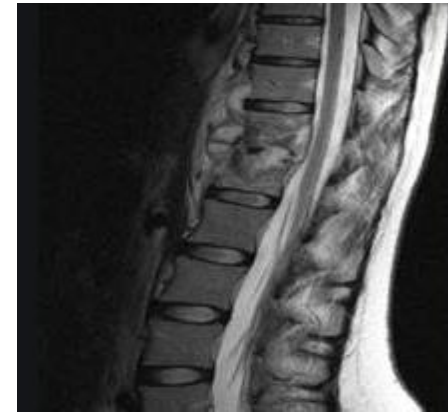


Infections ostéo-articulaires à microorganismes atypiques : Que chercher quand les cultures standards sont négatives?



Réunion bibliographique du CRIOGO

Lundi 21 Octobre 2019



Emilie Prat

Leslie Bouard

Anne Gougeon

Laboratoire de Bactériologie

Plan

I . Rappel sur le diagnostic des IOA au laboratoire

II. Que faire des prélèvements *a priori* stériles ?

Apport de la biologie moléculaire

Autres techniques disponibles au laboratoire

III. Quelles « bactéries atypiques » peut-on suspecter ?

Différentes hypothèses diagnostiques

En pratique au laboratoire

IV. Conclusion/Perspectives

Diagnostic bactériologique des IOA

- **INDISPENSABLE** pour
 - Affirmer l'infection
 - Traiter correctement les infections : adaptation de l'antibiothérapie
- Prélèvements profonds **multiples (4-5)** , avant antibiothérapie
- Souvent difficile
 - Isolement parfois laborieux des bactéries
 - Infections aiguës *versus* infections chroniques
 - Interprétation parfois délicate : contamination potentielle
- Résultats dépendant de :
 - La qualité des prélèvements
 - La rapidité du transport
 - Des techniques utilisées au laboratoire

« On ne trouve que ce que l'on cherche... »

Les étapes du diagnostic au laboratoire



Prélèvement

Site prélevé/nombre/nature/qualité

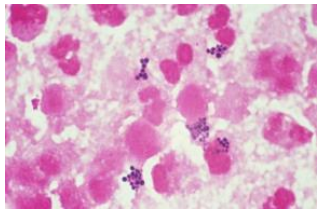
Pré-traitement des échantillons

Prélèvement liquide : Homogénéisation

Prélèvement solide : Broyage



*Biofilm sur le matériel
Bactéries quiescentes*



Examen direct

Gram + Cytologie

Peu sensible

Culture standard

Flacons d'hémoculture

Aérobie/Anaérobie

Enrichissement +++

10J



Milieux solides

Gélose au sang, gélose chocolat

Aérobiose / Anaérobiose

5J



Milieux liquides

Enrichissement

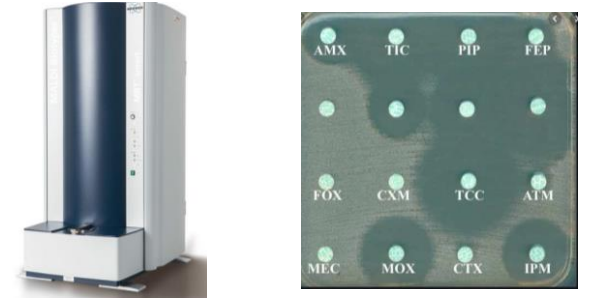
14J



Les étapes du diagnostic au laboratoire

- **Interprétation des cultures :**

- Lecture attentive des différents milieux
- Identification et antibiogramme des différentes colonies
 - Fonction de la nature et nombre de prélèvements +



- Infections aiguës à germes classiques : **Bactéries « normales »**
 - Culture précoce : *Staphylococcus aureus*, Entérobactéries
- Infections chroniques : **Bactéries « stressées »**
 - Culture > 48h : *S. aureus* et colonies naines, *Propionibacterium acnes*



J2

- Parfois difficile :

- Bactéries IOA = +/- bactéries de la flore cutanée
 - Eviter au maximum les risques de contamination à toutes les étapes
- Infections plurimicrobiennes



J10

Que faire des prélèvements *a priori* stériles ?

- 10 à 25% des IOA négatives suivant les études et contextes épidémiocliniques



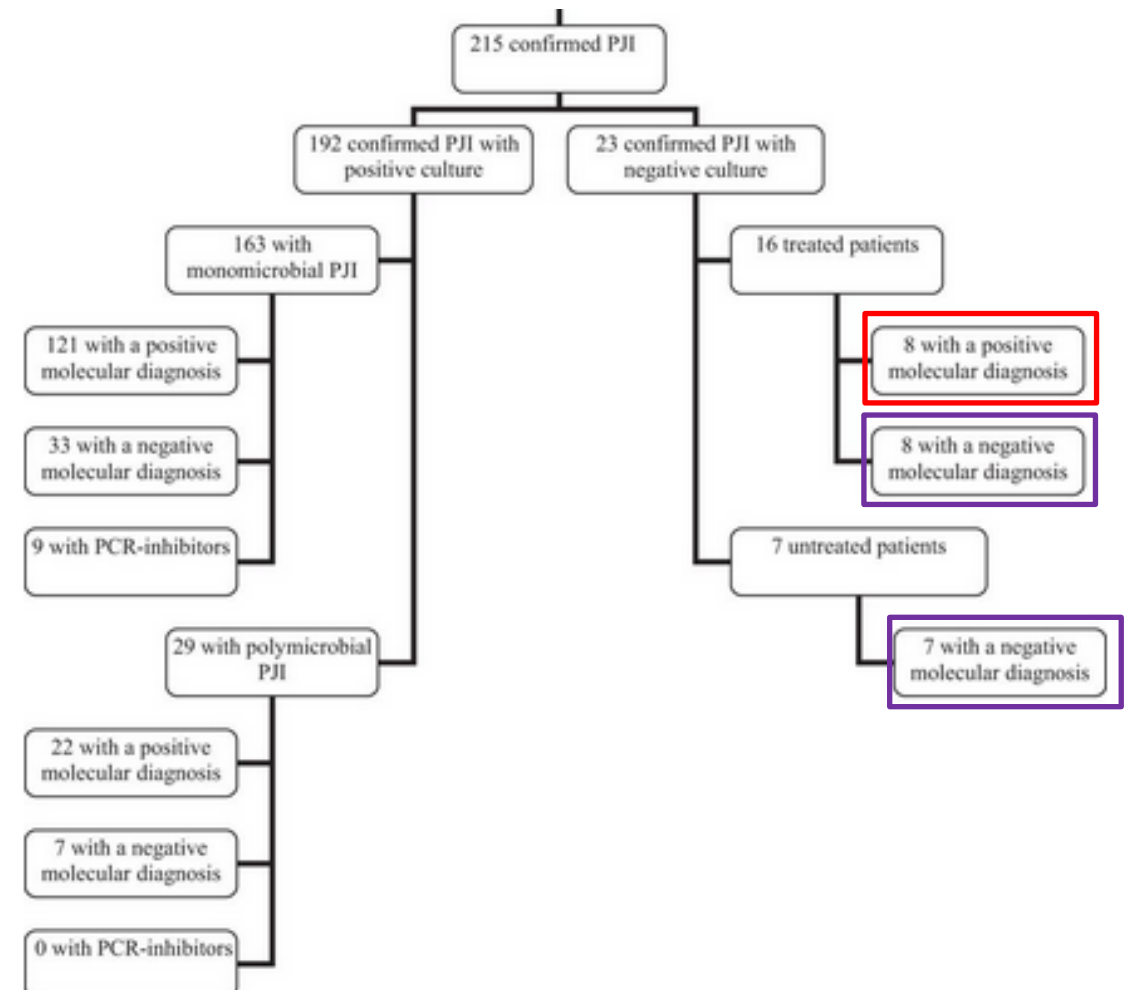
Evaluation of 16S rRNA Gene PCR Sensitivity and Specificity for Diagnosis of Prosthetic Joint Infection: a Prospective Multicenter Cross-Sectional Study

Pascale Bémer,^a Chloé Plouzeau,^b Didier Tande,^c Julie Léger,^d Bruno Giraudeau,^d Anne Sophie Valentin,^e Anne Jolivet-Gougeon,^f Pascal Vincent,^f Stéphane Corvec,^a Sophie Gibaud,^a Marie Emmanuelle Juvin,^a Genevieve Héry-Arnaud,^c Carole Lemarié,^g Marie Kempf,^g Laurent Bret,^h Roland Quentin,^g Carine Coffre,^d Gonzague de Pinieux,ⁱ Louis Bernard,^j Christophe Burucoa,^b the Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest (CRIOGO) Study Team

CHU Nantes, Laboratoire de Bactériologie, Nantes, France^a; CHU Poitiers, Laboratoire de Bactériologie, Poitiers, France^b; CHU Brest, Laboratoire de Bactériologie, Brest, France^c; INSERM, CIC 1415, Tours, France^d; CHU Tours, Laboratoire de Bactériologie, Tours, France^e; CHU Rennes, Laboratoire de Bactériologie, Rennes, France^f; CHU Angers, Angers, France^g; CHU Orléans, Laboratoire de Bactériologie, Orléans, France^h; CHU Tours, Laboratoire d'Anatomo-Pathologie, Tours, Franceⁱ; CHU Tours, Service des Maladies Infectieuses, Tours, France^j

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*



Que faire des prélèvements *a priori* stériles ?

- **Raisons ?**

- Patient sous antibiotique
 - Prélèvement non optimal ou en trop faible quantité
 - Transport trop long
 - Bactérie trop fragile
 - Bactéries « cachées » (intracellulaire ou en biofilm)
 - Bactéries physiologiquement peu actives
 - Bactéries à croissance lente
 - Bactéries normales (IOA aigüe) vs Bactéries stressées (IOA chronique)
- Gestion préanalytique des prélèvements +++**
- Traitement adéquat des prélèvements**
- Cultures longues
Milieux riches
Multiplicité des milieux**
-

Que faire des prélèvements *a priori* stériles ?

- Discussion clinico-biologique fondamentale :

Chirurgien

Infectiologue

Microbiologiste

Radiologue

Infections fortement suspectées malgré les cultures standard négatives

Quels sont les outils disponibles au laboratoire ?

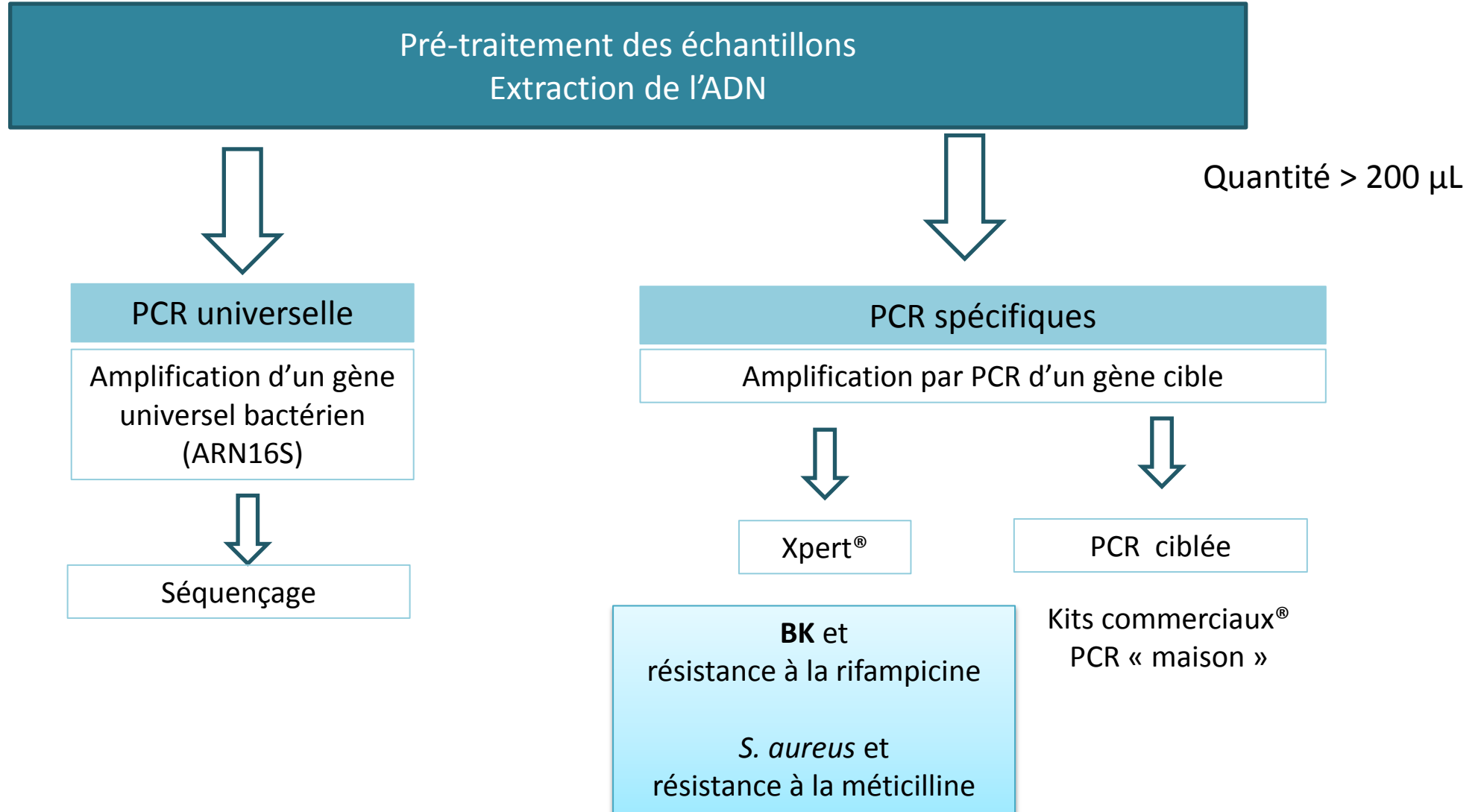
Biologie moléculaire

Culture lente
Faible inoculum
Pas d'antibiogramme

Conditions de culture

Sérologie

Biologie moléculaire et IOA



Que faire des prélèvements *a priori* stériles ?

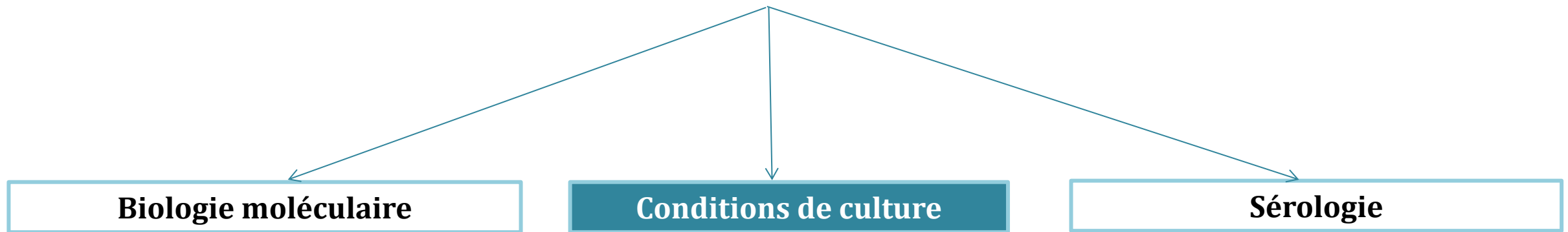
- Discussion clinico-biologique fondamentale :



Infections fortement suspectées malgré les cultures standard négatives



Quels sont les outils disponibles au laboratoire ?



Bactéries à croissance lente
Bactéries particulières

Que faire des prélèvements *a priori* stériles ?

- Discussion clinico-biologique fondamentale :



Infections fortement suspectées malgré les cultures standard négatives



Quels sont les outils disponibles au laboratoire ?

Biologie moléculaire

Conditions de culture

Sérologie

Facile / Rapide
Bactéries non cultivables
Bactéries intracellulaires
Rétrospectif

Quelles bactéries atypiques peut-on suspecter ?

- Bactéries difficilement cultivables au laboratoire
 - Croissance lente
 - Croissance sur milieux spécifiques
- Bactéries non cultivables

Mycobacterium tuberculosis
Mycobactéries atypiques
Brucella spp
Mycoplasma spp
Kingella kingae
Bartonella henselae
Tropheryma whipplei

Quand les suspecter et comment les identifier au laboratoire



Mycobacterium tuberculosis ou BK

- 2 à 5% de l'ensemble des tuberculoses
 - Tuberculose vertébrale dans 50% des cas (Mal de Pott)
 - Arthrite, ostéomyélite, ténosynovite, bursite
- Porte d'entrée pulmonaire
 - Réactivation de BK dormants
- Terrains à risque :
 - Pays forte endémie (sujets jeunes)
 - Contage
 - Immunodépression
- Clinique peu spécifique
 - AEG, fièvre (<50% des cas)
 - Impotence fonctionnelle
- Imagerie :
 - Géodes avec séquestre
 - Foyer de calcification
- Histologie : Granulomes caséeux



Au laboratoire :

- Secteur protégé : **Laboratoire L3**
- Culture sur **milieux spécifiques** :
 - Milieu solide (Lowenstein Jensen)
 - Milieu liquide (MGIT)
- Incubation prolongée : 42 jours
- **Biologie moléculaire** :
 - PCR **GeneXpert** directement sur le prélèvement
 - Détection BK et résistance à la rifampicine

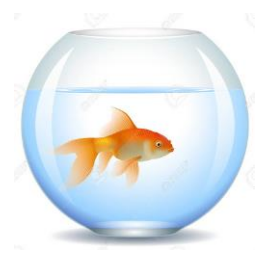


Mycobactéries atypiques

- Mycobactéries non tuberculeuses (> 150 espèces) :
 - Bactéries ubiquitaires : eaux, sols, végétations
 - *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*...
- Pathogènes opportunistes /IOA rares
- Terrain :
 - Facteurs favorisant :
 - Traumatisme local : contact eau (baignade, aquarium), terre
 - Dermatoses cutanées pré-existantes
 - Nosocomial : infiltrations, prothèses
 - Chez ID (formes généralisées)
- Tableau : Arthrite (genou), ténosynovite (main), ostéite/spondylodiscite
- Retard diagnostique et thérapeutique
 - Mime pathologie inflammatoire rhumatismale (anti-TNF)

Au laboratoire :

- Secteur protégé : **Laboratoire L3**
- Croissance +/- lente
- Culture sur **milieux spécifiques** :
 - Milieu solide (LJ)
 - Milieu liquide (MGIT)
 - Mais croissance sur milieu standard possible
- Incubation prolongée : 42 jours
- Deux T° d'incubation : 30 et 37°C
- **Culture = Référence**
- Biologie moléculaire :
 - **PCR *hsp65* + séquençage**

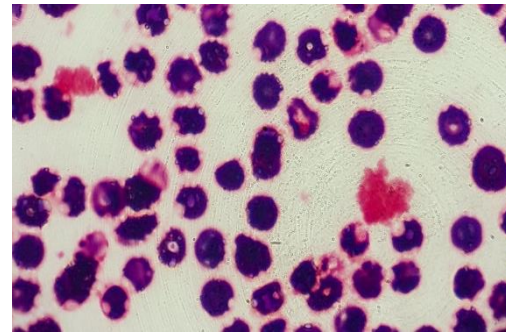


Brucella spp

- Brucellose ou Fièvre de Malte/Fièvre ondulante
- Anthroponose à déclaration obligatoire
- Coccobacilles à Gram (-), intracellulaires
 - *Brucella melitensis* (moutons et chèvres), *B. suis* (porcs), *B. abortus* (bovins), *B. canis* (chien)
- Transmission par contact avec les animaux ou ingestions produits laitiers crus
 - En zone rurale
 - Maladie professionnelle
 - Cas d'importation +++
- Période d'incubation : \approx 2 semaines
- Atteintes osseuses : 30 à 50%
 - localisation secondaire
 - Spondylodiscite

Au laboratoire :

- Secteur protégé : **Laboratoire L3**
 - Agent classe 3
- Hémoculture **prolongée > 10J**
- **ARN 16S**
- **Sérologie**
 - Simple parfois plus rapide
 - Dépistage au laboratoire (Rose Bengale)
 - Confirmation par laboratoire de référence



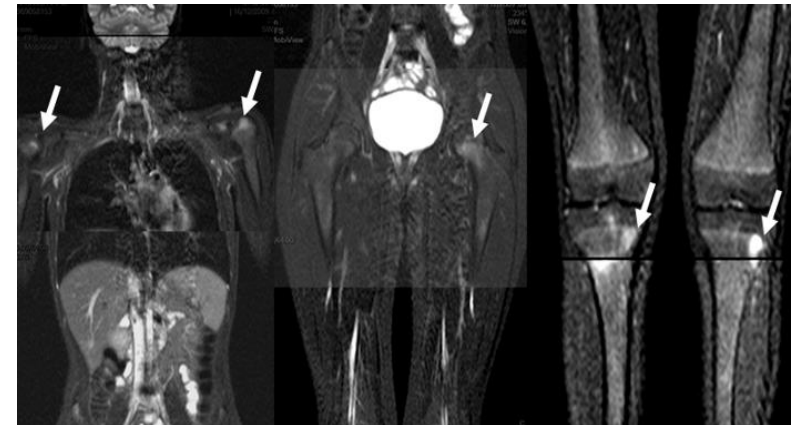
Bartonella henselae

- Bactérie intracellulaire responsable de la « maladie des griffes du chat »
 - Adénopathie inflammatoire provoqué par griffure/morsure
- Localisation osseuse très rare, surtout chez l'enfant
 - Dissémination hémotogène
- Tableau d'ostéomyélite
 - Atteinte surtout vertébrale (thoracique +++)
 - Atteinte articulaire rare
- Savoir l'évoquer devant une fièvre inexplicquée/
atteinte osseuse uni ou multifocale et contact avec chat
 - Interrogatoire +++



Au laboratoire :

- Culture très peu sensible
- **Sérologie**
- **Biologie moléculaire**
 - **PCR ciblée**
 - Sur biopsie vertébrale
 - Sur ganglion +++
 - **PCR ARNr16S**



Kingella kingae

- Infections ostéo-articulaires de l'enfant
- 1^{ère} cause d'arthrite septique chez l'enfant de 6 mois à 4ans
 - Cas également décrit chez l'adulte

Ricketts et al. (2015). Case Reports in Orthopedics, 2015,

- Physiopathologie peu expliquée
 - Lien avec infections virales ORL
 - Dissémination hématogène
 - Virulence : Production d'une toxine rtxA
- Infection paucisymptomatique, révélée par une boiterie



Kingella kingae

Etude française, 2013

Prospective survey of acute osteoarticular infections in a French paediatric orthopedic surgery unit

A. Ferroni¹, H. Al Khoury², C. Dana², G. Quesne¹, P. Berche¹, C. Glorion² and Z. Péjin²

1) Hôpital Necker Enfants-Malades, Laboratoire de Bactériologie and 2) Hôpital Necker-Enfants Malades, Unité de Chirurgie Orthopédique Pédiatrique, Paris, France

TABLE 3. Respective contributions of standard cultures in solid media, enrichment in blood culture bottles, PCR and blood culture to the bacteriological diagnosis

Species	Bacteria recovered by				Total
	Standard culture	Enrichment	Only PCR	Only blood culture	
<i>K. kingae</i>	0	4	39	1	44
<i>S. aureus</i>	13	2	3	6	24
<i>S. pyogenes</i>	3	0	1	2	6
<i>S. pneumoniae</i>	2	0	1	0	3
<i>S. agalactiae</i>	0	2	0	0	2
Others	0	2	2	0	4

Au laboratoire :

- Bactérie très fragile
 - Faible sensibilité de la culture (faible inoculum)
 - Inoculation des flacons d'hémoculture directement au lit du malade
- **PCR spécifique +++**
 - **En systématique chez l'enfant < 4 ans**
 - Directement sur prélèvement
 - Multiplier les prélèvements

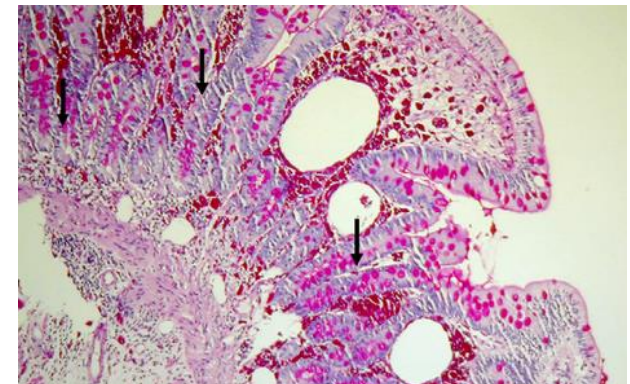
- Retrouvé dans 53% des IOA documentés chez l'enfant < 4 ans
- 88% uniquement détectées par PCR

Tropheryma whipplei

- Bacille à Gram négatif, intracellulaire, ubiquitaire
 - Affection bactérienne rare, potentiellement mortelle
- Diagnostic difficile et souvent tardif
- Surtout chez l'homme caucasien de plus de 50 ans
 - Exposition terres agricoles/stations d'épuration
 - Predisposition génétique
- Contamination probablement digestive
- Tableau clinique :
 - Atteinte polyviscérale : Maladie de Whipple
 - **Polyarthrite** chronique intermittente non destructrice
 - Fièvre, **Amaigrissement**, Sd inflammatoire
 - **Diarrhées** chroniques
 - Infections localisées : Arthrites, spondylodiscites
- Diagnostic différentiel : Rhumatisme inflammatoire chronique
 - Découverte par ttt immunosuppresseur et amélioration sous ATB

Au laboratoire :

- **Non cultivable sur milieux standards**
- **PCR ciblée**
 - **Sites non spécifiques :**
 - Sang, selle, salive, urine
 - Dépistage
 - Synovite
 - Biopsies duodénales
- PCR ARNr16S
- PAS ou Immunohistochimie
 - Biopsie duodénale



Mycoplasma spp

- Bactéries ubiquitaires
 - Absence de paroi : fragilité dans le milieu extérieur
- Plusieurs espèces pathogènes pour l'Homme :
 - *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *Ureaplasma sp*, *M. arthritidis*, *M. fermentans*, *M. genitalium*, ...
- Pouvoir arthritogène des mycoplasmes
 - Arthrite septique
 - Arthrite réactionnelle
- Surtout genoux et hanches (Myanet al., American journal of transplantation, 2005)
- Terrain : Immunodépression
- Discussion pluri-disciplinaire

Au laboratoire :

- Culture fastidieuse
- Préférable sur milieux spécifiques
 - Non réalisés en systématique au laboratoire
- Sérologie
 - *M. pneumoniae*
- **PCR ciblée**
 - Liquide articulaire
 - Autres sites (gorge, voie urogénitale)
- PCR ARN 16S

Tableau clinique	Espèce	Degré de certitude	Commentaire
Arthrites septiques chez immunodéprimés	<i>U. urealyticum</i> <i>M. hominis</i> , <i>M. pneumoniae</i>	+++	40 % des arthrites chez hypogammaglobulinémiques
Arthrites réactionnelles	<i>U. urealyticum</i>	++	arguments directs et indirects fréquence : inconnue
PR, rhumatismes inflammatoires	<i>M. fermentans</i> <i>U. urealyticum</i>	?	mycoplasmes présents à l'état viable dans certains cas

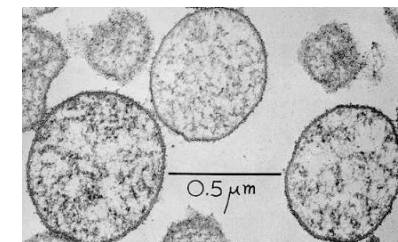


Tableau I Implication des mycoplasmes dans les arthrites humaines.

En résumé

- **Importance du dialogue clinico-biologique**
 - Avertir le laboratoire pour mettre en œuvre les techniques adaptées
- **Interrogatoire +++**

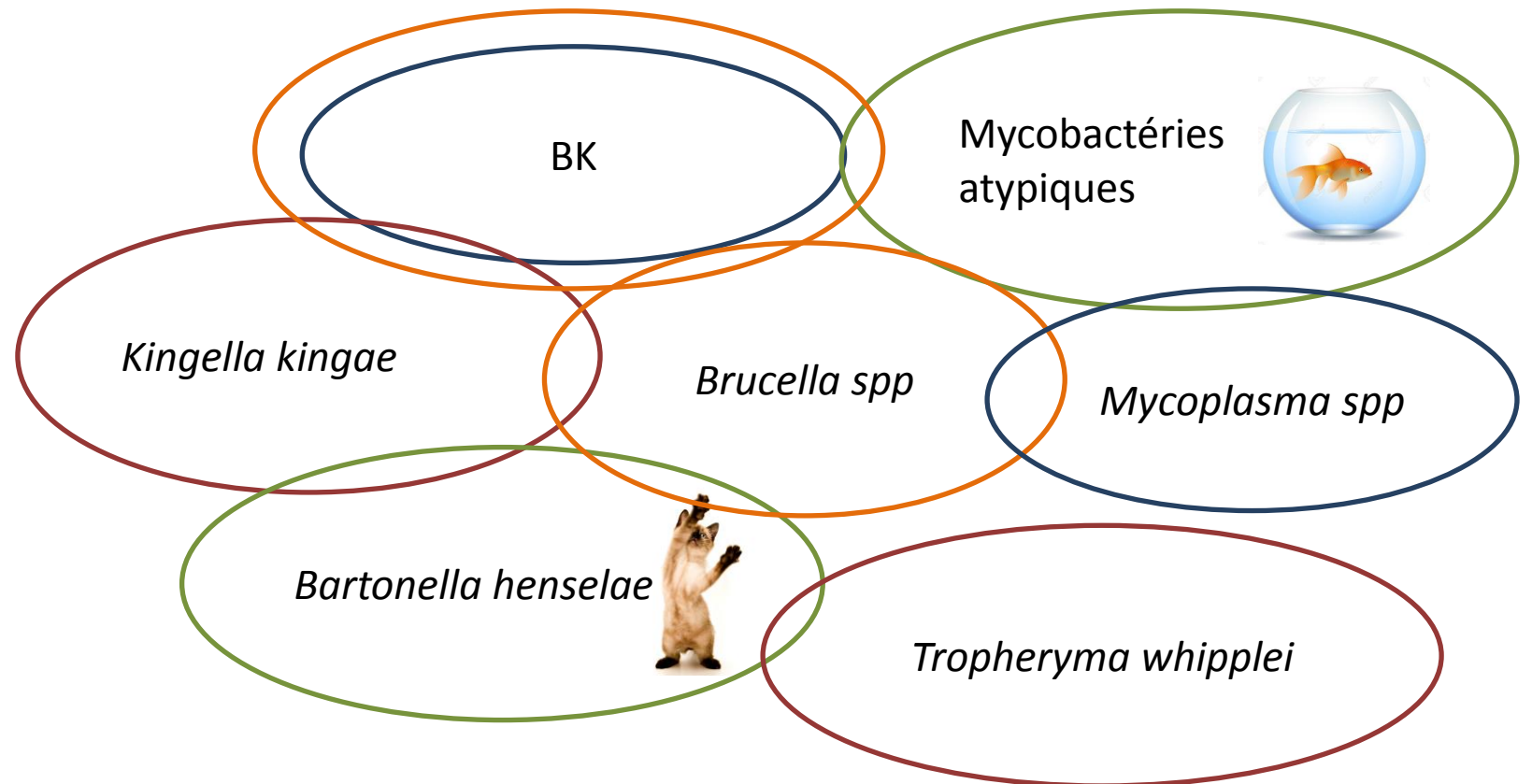


Contact avec les animaux

Age

Immunodépression

Voyage



Conclusion

- Bonne sensibilité des techniques standard
 - Culture tardive, jusqu'à 14J
 - Multiplicité des milieux
 - Enrichissement grâce aux flacons d'hémoculture
- Intérêt de la biologie moléculaire +++
 - Faible inoculum de départ
 - Germes à croissance difficile
 - Antibiothérapie
 - Détection de très nombreuses espèces bactériennes
- Ne pas oublier les germes atypiques !
 - Contexte clinique Interrogatoire
- Rôle du laboratoire d'anatomopathologie
 - Dénombrement des leucocytes
 - Aide au diagnostic BK

Le futur : séquençage haut débit, métagénomique ?

- Concept : Séquençage de tout l'ADN présent dans un échantillon clinique dans le but d'identifier les germes en présence et leur susceptibilité aux antibiotiques

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Clinical metagenomics of bone and joint infections: a proof of concept study

Received: 21 February 2017
Accepted: 29 June 2017
Published online: 10 August 2017

Etienne Ruppé¹, Vladimir Lazarevic¹, Myriam Girard¹, William Mouton^{2,3}, Tristan Ferry^{2,4}, Frédéric Laurent^{2,3} & Jacques Schrenzel^{1,5}

But : Evaluer les performances de la métagénomique clinique dans les IOA comparativement à la microbiologie conventionnelle

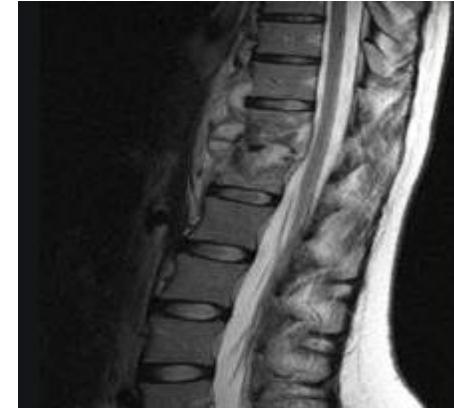
- 24/179 prélèvements (47 patients) :
 - 8 prélèvements : infection mono-microbienne retrouvée également par culture
 - Prédiction génétique de l'antibiogramme dans 94% des cas
 - 273 bactéries identifiées par séquençage et non retrouvées en culture
 - 1/3 contaminants
 - 2/3 possibles pathogènes

Conclusion : La méthode est prometteuse mais

- Quantité d'ADN bactérien
- Interprétation des échantillons polymicrobiens : contaminant ou pathogène
- Temps nécessaire aux résultats (bio-informatique)
- rapport coût/bénéfice encore défavorable



Merci de votre attention



CENTRES DE RÉFÉRENCE
POUR LES INFECTIONS OSTÉO-ARTICULAIRES COMPLEXES
DU GRAND OUEST

CRIOGO



UNIVERSITÉ DE
RENNES 1

