chu-tours.fr](mailto:l.chaufour@chu-tours.fr)

# Classification selon la présence de matériel



Épidémiologie microbienne dépend du site, du mode de contamination, de la présence de matériel

## Bactéries isolées dans les arthrites aiguës

Mode de contamination	Bactéries les plus fréquemment retrouvées
Hématogène	<i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus sp</i> Entérobactéries, <i>P. aeruginosa</i> <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Kingella kingae</i>
Inoculation directe	<u>Après infiltration, arthroscopie</u> : <i>S. aureus</i> , SCN  <u>Morsure animale</u> : <i>Pasteurella</i> , <i>Capnocytophaga</i>  <u>Morsure humaine</u> : <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i>

Épidémiologie microbienne dépend du site, du mode de contamination, de la présence de matériel

## Bactéries isolées dans les spondylodiscites

Mode de contamination	Bactéries les plus fréquemment retrouvées
Hématogène	<i>S. aureus</i> , streptocoques, entérobactéries Mal de Pott du à <i>M. tuberculosis</i>

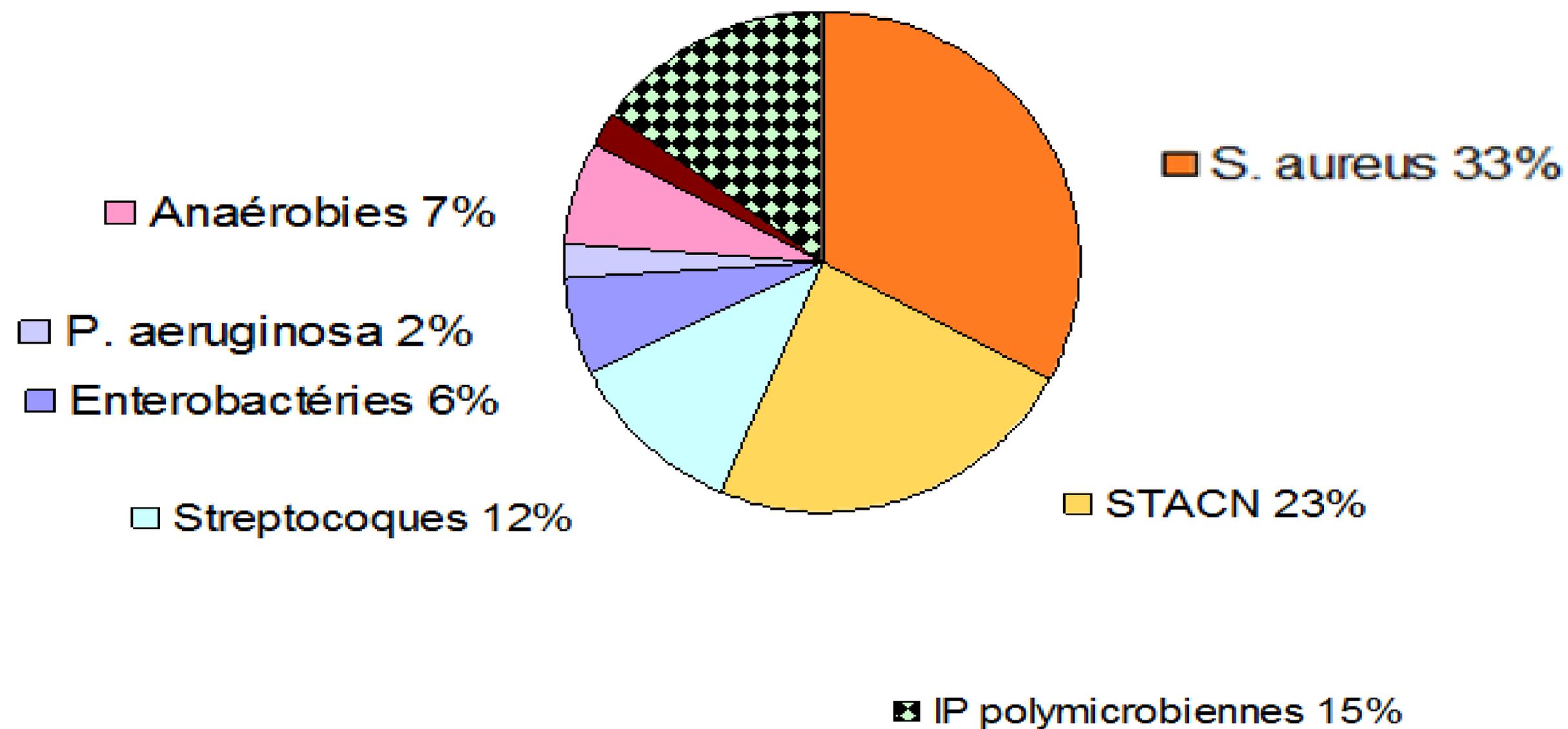
Épidémiologie microbienne dépend du site, du mode de contamination, de la présence de matériel

## Bactéries isolées dans les IOA sur matériel

Mode de contamination	Bactéries les plus fréquemment retrouvées
Hématogène	<i>S. aureus</i> <i>Streptococcus sp</i> Entérobactéries
Contamination directe au foyer de fracture	<i>S. aureus</i> , entérobactéries, <i>P. aeruginosa</i> <i>Bacillus spp</i> , <i>Clostridium spp</i>
Contamination per opératoire ou post op	<i>S. aureus</i> , SCN <i>Cutibacterium acnes</i>

## *IOA sur prothèses ostéo articulaires*

PHRC MICROBIOS, Bémer et al, CM 2014



# Le diagnostic microbiologique

## Les prélèvements



**Cytologie des liquides articulaires**

**Examen direct Gram**

**Prétraitement des échantillons ostéoarticulaires : broyage**

Marqueurs synoviaux de l'inflammation

## Cultures

**Interprétation des résultats microbiologiques?**

**Quand réévaluer un traitement probabiliste?**



10 à 14 jours

7 jours

Biologie moléculaire

Recherches de germes atypiques

# Les prélèvements

**Prélèvements à proscrire :** Ecouvillonnages  
de cicatrice désunie  
d'une fistule

*Mackowiak, JAMA 1978;*

*Cune, Clin Orthop relat Res 2009*

*Tetreault, J Arthroplasty 2013*

**Prélèvements controversés :** Liquides de redon plus recommandé

**Prélèvements à privilégier**

- Liquide articulaire (Culture, cytologie, Gram)

**Pot stérile** obligatoire pour l'ensemencement

**L'ensemencement direct en flacon d'hémoculture** est recommandé

EDTA ou héparine pour faciliter la cytologie

Citrate si demande de cristaux



## ○ Prélèvements per-opératoires

Arrêt des antibiotiques au moins 15J

Très peu de bactéries dans les IOA chroniques et implication fréquente des bactéries cutanées



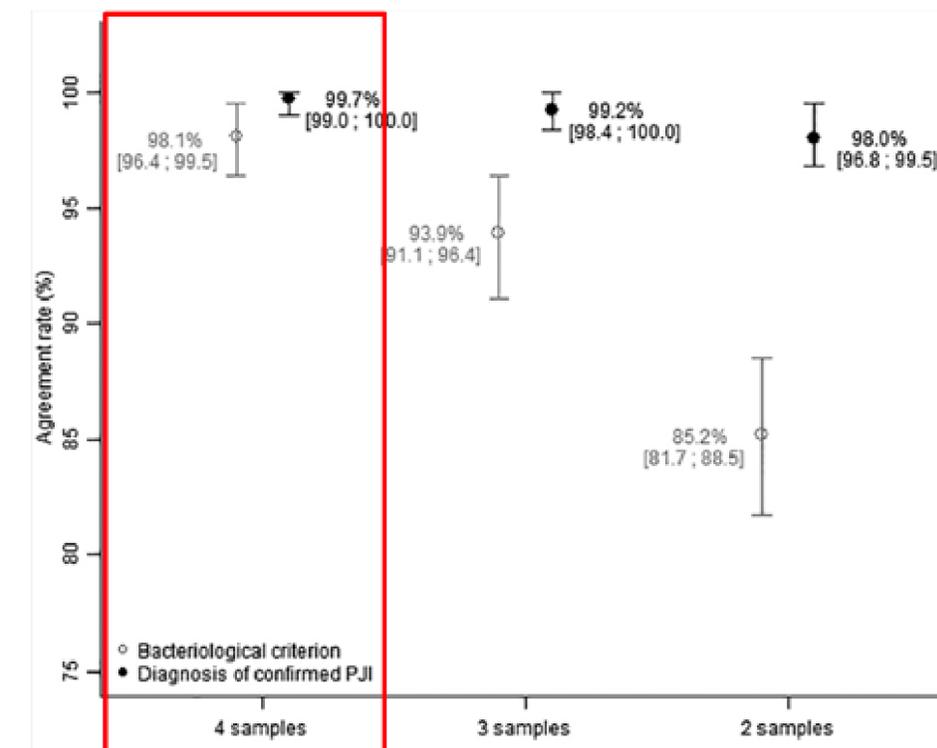
**Pour les IOA sur matériel : l'antibioprophylaxie au bloc ne négative pas les prélèvements !**

**Recommandations actuelles 4-5 prélèvements :** (SPILF 2009, REMIC 2018)

- Biopsies de la membrane d'interface > capsule articulaire ou LA (*Bjerkkan et al, 2012*)
- Prélèvements au contact du matériel et des LA > prélèvements osseux (*CRIOGO (Bémer et al, 2016)*)
- Biopsies synoviales, sous-aponévrotiques et capsulaires en fonction de l'aspect peropératoire

Envoi d'un prélèvement pour l'anapath

- Quantification précise du nombre de PNN
- Orientation vers Mycobactéries, champignons



## Prélèvements d'une ostéite

Escarre, mal perforant plantaire...

- Au bloc ou dans certains centres en consultation
- Ne pas passer par la plaie, prélèvement transcutané en passant en peau saine pour éviter les contaminants
- Pas d'écouvillon !
- Arrêt des antibiotiques depuis au moins 15j



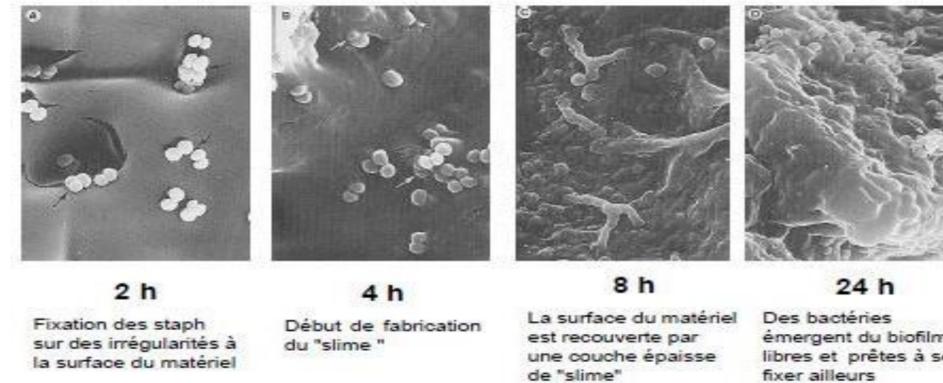
E Seneville



# Prétraitement des échantillons ostéoarticulaires

Le **Biofilm** protège les bactéries  
des défenses naturelles et des antibiotiques

Etapes de la colonisation du matériel  
par *S. epidermidis*



## Broyage des échantillons solides os et tissus mous



Roux CMI 2010  
Bemer JCM 2014

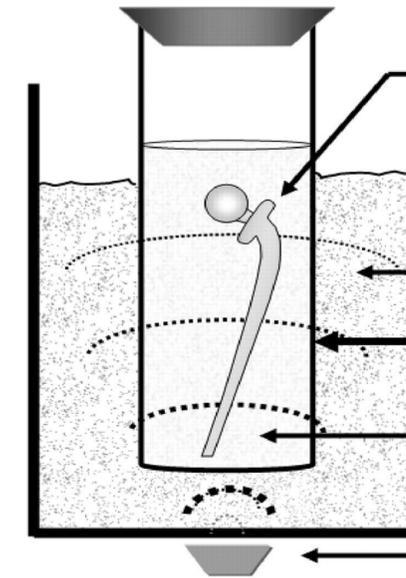
Libérer les germes de la matrice osseuse ou du biofilm et augmente la sensibilité de la culture

Environ 10 ml de liquide

Garder du prélèvement congelé pour des analyses complémentaires (BM)

Ensemencement d'hémoculture à partir du broyat

## Sonication de l'implant



Tor Monsen et al. J. Clin. Microbiol. 2009;47:2496-2501

Mise en culture du liquide de sonication

Difficile à mettre œuvre

# Examen direct et cytologique

## ED: coloration de Gram

Pour les prélèvements per-opératoires le Gram n'est pas utile  
Sensibilité 6%, spécificité 99%



## Cytologie des liquides articulaires

Arthrite septique  $>10\ 000$  leucocytes/mm<sup>3</sup>, 90% PNN

Infection prothèse  **$>1\ 700$  leucocytes ;  $>65\%$  PNN**

(Trampuz, *Am J Med* 2004)

Souvent impossible en peropératoire (liquide très hémorragique) : intérêt du tube hépariné ou EDTA

# Cultures

Incubation prolongée des milieux de cultures

Plusieurs milieux de cultures riches gardés 7 jours

Un milieu liquide d'enrichissement gardé 10 à 14 jours (tube ou Flacon Hc)



Utilisation des flacons d'Hémocultures à partir du broyat : (*Bemer JCM 2016*)

Pour les IOA sur prothèses :

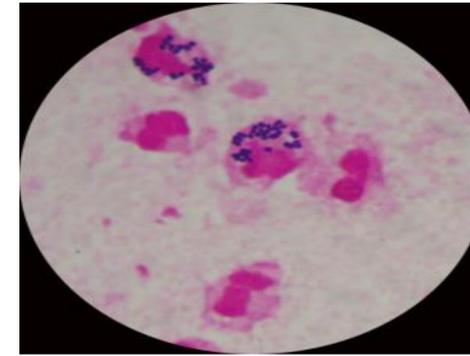
- Permet d'augmenter la sensibilité de la culture
- Utiliser des flacons anaérobies qui permettent la pousse de *C. acnes*

Pour les infections aiguës => diagnostic microbiologique « facile »

### Examen Direct et cyto contributifs

nombreux PNN (+/- altérés)

bactéries au Gram



### Cultures : rapides et homogènes

positives rapidement (24 heures)

colonies monomorphes



### Germes : pathogènes reconnus

*Staphylococcus aureus*, Streptocoques  $\beta$ -hémolytiques ,

Strepto du groupe «milleri»,

Entérobactérie (Campylobacter, Listeria ou Pneumocoque)

### Hémocultures souvent positives

## Pour les infections chroniques ou sur matériel

### Examen direct et cytologie des biopsies peu contributifs (inutile)

Absence ou rares polynucléaires et ED négatif

### Culture lente

Rarement positive avant 48 h, parfois > 4 jours voire plus (*C. acnes*)

### Faible nombre de colonies

### Aspects polymorphes des cultures

Infections plurimicrobiennes (10–20 % des IOA sur matériel)

Même germe, plusieurs aspects de colonies

parfois avec des antibiogrammes différents

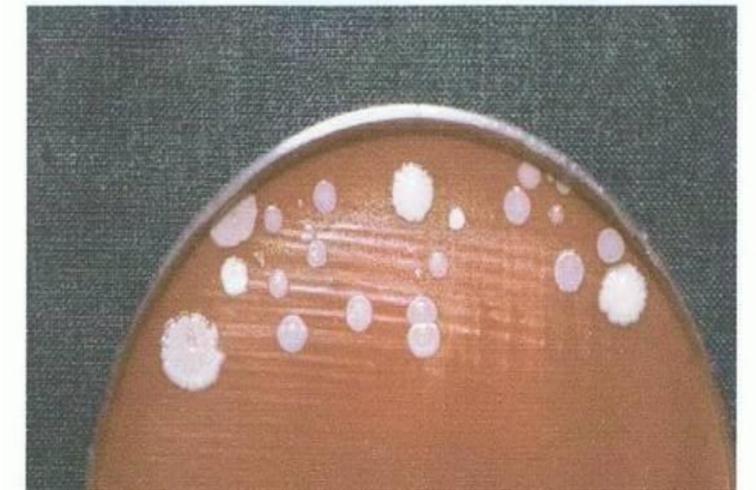
### Small colony variant (colonies naines)

- métabolisme ralenti : apparaissent tardivement
- parfois plus résistantes



132

N. Desplaces / Revue du Rh.



**Observation des cultures par du personnel formé**

**Incubation longue, revoir >J5 même les positifs**

**Identifications et ATB sur chaque aspect de colonie différent**

**Conservation de toutes les souches**

# Interprétation des résultats microbiologiques

## IOA sur prothèse interprétation des cultures : recommandations d'experts : SPILF 2009

### Infection certaine :

**Au moins 1 prélèvement positif / germe « virulent »** *Entérobactéries, Pseudomonas, Staphylococcus aureus, Pneumocoque, Listeria, Salmonelle, Campylobacter, Pasteurella....*

**Au moins 3 prélèvements / germe « avirulent » = flore cutanée** (même antibiogramme) *SCN, Corynebactérie, Cutibacterium acnes...*

### Infection probablement exclue

En absence de signe histologique ou clinique et en dehors d'une antibiothérapie récente

**Tous les prélèvements stériles**

**ou 1 seul prélèvement positif à un germe « avirulent »**

*Nouvelles recommandations en cours*

# IOA sur prothèse : Nouveaux scores diagnostics

Microbio:

Deux  
prélèvements  
positifs  
= critère majeur

Critères majeurs (au moins un critère)		Décision
2 prélèvements positifs en culture (même agent pathogène)		<b>Infection certaine</b>
Fistule avec communication avec la prothèse		

Diagnostic préopératoire	Critères mineurs		Score	Décision
	Sérum	CRP > 10 mg/L ou D-dimères > 860 ng/mL	2	<b>≥ 6 infection certaine</b> <b>2-5 infection possible</b> <b>0-1 infection exclue</b>
		VS > 30 mm/h	1	
	Synovial	Compte cellulaire avec > 3000 globules blancs/mL	3	
		Alpha-défensine élevée ou test positif	3	
		Pourcentage de polynucléaires neutrophiles > 80%	2	
CRP > 6,9 mg/L		1		

Liquide articulaire  
Importance de la cyto  
et/ou  
des marqueurs synoviaux  
de l'inflammation

Un seul  
prélèvement  
positif  
= critère mineur

Diagnostic intraopératoire	Si le score préopératoire n'est pas concluant		Score	Décision
	Score préopératoire		-	<b>≥ 6 infection certaine</b>
	Histologie en faveur d'une infection		3	
	Aspect peropératoire macroscopique en faveur d'une infection avec purulence		3	<b>4-5 infection possible</b> <b>≤3 infection exclue</b>
	Une seule culture positive		2	

# Infections sur prothèse : à quel moment réévaluer le traitement probabiliste en fonction des résultats microbiologiques?

Cultures longues (14j) et qui peuvent être plurimicrobiennes

Pas de reco pour la durée du traitement probabiliste, ni à quel moment adapter en fonction des résultats

Réadapter plus rapidement le traitement probabiliste

- Limite les effets indésirables
- Limite l'utilisation d'antibiotique large spectre (Tazo ou C3G+ linezolide ou Dapto)



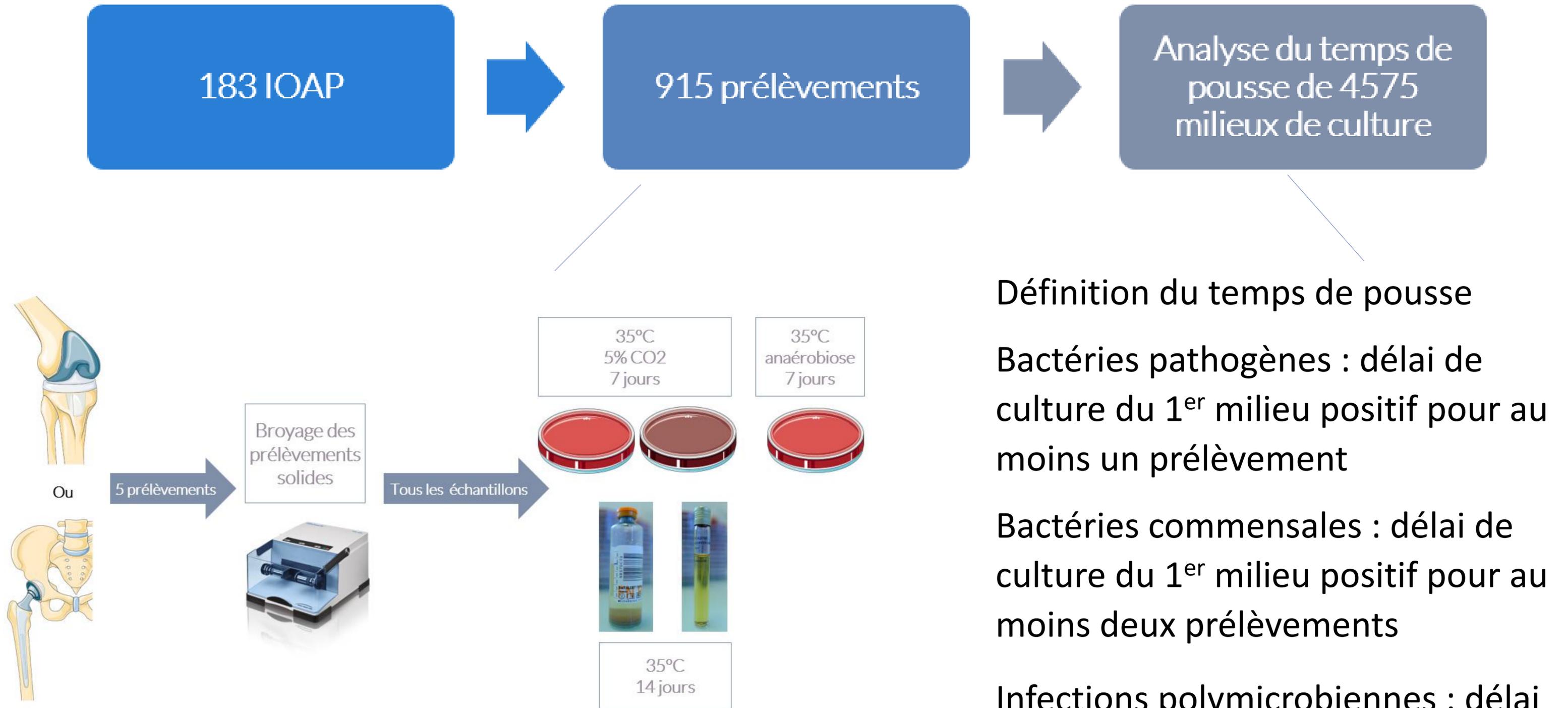
Article

## The Right Time to Safely Re-Evaluate Empirical Antimicrobial Treatment of Hip or Knee Prosthetic Joint Infections

Luc Deroche <sup>1,\*</sup>, Pascale Bémer <sup>2</sup>, Anne-Sophie Valentin <sup>3</sup>, Anne Jolivet-Gougeon <sup>4</sup>,  
Didier Tandé <sup>5</sup>, Geneviève Héry-Arnaud <sup>5</sup>, Carole Lemarié <sup>6</sup>, Marie Kempf <sup>6</sup>, Laurent Bret <sup>7</sup>,  
Christophe Burucoa <sup>1</sup>, Stéphane Corvec <sup>2</sup> and Chloé Plouzeau <sup>1</sup>

Objectif : déterminer le meilleur moment pour adapter le traitement probabiliste en analysant les données de culture d'une grande série d'IOAP (PHRC Microbios : prospectif multicentrique 6 CHU de CRIOGIO)

# Méthodes

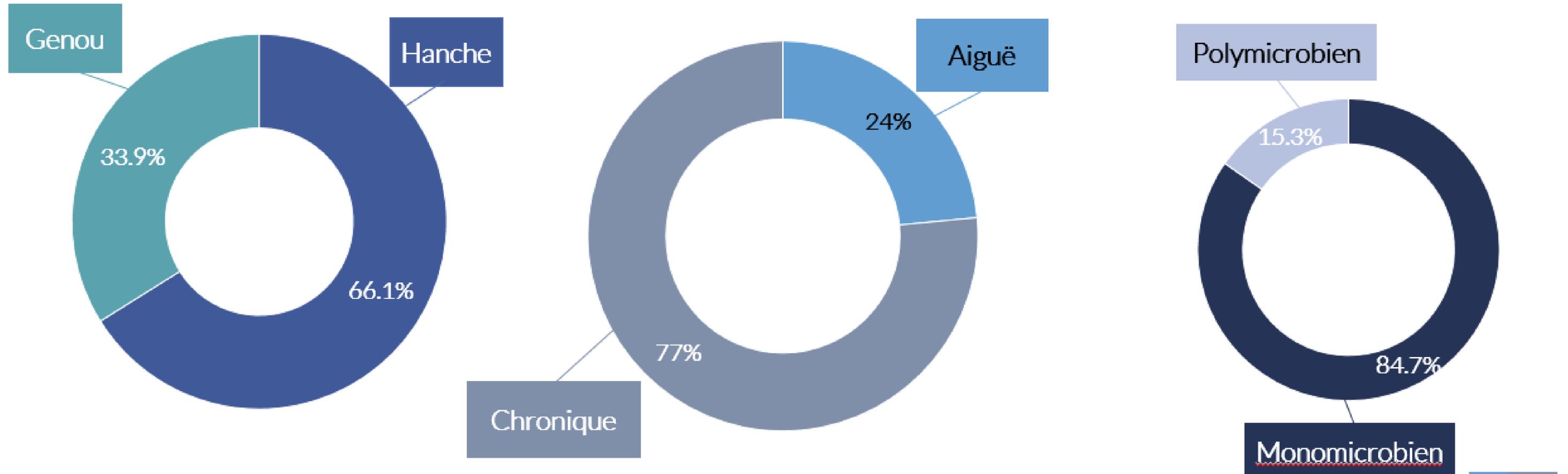


Définition du temps de pousse  
Bactéries pathogènes : délai de culture du 1<sup>er</sup> milieu positif pour au moins un prélèvement

Bactéries commensales : délai de culture du 1<sup>er</sup> milieu positif pour au moins deux prélèvements

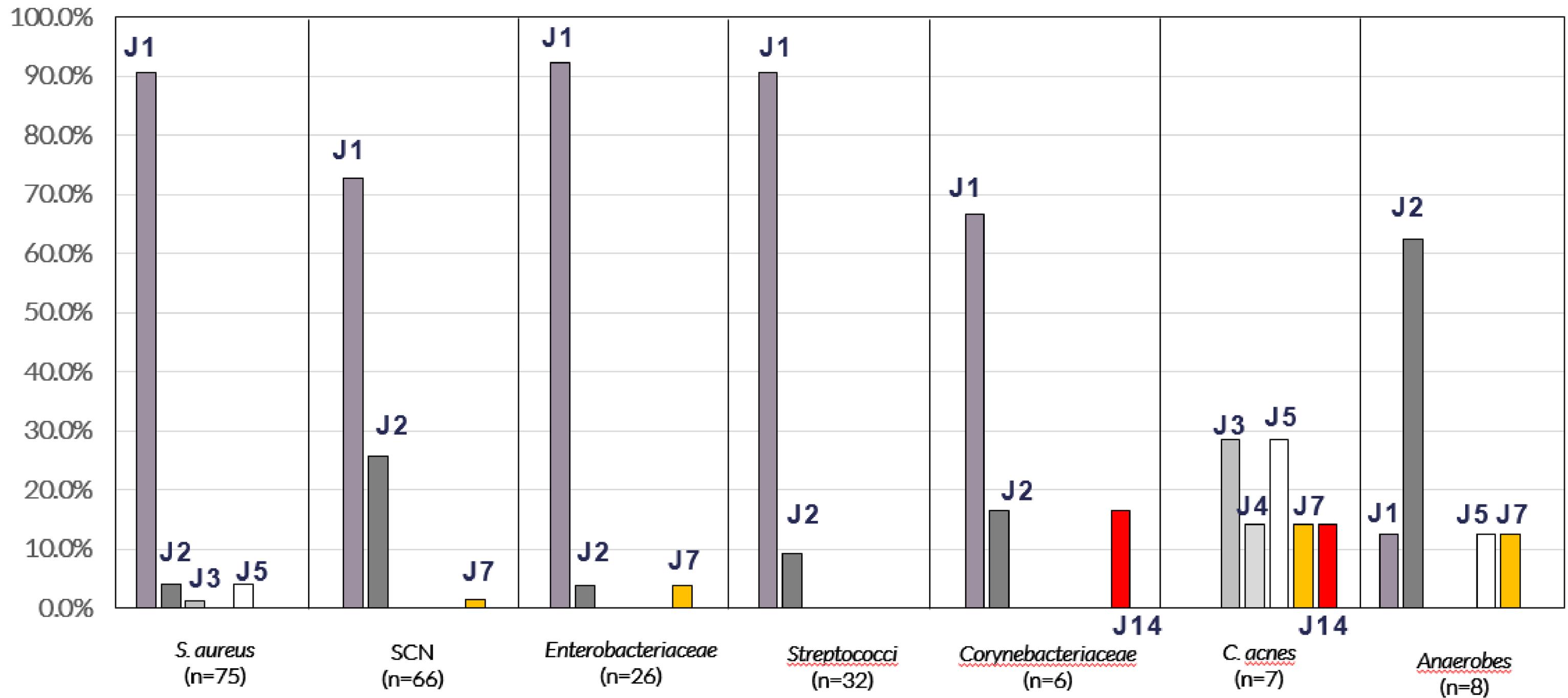
Infections polymicrobiennes : délai de culture de la dernière bactérie identifiée

# Résultats



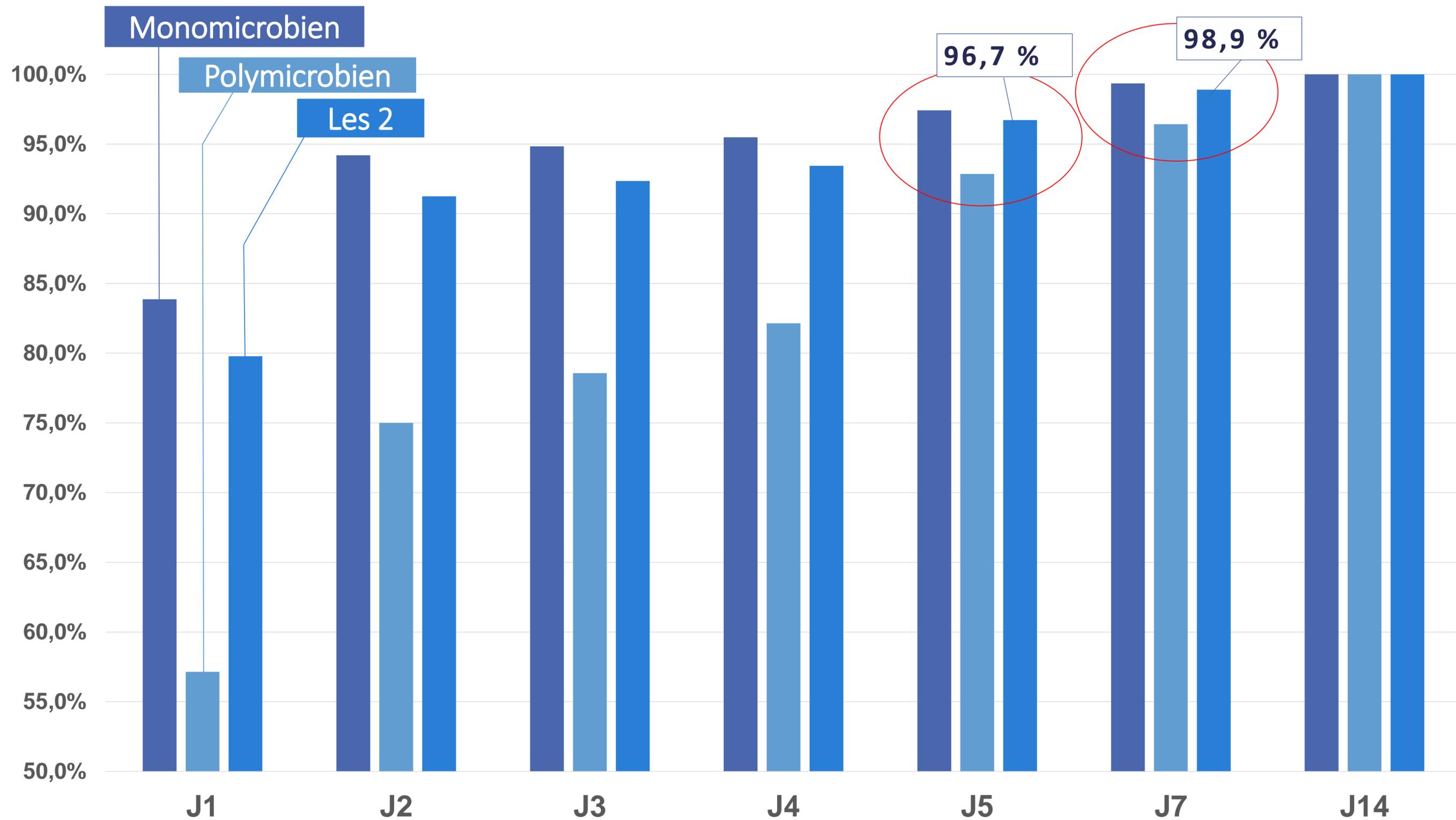
(Deroche Journal of Clinical medicine 2019)

# Résultats par types de bactéries (incluant les infections plurimicrobiennes)



# Résultats par patients (5 prélèvements en culture)

## Nombre d'infections diagnostiquées, en fonction du jour de culture



(Deroche Journal of Clinical medicine 2019)

## Diagnotics microbiologiques après J5?

Environ 2% dans cette série IOA sur Prothèse  
(Culture optimisée : broyage/ flacon d'Hc)

Bactéries	Jour du diagnostic	Prothèse	Prise d'ATB dans les 15j précédents ?
<i>C. acnes</i>	J14	PTG	Non
<i>C. acnes</i>	J7	PTG	Non
<i>Corynebacterium</i>	J14	PTH	Oui
<i>E. cloacae</i>	J7	PTG	Non
<i>Prevotella sp.</i>	J7	PTH	Oui
<i>S. epidermidis</i>	J7	PTH	Oui

**Dont la moitié  
Arrêt tardif ou pas  
d'arrêt des ATB**

(Deroche Journal of Clinical medicine 2019)

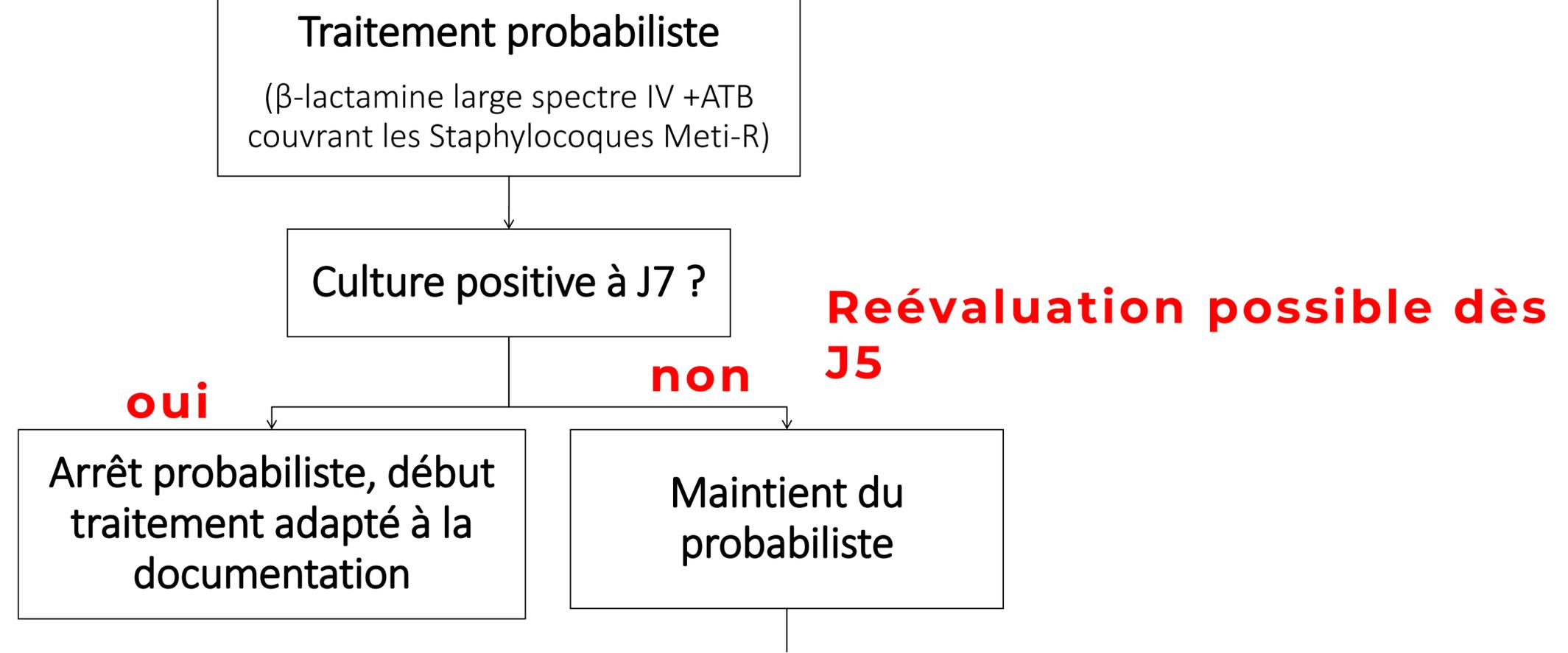
## Traitement probabiliste

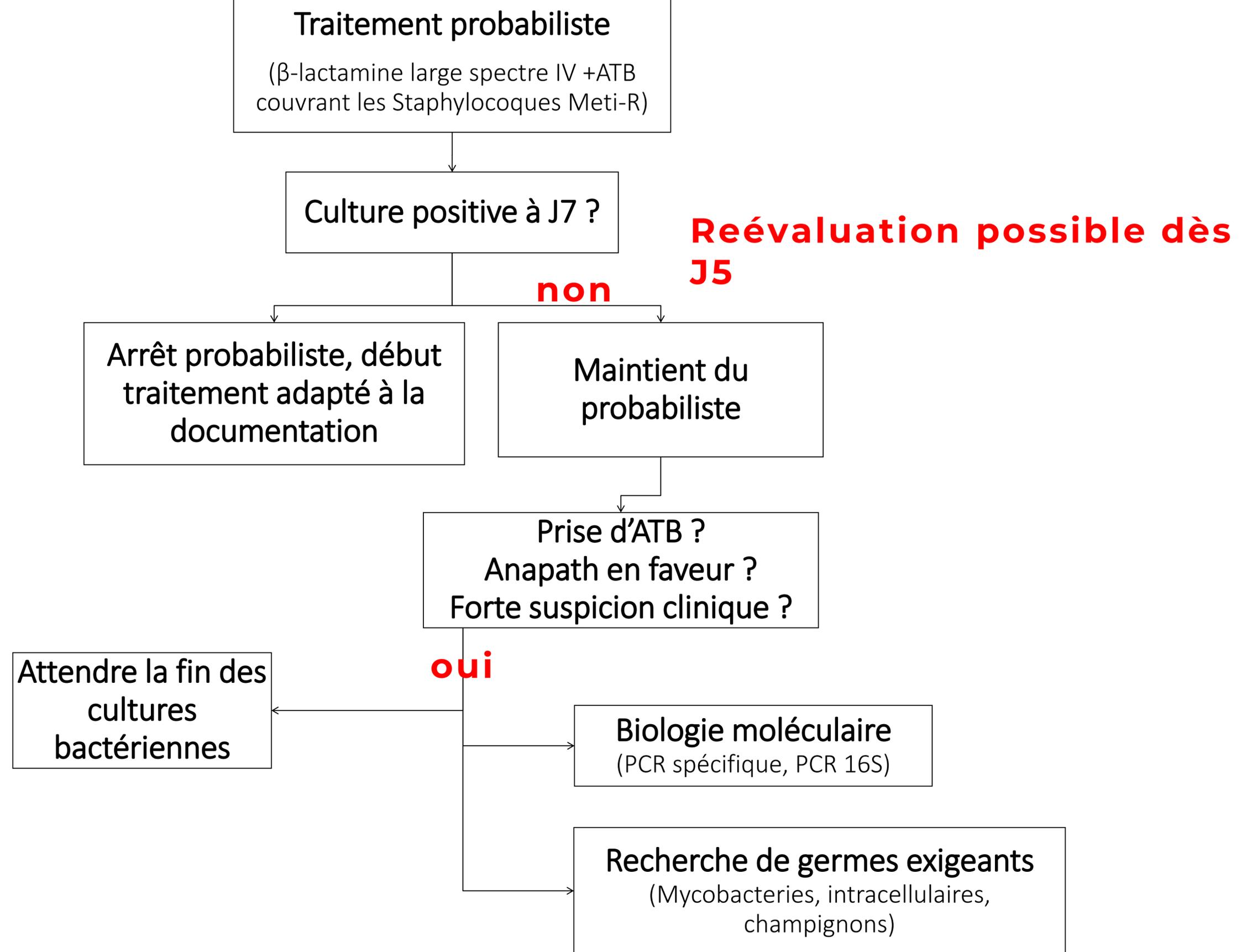
( $\beta$ -lactamine large spectre IV +ATB  
couvrant les Staphylocoques Meti-R)

Culture positive à J7 ?

**Reévaluation possible dès  
J5**

**Germe pathogène  
ou deux  
prélèvements avec  
un germe cutané  
(même  
ATBgramme)**





# Apport de la biologie moléculaire

10 à 25% des IOA restent stériles selon les études

ATTENTION La bio mol n'est souvent pas plus plus sensible que la culture pour les infections à germes classiques

1) Pour la rapidité pour adaptater le tmt probabiliste post op pour les IOA sur matériel

PCR *S. aureus*+ *mecA* : arrêt précoce de la dapto ou du linezolid

Titecat DMID 2012

Valour DMID 2014

2) En seconde ligne quand les techniques de bactério classiques sont en échec

PCR . *S. aureus*, Staph, *mecA*

PCR universelle ARNr 16S

*sensibilité < culture*

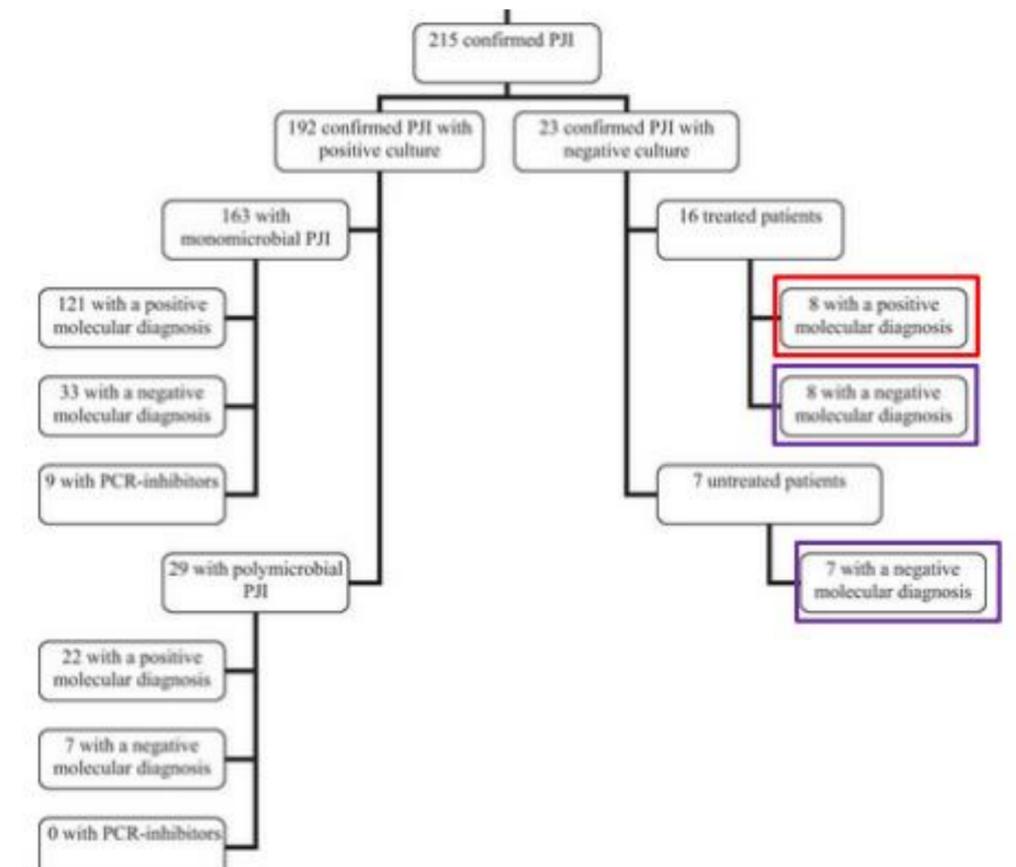


## Evaluation of 16S rRNA Gene PCR Sensitivity and Specificity for Diagnosis of Prosthetic Joint Infection: a Prospective Multicenter Cross-Sectional Study

Pascale Bémer,<sup>a</sup> Chloé Plouzeau,<sup>b</sup> Didier Tande,<sup>c</sup> Julie Léger,<sup>d</sup> Bruno Giraudeau,<sup>a</sup> Anne Sophie Valentin,<sup>e</sup> Anne Jolivet-Gougeon,<sup>f</sup> Pascal Vincent,<sup>g</sup> Stéphane Corvec,<sup>h</sup> Sophie Gibaud,<sup>h</sup> Marie Emmanuelle Juvin,<sup>h</sup> Genevieve Héry-Arnaud,<sup>c</sup> Carole Lemarié,<sup>h</sup> Marie Kempf,<sup>g</sup> Laurent Bret,<sup>h</sup> Roland Quentin,<sup>h</sup> Carine Coffre,<sup>g</sup> Gonzague de Pinieux,<sup>i</sup> Louis Bernard,<sup>j</sup> Christophe Burucoa,<sup>h</sup> the Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest (CRIOGO) Study Team  
CHU Nantes, Laboratoire de Bactériologie, Nantes, France<sup>a</sup>; CHU Poitiers, Laboratoire de Bactériologie, Poitiers, France<sup>b</sup>; CHU Brest, Laboratoire de Bactériologie, Brest, France<sup>c</sup>; INSERM, CIC 1415, Tours, France<sup>d</sup>; CHU Tours, Laboratoire de Bactériologie, Tours, France<sup>e</sup>; CHU Rennes, Laboratoire de Bactériologie, Rennes, France<sup>f</sup>; CHU Angers, Angers, France<sup>g</sup>; CHU Orléans, Laboratoire de Bactériologie, Orléans, France<sup>h</sup>; CHU Tours, Laboratoire d'Anatomo-Pathologie, Tours, France<sup>i</sup>; CHU Tours, Service des Maladies Infectieuses, Tours, France<sup>j</sup>

23 infections non documentées (10%) sur 215 infections sur prothèse suspectées.

- 16 patients sous ATB 2 semaines avant la chirurgie
- Les germes retrouvés :
  - *Staphylococcus aureus*
  - *Listeria monocytogenes*
  - *Acinetobacter johnsonii*
  - *Corynebacterium lipophiloflavum*
  - *Cutibacterium acnes*



Bémer JCM 2016

Plouzeau JCM 2015

# Apport de la biologie moléculaire



En développement grâce au NGS (New generation sequencing) :

## **Métagénomique :**

Séquençage de l'ensemble de l'ADN présent dans un échantillon

Mise en évidence tout type de germe et leurs gènes de résistance

Evaluation en cours

Limites Coût++ et la nécessité d'une analyse bio-informatique lourde

## Ne pas oublier la recherches de germes atypiques

En seconde ligne, selon le terrain et si les cultures classiques sont négative :

**BK** culture prolongée, PCR BK et R rifampicine

**Mycobactéries atypiques** culture prolongée

**Brucella** : Sérologie + hémocultures prolongées

**Bartonella henselae** : Sérologie + PCR ciblée

**Tropheryma Whipplei** : PCR ciblée ou PCR 16s

Chez l'enfant

**Kingella kingae** : PCR présente une meilleure sensibilité que la culture (germe très fragile)

# Marqueurs synoviaux de l'inflammation

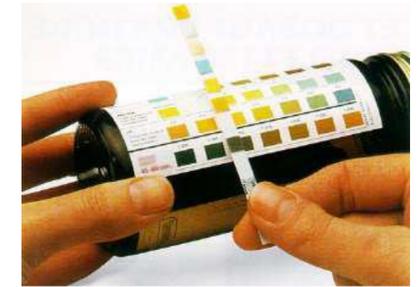
Critères mineurs utiles pour classer des cas difficiles (pb mécanique/infections/ métallose?)

Sur une ponction pré-opératoire ou sur une ponction per-opératoire pour une reprise de prothèse

**Leucocyte estérase** : bandelette urinaire

Simple faible coût mais inefficace si présence de trace de sang

VPN faible/ faible spécificité



**CRP synoviale** (critère mineure score =1)

Facilement adaptable au labo de Biochimie (nécessité de prétraiter le liquide articulaire pour le fluidifier)

**Alpha défensine** (critère mineure score =3)

Plus sensible et spécifique

Interaction avec la métallose

Test unitaire très cher (300 euros)/ test en série au laboratoire



**Calponectine**

Bonne VPN dans les premiers tests

**Proposition de sores combinés : CRP/ Calponectine ou CRP/ $\alpha$ -Défensine**

## Diagnostic microbiologique des IOA : en résumé...

Diagnostic difficile en particulier infections chroniques sur matériel

Prélèvements profonds multiples (3 à 5) avec des pinces différentes pour chaque

Arrêt des antibiotiques d'au moins 14j si possible

Prise en charge par un laboratoire compétent : broyage , incubation prolongée, flacons d'Hemoc

Culture longue et complexe : patience/ attention à l'interprétation des résultats partiels

Infection sur matériel : bien connaître les pratiques de votre laboratoire pour décider quand réévaluer le traitement probabiliste

Biologie moléculaire : à discuter au cas par cas avec les biologistes

Utile ++ pour les patients sous ATB ou arrêt tardif

pour chercher les germes atypiques : terrain, importance de l'interrogatoire

Marqueurs synoviaux de l'inflammation sont en cours d'évaluation :  $\alpha$  defensine ++ , leucocyte esterase , CRP

Cas complexes : présentation en RCP d'un CRIOAC discussion pluridisciplinaire