

Pr Anne Jolivet-Gougeon
CHU Rennes
Les microbiologistes du CRIOGO

Prélèvements ostéoarticulaires



Définition de l'infection osseuse?

Variable....

Études	Définition de l'infection
Eveillard et al. 2001	Infections profondes. Bactéries isolées d'un prélèvement profond au cours d'une reprise justifiée par une suspicion d'infection
Lecuire et al. 2003	Critères cliniques et biologiques des CDC. Absence de critère microbiologique supplémentaire
Merrer et al. 2007	Infections profondes et superficielles
Debarge et al. 2007	Isolement de bactéries sur au moins un prélèvement profond réalisé lors d'une ré-intervention pour suspicion d'infection
Dumaine et al. 2007	2 prélèvements profonds positifs + arguments cliniques et biochimiques (CRP)

Principales études françaises (hors RAISIN) sur l'incidence des infections du site opératoires sur prothèses articulaires
http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/spilf/2010_osteo_court.pdf

Définition de l'infection osseuse? Plusieurs pathologies....

- Ostéite
 - Ostéite sur matériel
 - Ostéite sur prothèse
- Ostéomyélite
- Arthrite
 - ostéoarthrite
- Abscès intra-osseux
- Spondylodiscite
- (pied diabétique)

Aucun paramètre biologique n'est **à lui seul** spécifique de l'infection osseuse.

Ex : Suivre la courbe de l'évolution du taux sérique de la C-reactive protéine (CRP) (et non sa valeur absolue)

⇒ reste un critère controversé

Prise en charge des infections ostéoarticulaires = peu de référentiels :

- ❑ IDSA Guidelines déc **2012** jan **2013**
- ❑ Recommandations de pratique clinique *Infections ostéo-articulaires sur matériel* (prothèse, implant, ostéosynthèse) SPILF **2009**
- ❑ Conférence d'expert sur les spondylodiscites infectieuses SPILF **2007**
- ❑ RCP Prise en charge du pied diabétique infecté SPILF **2006**
- ❑ Conférence de consensus sur les infections bactériennes ostéoarticulaires SPILF **1991**

SPLIF

1991

Extrait de

Médecine et Maladies infectieuses

REVUE DE LA SOCIÉTÉ DE PATHOLOGIE INFECTIEUSE DE LANGUE FRANÇAISE

TROISIÈME CONFÉRENCE DE CONSENSUS
EN THÉRAPEUTIQUE ANTI-INFECTIEUSE

LES INFECTIONS BACTÉRIENNES OSTÉO-ARTICULAIRES
en dehors des infections à mycobactéries

25 JANVIER 1991

SOCIÉTÉ DE PATHOLOGIE INFECTIEUSE DE LANGUE FRANÇAISE
(S. P. I. L. F.)

Avec le concours de la Société Française de Chirurgie Orthopédique
et Traumatologique (SOFOT) et de la Société Française
de Microbiologie (SFM, section des agents anti-microbiens)

1991
TOME 20
Janvier
37-44



2009

Recommandations de pratique clinique
Infections ostéo-articulaires sur matériel
(prothèse, implant, ostéosynthèse)

Texte court

Organisées par
la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPLIF)
avec la participation des sociétés savantes et organismes :

Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales (CMIT)
Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique (GPIP)
Société Française d'Anesthésie et de Réanimation (SFAR)
Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (SOFOT)
Société Française d'Hygiène Hospitalière (SFHH)
Société Française de Médecine Nucléaire (SFMN)
Société Française de Médecine Physique et de Réadaptation (SOFMER)
Société Française de Microbiologie (SFM)
Société Française de Radiologie (SFR-Rad)
Société Française de Rhumatologie (SFR-Rhu)

2012

Clinical Infectious Diseases Advance Access published December 6, 2012

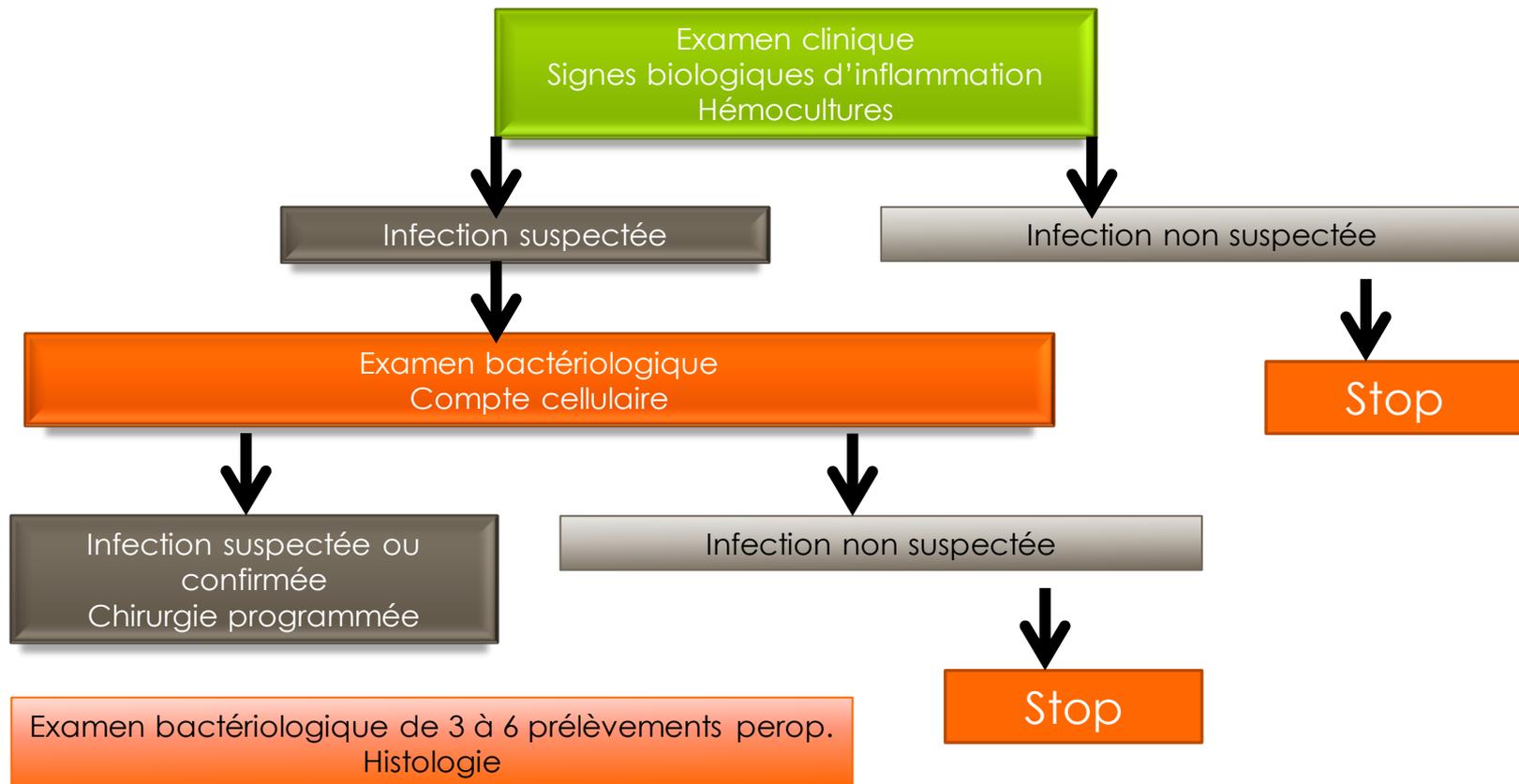
IDSA GUIDELINES

Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America^a

Douglas R. Osmon,¹ Elie F. Berbari,¹ Anthony R. Berendt,² Daniel Lew,³ Werner Zimmerli,⁴ James M. Steckelberg,¹ Nalini Rao,^{5,6} Arlen Hanssen,⁷ and Walter R. Wilson¹

¹Division of Infectious Diseases, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, Minnesota; ²Bone Infection Unit, Nuffield Orthopaedic Centre, Oxford University Hospitals NHS Trust, United Kingdom; ³Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, University of Geneva Hospitals, ⁴Basel University Medical Clinic, Liestal, Switzerland; ⁵Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, and ⁶Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh School of Medicine, Pennsylvania, and ⁷Department of Orthopedics, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, Minnesota

Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA)



Diagnostic Bactériologique

1. Prélèvement(s)

2. Examen direct

3. Cultures

- Isolement de la bactérie sur milieux de culture
- Identification :
 - ❑ Phénotypique (morphologie, caractères biochimiques et antigéniques...), spectrométrie de masse...)
 - ❑ Moléculaire
- Antibiogramme(s) (si nécessaire)

(et)

3. Détection moléculaire

4. Histologie

5. Sérologie

Les prélèvements

Les prélèvements

Décrire la procédure technique pour :

- les prélèvements chirurgicaux : prélèvements osseux (biopsies osseuses, fragments d'os...), produits d'alésage, matériel, ciment...)
- les liquides articulaires

Les prélèvements

- Délai minimal de 15 jours par rapport à toute antibiothérapie
- Faire des prélèvements d'origine osseuse **étagés** (idéalement au nombre de **5***), réalisés au bloc opératoire, sous champ opératoire.
- Les **liquides articulaires** sont ponctionnés en radiologie ou dans un service médico-chirurgical.
- Acheminement souhaitable < 4h (SPILF 1991)

*IDSA 2013 : au moins 3 et de préférence 5 à 6

Les prélèvements



Prélèvements pré-opératoires (1)

- Il est fortement recommandé de ne pas prélever avec un écouvillon sur la cicatrice, même si celle-ci est désunie.
- En présence d'une fistule, il n'est pas recommandé d'effectuer de prélèvement à partir de son orifice.

Les prélèvements

Prélèvements pré-opératoires (2)

- En cas d'épanchement intra-articulaire ou d'abcès au contact du matériel ostéo-articulaire, il est recommandé d'effectuer une **ponction**, éventuellement **radioguidée** (en respectant les conditions d'asepsie chirurgicale).

Il est conseillé :

- de conserver le liquide prélevé dans la seringue qui a servi au prélèvement dans un tube stérile
- d'inoculer des flacons d'hémocultures pour aérobies et anaérobies si le délai d'acheminement est supérieur à 2 heures,
- une partie du liquide doit être recueillie dans un tube hépariné pour l'examen direct : cytologie et colorations.

Les prélèvements

Prélèvements opératoires

- La préparation du champ opératoire doit respecter les quatre temps de l'antisepsie cutanée
- Les règles de tenue vestimentaire sont maintenant bien codifiées et doivent être respectées de façon scrupuleuse

Les prélèvements

- Les règles de comportement du personnel font appel au bon sens et visent à limiter la circulation de l'air :
 - limiter le nombre de personnes en salle d'opération,
 - limiter les déplacements,
 - limiter les gestes,
 - pratiquer une désinfection fréquente des mains, détecter les fautes d'asepsie,
 - changer régulièrement de gants
 - **changer d'instrument entre chaque prélèvement...**



Les prélèvements

- Il est recommandé de les effectuer **au début de l'intervention**,
 - en dehors de toute antibiothérapie*
 - et avant toute antibioprophylaxie.
- Il est fortement recommandé de ne **pas** prélever sur **écouvillons**.
- Il est recommandé de réaliser 5 prélèvements au niveau de zones macroscopiquement pathologiques (grade B).

Ces prélèvements peuvent être liquides (pus, liquide articulaire) ou solides (tissus de granulation, tissus osseux, tissu d'interposition et tout tissu paraissant suspect). Matériel possible, si tissus adhérents.

- **La localisation du site** et **la nature de chaque prélèvement** doivent être **renseignées** (sur l'échantillon **ET** le bon de prescription).

*IDSA 2013 : au moins 2 semaines d'arrêt avant les prélèvements

Les prélèvements

Sur le prélèvement :

- Nom/ Prénom /DDN du patient
- Nom du service prescripteur
- La localisation du site et nature de chaque prélèvement

Sur le bon de prescription :

1 bon de prescription par prélèvement

- Nom/ Prénom /DDN du patient,
- Nom du service prescripteur
- Nom et fonction du préleveur/prescripteur
- la date et l'heure du prélèvement
- La localisation du site et nature de chaque prélèvement doivent être renseignées.
- Les informations cliniques :
 - antibiothérapie?
 - antécédents?

Sinon :

Prélèvement non conforme



Les prélèvements Quoi dans quoi?



- Dans un flacon Nalgène (bouteille en **HDPE*** 30 ml stérile)
Os ou fragments d'os, biopsies osseuses, produits d'alésage, tendons... (Liquides articulaires)
- Dans un **tube hépariné** et un tube type Falcon[®], stériles.
Liquide articulaire
- Un délai maximal de 2 heures entre le prélèvement et l'ensemencement est souhaitable. Les prélèvements seront alors conservés à température ambiante.
- Consulter le « **Guide des prélèvements** » propre à chaque ES

*polyéthylène ultrarésistant

Laboratoire organisé pour recevoir ces prélèvements :

- PSM type 2 pour techniquer les prélèvements
- Matériel à usage unique
- Technicien travaillant avec surblouse et gants stériles
- Equipement pour broyer les prélèvements solides
- Etuves suffisamment grandes
- Plateforme pour la Biologie Moléculaire

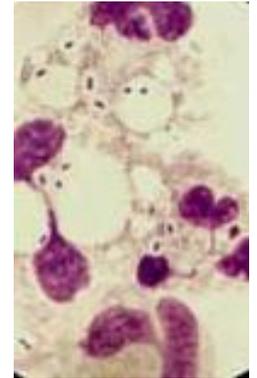
Les prélèvements

Recherches particulières

- Certaines recherches (**Mycobactéries, Chlamydia...etc**) ne seront réalisées que sur **prescription médicale ciblée**.
Pour la recherche de Mycobactéries, les prélèvements pourront être conservés à 4°C.
- Pour enfants < 5 ans,
recherche systématique de **Kingella kingae** sur liquide articulaire par PCR (hors période de garde).

Examen direct

Examen direct



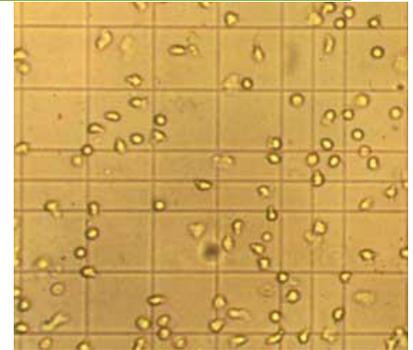
Liquides articulaires et prélèvements osseux:

- o **coloration de Gram** à partir d'une pastille de cytocentrifugation (dès que cela est possible), ou directement sur frottis (si prélèvement visqueux).

La **sensibilité** de l'examen bactériologique direct est faible (< 30%) alors que la **spécificité** est proche de **100 %**.

- Aspect bactérien monomorphe ou polymorphe
- Appréciation semi-quantitative de la présence de polynucléaires (altérés?)

Examen direct



Liquides articulaires :

- o **Numération des éléments** en cellule à usage unique ou sur automate de cytologie.

Ex : Dans un liquide articulaire, plus de 1 700 leucocytes/mm³ (sensibilité de 94 % et spécificité de 88 %) et plus de 65 % de polynucléaires neutrophiles sont très évocateurs d'une infection sur prothèse (IDSA 2012)

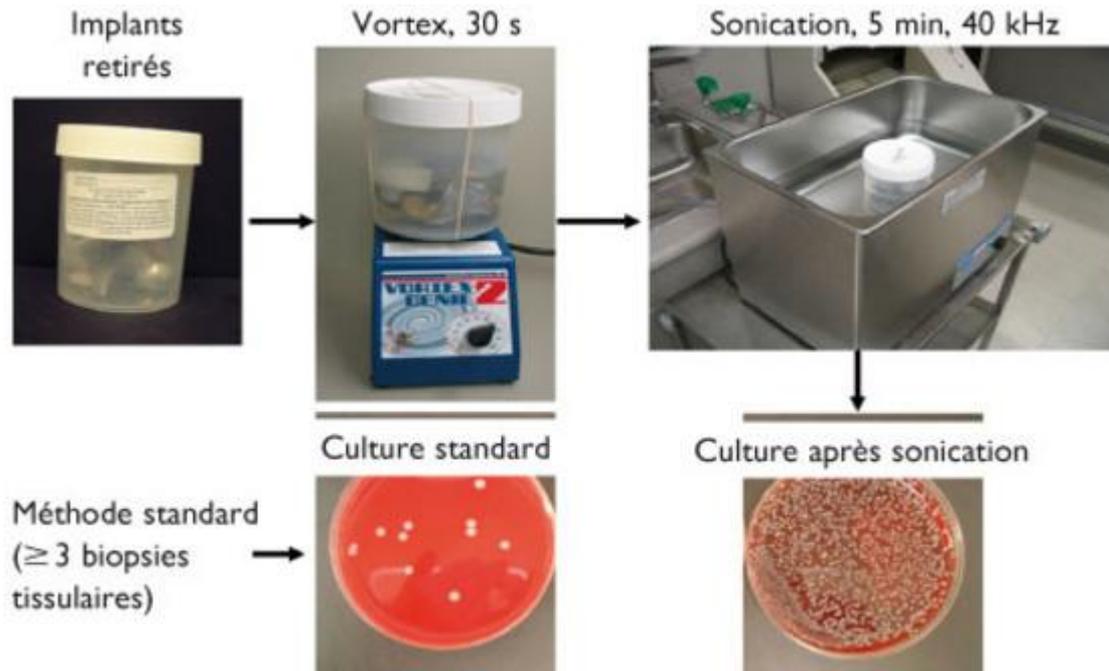
si ≥ 100 éléments/mm³ :

- o **Formule** : à partir d'une pastille de cyto-centrifugation (dès que cela est possible), ou d'un frottis (si prélèvement visqueux) après coloration rapide

> 65% PN

Les prélèvements

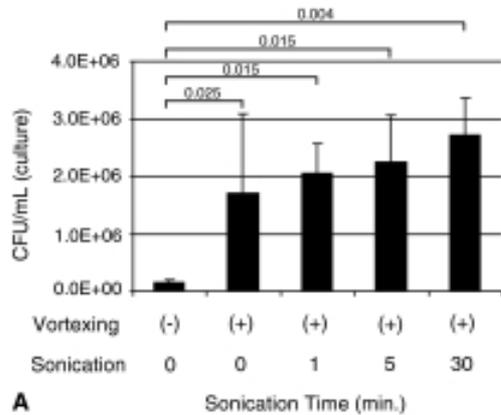
Technique de sonication



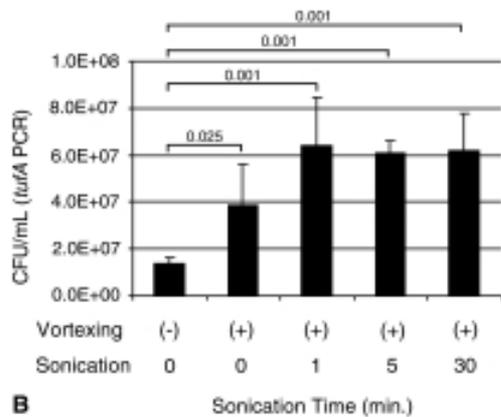
Olivier Borens, François Nussbaumer, Rayan Baalbaki, Andrej Trampuz

Diagnostic et traitement des infections d'implants orthopédiques

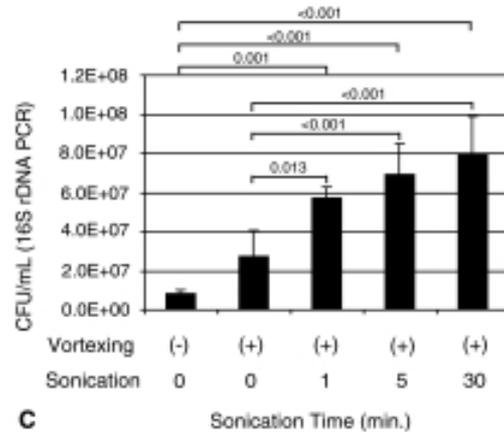
Rev Med Suisse 2009;5:2563-2568



A



B



C

Staphylocoques en biofilm

Hideo Kobayashi MD, PhD, Margret Oethinger MD, PhD, Marion J. Tuohy MT (ASCP), Gary W. Procop MS, MD, Thomas W. Bauer MD, PhD
Improved Detection of Biofilm-formative Bacteria by **Vortexing and Sonication** A Pilot Study
Clin Orthop Relat Res (2009) 467:1360–1364

Les prélèvements

Technique de broyage

Un broyage sera réalisé pour :

- les prélèvements d'os
- (les liquides articulaires)



Les prélèvements technique de broyage

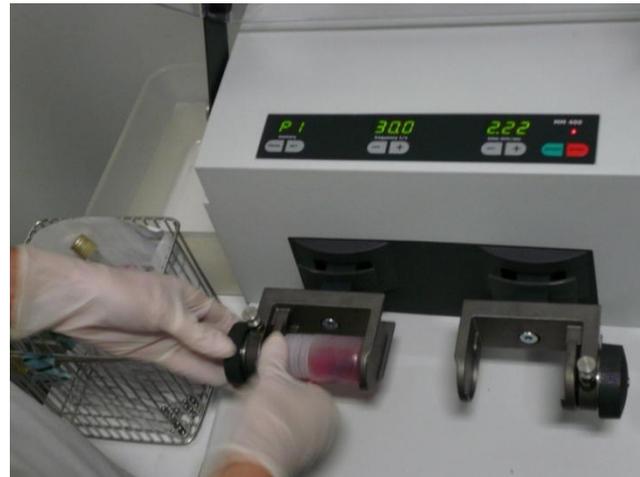
- Dès réception du prélèvement :
- Sous PSM, on ajoute à chaque pot le contenu d'un tube (contenant 10 billes inox dans 10 ml d'eau distillée, qualité biologique moléculaire).



Etiquette
conforme

Les prélèvements technique de broyage

- Chaque pot est vissé dans le Broyeur Retsch MM400



- Mise en route du broyage
- Les différents milieux de culture (liquides et gélosés) sontensemencés avec ce broyat et incubés de 2 à 10 jours (et plus, si prescription particulière (BK, *Brucella*...)).

Les prélèvements technique de broyage

« Décolle » mécaniquement les bactéries en surface des échantillons (os, matériel...)

- ❑ Plus efficace sur les bactéries en biofilm

Mais

- ❑ Dilue le prélèvement

Les cultures

Les cultures

- **Toujours ensemer plusieurs types de milieux de cultures :** gélosés et liquides (enrichissement)
- Une **hémoculture en parallèle** des ponctions est souvent utile



Les cultures

Le choix systématique minimal inclut (SPILF 1991):

- des milieux gélosés Columbia au sang et chocolat polyvitex(CO)
- des milieux liquides enrichis
- des milieux de Loewenstein (si demande de recherche de Mycobactéries).

Nb : Mycoplasma, Ureaplasma, Chlamydiae, Borrelia et Coxiella nécessitent des techniques particulières de culture.

Les cultures

Il est recommandé de **poursuivre l'incubation** :

- ❑ Des milieux de culture solides (pendant 5 jours en aérobiose et pendant 8 jours en anaérobiose)
- ❑ Des milieux liquides (pendant 14 jours)

Pour permettre l'isolement de :

- ❑ microcolonies de bactéries de croissance lente
= «**small colony variants** »

- ❑ de *Propionibacterium acnes*

- ❑ de bactéries d'espèces différentes qui apparaissent sur les géloses de façon décalée dans le temps (prélèvements pluri-microbiens).

Isolement et identification de **tous les morphotypes différents**
(antibiotypes différents?)

Les cultures

Particularités des micro-colonies *in vitro*:

- Adhérence +++
- Temps de doublement x 10
- Difficulté à extraire l'ADN
- Perte de l'activité bactéricide des antibiotiques, même avec des concentrations très élevées (200 x N)
- Persistance des bactéries dans des niches cellulaires protectrices
Cellules endothéliales des vaisseaux, ostéoblastes,
- Peu de réaction inflammatoire locale.



Les cultures

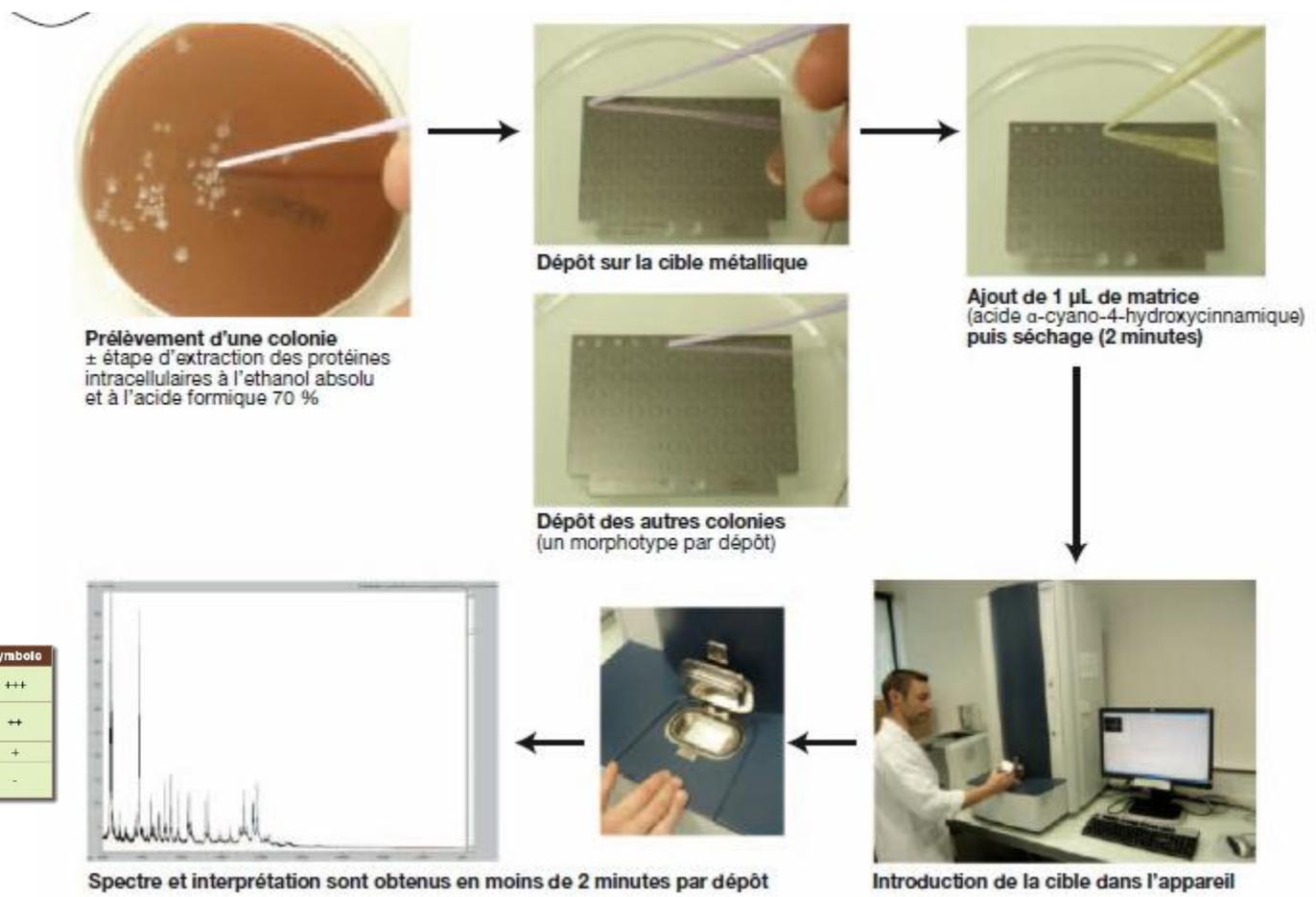
Identification des colonies

- par **tests biochimiques** (tubes, disques, galeries...)
- par CPG
- par biologie moléculaire (PCR ARN16S, SOD...+ séquençage)
- **par spectrométrie de masse**

Caractérisation d'un profil de protéines ⇒ Identification d'une espèce bactérienne

En routine :

la MS est utilisée pour l'identification des microorganismes par analyse de leurs protéines totales, à partir de colonies bactériennes



Score	Description	Symbole
2.300 – 3.000	Forte probabilité d'identification à l'espèce	+++
2.000 – 2.299	Identification du genre sécurisée, identification à l'espèce probable	++
1.700 – 1.999	Identification au genre probable	+
0.000 – 1.699	Degré de confiance insuffisant pour l'identification	-

Les cultures

- Interprétation des cultures (1) (IDSA 2013)
 - Critères cliniques péri-opératoires
Fistule communiquant avec la prothèse et/ou présence de pus, et/ou signes inflammatoires
 - Critères bactériologiques
 - ☞ ≥ 2 prélèvements positifs en culture (préop et/ou perop) avec la même souche bactérienne (Genre, espèce, antibiogramme identiques)= infection certaine
 - ☞ 1 prélèvement positif avec une espèce virulente (*S. aureus*) = infection probable
 - ☞ 1 prélèvement positif avec une espèce commensale = infection suspecte non prouvée (à vérifier)

Les cultures

- Interprétation des cultures (2)

- ▣ Critères bactériologiques

- ☞ Infection polymicrobienne : *pas de consensus*

- ≥ 3 prélèvements positifs (flore cutanée) + ≥ 1 prélèvement positif pathogène stricte/rare

ou

- ≥ 2 prélèvements positifs à 2 pathogènes stricts/rares (*E coli*+ *S aureus*)

Interprétation des cultures (3)

- ❑ **Critère histologique** : classification de type II ou III
- ❑ **Critère moléculaire** : identique au critère bactériologique
 - ❑ Absent dans les infections polymicrobiennes
 - Toutes les bactéries ne sont pas identifiées par la PCR 16S (sauf si clonage... pas en routine)

Détection moléculaire

Recherches par biologie moléculaire

1. Directement sur le prélèvement :

- ❑ Sur prescription médicale argumentée
- ❑ Sur demande du biologiste
- ❑ Après avis RCP
- ❑ Si antibiothérapie au moment du prélèvement
- ❑ Si espèce difficilement ou non cultivable
- ❑ Si espèce présentant des caractères phénotypiques inhabituels

2. Eventuellement pour confirmer une identification de souche

Recherches par biologie moléculaire

❑ PCR « universelle »

- ❑ Gène codant l'**ARN16S** (gène *rrs*)

= Sensibilité de 50 à 92%, spécificité de 65 à 94% sur tissus et liquide synovial, selon les études

- ❑ *Autres (selon laboratoires) (ex : Gène **sod** pour streptocoques...)*

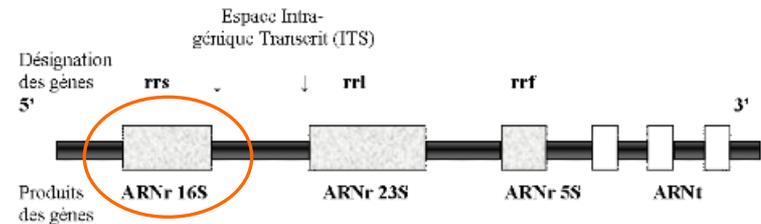
❑ PCR spécifique

- ❑ Gènes **spécifiques** de *Kingella kingae*, *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Mycobacterium*...

Recherches par biologie moléculaire

GENE ARNr 16S (*rrs*)

- ❑ Présents dans toutes les bactéries
 - Régions très conservées
 - **Régions variables**
 - ❑ Séquences ≠ gènes codant pour ARN ribosomal homme (on pourra « isoler » ADN bactérien/ADN humain)
 - ❑ **PCR** sur les **régions variables des gènes** codant pour **ARNr 16S**
 - ❑ **Séquençage des produits PCR obtenus**
 - ❑ Comparaison de la séquence obtenue avec des banques de données (bioinformatique)
- ⇒ Approche pour l'identification des germes **non cultivables** ou **dormants** ou **morts...**



Recherches par biologie moléculaire

GENE ARNr 16S

Les limites de l'amplification du gène par PCR

- *Faux négatifs* :
 - paramètres d'amplification inappropriés
 - quantité d'ADN cible inadéquate (ex: échantillon QI, rendement et qualité de l'extraction d'ADN)
 - présence d'un inhibiteur de la *Taq* polymérase
- *Faux positif* :
 - dus à la contamination des échantillons : **possible à toutes les étapes !**

Cela constitue le problème majeur de cette technique, qui impose

Des **technique de prélèvements et transport conformes aux exigences** et des **mesures expérimentales draconiennes**.

Recherches par biologie moléculaire

GENE ARNr 16S

Les limites du séquençage du produit PCR

- *Faux négatifs* :
 - ❑ plusieurs espèces bactériennes présentes dans le même prélèvement (donc plusieurs amplicons différents dans le même tube)
⇒ séquençage non analysable
 - ❑ Amplification possible d'ADN humain avec certaines amorces (interférence dans l'interprétation du séquençage)

Recherches par biologie moléculaire

GENE ARNr 16S

Les limites de la PCR

- Technique longue à réaliser
- Nécessite un expérimentateur spécialisé
- Ne peut pas distinguer une infection d'une colonisation
- Possible seulement si une espèce bactérienne présente dans l'échantillon analysé
- Ne peut pas distinguer 2 espèces bactériennes identiques avec des antibiotypes différents
- Un site normalement stérile peut contenir de l'ADN bactérien

Recherches par biologie moléculaire

GENES spécifiques

Prélèvement biologique

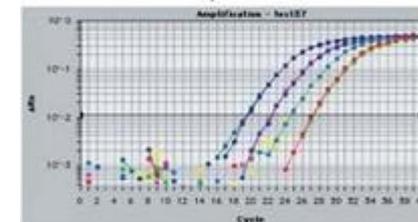


Extraction ADN



PCR spécifique

Amplification d'un gène spécifique propre à une espèce



Présence de courbe signifie que le prélèvement est positif

Souvent PCR temps réel
Ex : *Kingella kingae*

Antibiogramme

Techniques

- Méthode par diffusion en milieu gélosé
 - Méthode des disques
 - Méthode par E tests

- Méthode par dilution en milieu liquide
 - « Barette » antibiogramme
 - Automates

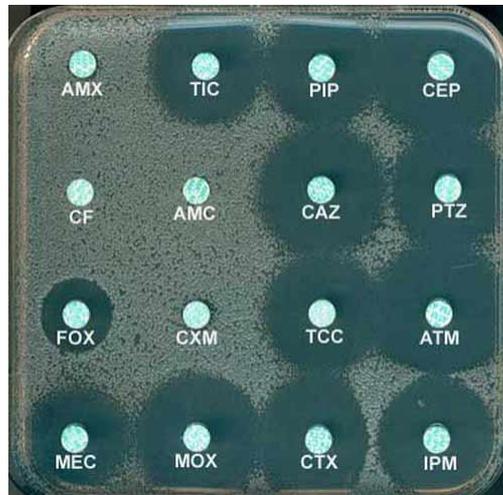
Méthodes standardisées : techniques et interprétation selon les recommandations du CA-SFM et EUCAST



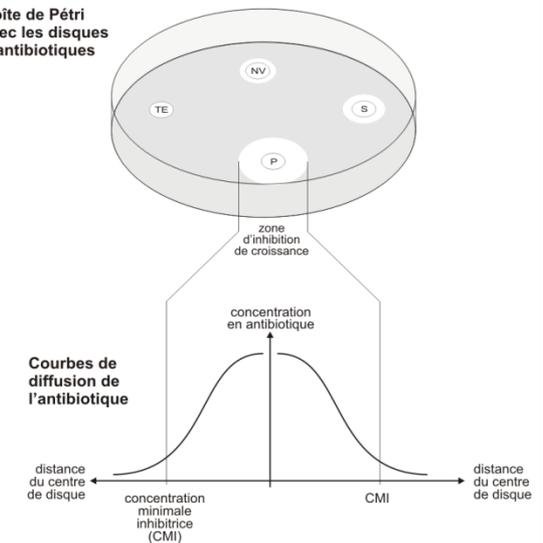
Antibiogramme

Techniques

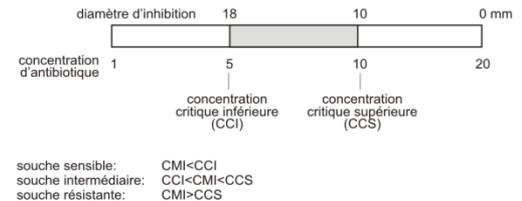
- Méthode par **diffusion** en milieu gélosé
 - Méthode des **disques**



Boîte de Pétri
avec les disques
d'antibiotiques



Abaque de lecture de la sensibilité d'une souche à un antibiotique



Antibiogramme

Techniques

- Méthode par **diffusion** en milieu gélosé
 - Méthode par **E tests**

Exemples :

- CMI des glycopeptides sur les staphylocoques
- CMI pour les antibiotiques pour lesquels il n'existe pas de diamètres critiques définis pour une espèce donnée (ex: ceftaroline)



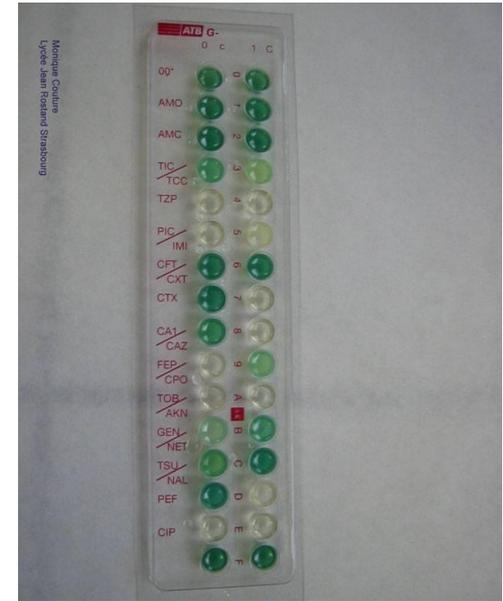
Antibiogramme

Techniques

- Méthode par dilution en milieu liquide
 - « Barette » antibiogramme
 - Automates
- Rendu des CMI vraies ou approchées

Exemple :

- Bactéries anaérobies strictes



Antibiogramme

Interprétation

Si plusieurs isolats de la même espèce bactérienne:

⇒ Nécessité de faire **plusieurs antibiogrammes** : sur un même prélèvement et sur différents prélèvements

Ex : staphylocoques à coagulase négative

⇒ Intérêt de la spectrométrie de masse pour une identification précise des espèces

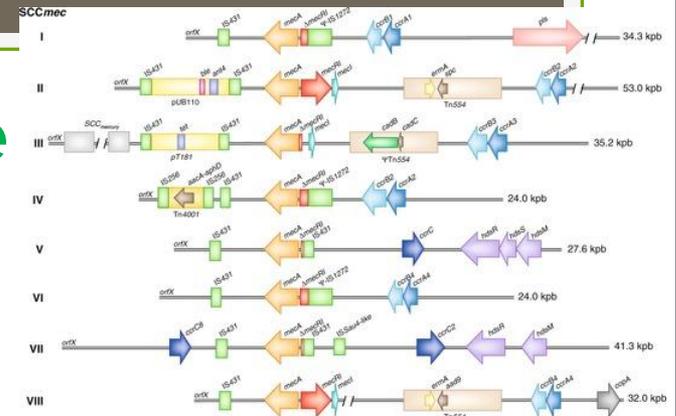
Antibiogramme

Interprétation

Résistance à l'oxacilline (ou cloxacilline ou céfoxitine ou méticilline)

Présence d'une cible des bêta-lactamines nouvelle et insensible à ces antibiotiques (PLP2a, codée par le gène *mecA*)

- Le gène *mecA* est présent sur une cassette = SCC *mec*
- La présence de *mecA* ou l'expression d'une PLP2a sont les références pour la méticillino-résistance
- Expression hétérogène ou homogène: phénomène *in vitro*
- Le mécanisme explique la résistance croisée entre les bêta-lactamines



Interprétation

Antibiogramme

Détection des *Staphylococcus* R à la méticilline
(Si *S. aureus* = SARM)

□ Milieu sélectif (dépistage)



□ Diminution du diamètre d'inhibition à la céfoxitine et/ou moxalactam
(usuel, interprétation selon le CA-SFM)

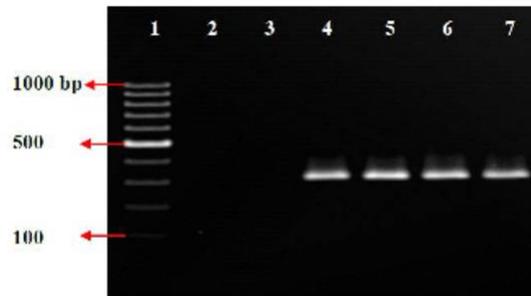


Antibiogramme

Interprétation

Si discordance ou résultat douteux :

- ❑ Confirmation par recherche du **gène *mecA*** (PCR)



Ou

- ❑ Confirmation par détection de la **PLP-2 α** (immuno-chromatographie).
(rapide, mais coûteux)



Histologie

Examen anatomopathologique

- ❑ Il est recommandé sur le tissu osseux et la synoviale.
- ❑ Il est recommandé de définir histologiquement une infection sur matériel par la présence de **plus de 5 polynucléaires** neutrophiles **par champ** à fort grossissement (x 400) **dans au moins 5 champs** microscopiques séparés sur le prélèvement osseux.
(Sensibilité et la spécificité de l'examen varient respectivement entre 43 et 100 % et entre 81 et 98 %).
- ❑ Il permet d'orienter le diagnostic vers une infection à mycobactérie ou vers une infection fongique.

Sérologie

SPILF 1991

La valeur de la sérologie est établie pour :

- la brucellose
- la maladie de Lyme.

Conclusions

Infection ou non ?

Pour conclure à une infection

- certaine,
- probable
- exclue

il est nécessaire de confronter les aspects :

- cliniques
- bactériologiques et moléculaires
- radiologiques
- histologiques

RCP indispensables !

Conclusions

- Les techniques de bactériologie sont de plus en plus efficaces pour le diagnostic des IOA
- La(les) bactérie(s) responsable(s) doivent être isolées sur milieux de culture appropriés pour réaliser un (des) antibiogramme(s)
- La biologie moléculaire doit être réservée aux diagnostics difficiles, lorsque la culture est difficile ou impossible, si les patients sont sous antibiothérapie