



**HAL**  
open science

# Pertinence de l'utilisation de flacons à hémoculture aérobies et anaérobies pour l'optimisation du diagnostic rapide des infections ostéo-articulaires

Emmanuelle Ducasse

► **To cite this version:**

Emmanuelle Ducasse. Pertinence de l'utilisation de flacons à hémoculture aérobies et anaérobies pour l'optimisation du diagnostic rapide des infections ostéo-articulaires. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02570632

**HAL Id: dumas-02570632**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02570632v1>**

Submitted on 10 May 2021

**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.



**THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

Thèse en vue du  
**DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée par  
**Emmanuelle Ducasse**

---

Pertinence de l'utilisation  
de flacons à hémoculture  
aérobies et anaérobies  
pour l'optimisation du  
diagnostic rapide des  
infections ostéo-  
articulaires

**Thèse soutenue à Rennes  
le 26 avril 2019**

devant le jury composé de :

**Latifa BOUSARGHIN**

Maitre de Conférence Université de Rennes 1  
Habilitation à Diriger des Recherches/ Président

**Anne GOUGEON**

Professeur Université de Rennes 1 Praticien  
Hospitalier/ Directeur de thèse

**Thomas GICQUEL**

Professeur Université de Rennes 1 Praticien  
Hospitalier/ *examineur*

**Solène PATRAT-DELON**

Praticien Hospitalier, Infectiologue / *examineur*

**ANNEE 2018-2019**

**Listes des enseignants-chercheurs de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques**

<b>PROFESSEURS</b>		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	BOUSTIE Joël	X	HDR	
2	DONNIO Pierre Yves	X	HDR	X
3	FAILI Ahmad		HDR	
4	FARDEL Olivier	X	HDR	X
5	FELDEN Brice	X	HDR	
6	GAMBAROTA Giulio		HDR	
7	GOUGEON Anne	X	HDR	
8	LAGENTE Vincent	X	HDR	
9	LE CORRE Pascal	X	HDR	X
10	LORANT (BOICHOT) Elisabeth		HDR	
11	MOREL Isabelle	X	HDR	X
12	SERGEANT Odile	X	HDR	
13	SPARFEL-BERLIVET Lydie	X	HDR	
14	TOMASI Sophie	X	HDR	
15	URIAC Philippe	X	HDR	
16	VAN DE WEGHE Pierre		HDR	
17	VERNHET Laurent	X	HDR	

<b>PROFESSEURS ASSOCIES</b>		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	BUREAU Loïc	X		
2	DAVOUST Noëlle	X		

<b>PROFESSEURS EMERITES</b>		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	CILLARD Josiane	X	HDR	
2	GUILLOUZO André		HDR	

MAITRES DE CONFERENCES				
		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	ABASQ-PAOFAI	Marie-Laurence		
2	ANINAT	Caroline	X	HDR
3	AUGAGNEUR	Yoann		
4	BEGRICHE	Karima		
5	BOUSARGHIN	Latifa		HDR
6	BRANDHONNEUR	Nolwenn		
7	BRUYERE	Arnaud	X	
8	BUNETEL	Laurence	X	
9	CHOLLET-KRUGLER	Marylène	X	
10	COLLIN	Xavier	X	
11	CORBEL	Jean-Charles	X	HDR
12	DELALANDE	Olivier		
13	DELMAIL	David		HDR
14	DION	Sarah	X	
15	DOLLO	Gilles	X	HDR X
16	ÉICQUEL	Thomas	X	X
17	ÉILOT	David		HDR
18	ÉOUAULT	Nicolas		HDR
19	HITTI	Eric		
20	JEAN	Mickaël	X	
21	JOANNES	Audrey		
22	LEUREUR	Valérie		HDR
23	LE FERREC	Eric	X	
24	LE GALL-DAVID	Sandrine		
25	LE PABIC	Hélène		
26	LEGOVIN-GARGADENNEC	Béatrice		
27	LOHEZIC-LE DEVEHAT	Françoise	X	
28	MARTIN-CHOULY	Corinne		HDR
29	NOURY	Fanny		
30	PINEL-MARIE	Marie-Laure		
31	PODECHARD	Normand		
32	POTIN	Sophie	X	X
33	RENAULT	Jacques	X	HDR
34	ROUILLON	Astrid		

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE (AHU)				
		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	BACLE	Astrid	X	X
2	BOUVRY	Christelle	X	X

ATER				
		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	CHEDIK	Lisa	X	

LRU				
		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	AFONSO	Damien		
2	VICTONI	Tatiana	X	

## REMERCIEMENTS

A Madame Latifa Bousarghin

Vous me faites l'honneur de présider mon jury de thèse. Veuillez accepter mes plus sincères remerciements.

A Madame Anne Gougeon

Vous m'avez proposé ce sujet lors de mon stage hospitalo-universitaire en bactériologie et avez encadré ce travail avec bienveillance. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus sincère gratitude.

A Monsieur Thomas Gicquel

Après avoir eu la joie d'animer votre mariage il y a deux ans vous me faites l'amitié de faire partie de mon jury de thèse, cela prend tout son sens pour moi et je vous en remercie vivement.

A Madame Solène Patrat-Delon

Vous me faites l'honneur de participer de ce jury et je vous en remercie sincèrement.

A Monsieur Guillaume Coiffier

Vous m'avez été d'une aide précieuse tout au long de cette étude, ce fut un réel plaisir de travailler avec vous. Je vous présente mes remerciements les plus sincères.

A tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail.

A mes parents, qui depuis vingt-trois ans m'inspirent et veillent sur moi avec bienveillance et tendresse. Je ne vous remercierai jamais assez.

A Vincent, Gabriel, Laurie-Anne, Grégoire, Flavie, Joseph et Philomène-Marie que j'aime tendrement.

A Alice, François-Marie et Elise, qui ont illuminé ces années de fac.

A Guiral et Elodie, le fameux « cercle 0 » dont l'amitié m'est si précieuse.

Au Sénat des Jeunes Pros, particulièrement Marie, Gilbert, Aude, Violaine, Marie-Geneviève et Jean, mon co-consul ainsi qu'à la mangouste.

A mes colocs de St Yves, spécialement Pierre-Adrien, Marianne, Emmeline et Déborah, pour deux de mes plus belles années rennaises.

Aux amis qui m'entourent de leur affection, particulièrement Anne-Hermine, Guilhem, Geneviève, Antoine, Clément.

Merci pour les bons moments passés ensemble et ceux à venir !

A Madame Queguiner qui m'a accueillie pour mon stage de fin d'études,

A Bénédicte et Nadine aux côtés desquelles j'ai beaucoup appris, un immense merci pour vos conseils et votre bienveillance,

A Madame Denoual avec qui j'ai le plaisir de débiter ma carrière de pharmacien sereinement,

Je dédie ce travail à la mémoire de mon grand-père maternel, Pierre Le Roux, biologiste, qui fut un exemple de bonté, de travail et de générosité, et un grand-père exceptionnel.

## Serment de Galien

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté  
et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes  
de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant  
fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé Publique, ma  
profession avec conscience et de respecter non seulement  
la législation en vigueur, mais aussi les règles de  
l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs  
envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je  
ne consentirai à utiliser mes connaissances  
et mon état pour corrompre les mœurs  
et favoriser ces actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à  
mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères  
si j'y manque.



## TABLE DES MATIERES

LISTE DES ANNEXES.....	11
LISTES DES ILLUSTRATIONS ET FIGURES.....	12
TABLE DES ABREVIATIONS .....	13
INTRODUCTION.....	14
1. Rappels bibliographiques.....	15
1.1. Infections ostéo-articulaires .....	15
1.1.1. Définition et classification des infections ostéo-articulaires (IOA) .....	15
1.1.1.1. Classification selon la pathogenèse :.....	15
1.1.1.2. Classification selon la durée de l'infection :.....	15
1.1.1.3. Classification selon la localisation :.....	16
1.1.1.4. Classification selon la présence ou non de matériel :.....	16
1.1.1.5. Classification selon l'origine de l'infection : .....	16
1.1.1.6. Autres classifications : .....	17
1.1.2. Prévalence et facteurs de risques des IOA :.....	17
1.1.3. Critères de complexité :.....	20
1.1.4. Indications des prélèvements ostéo-articulaires : .....	21
1.1.5. Physiopathologie :.....	21
1.1.5.1. Physiologie du tissu osseux :.....	21
1.1.5.2. Réponse inflammatoire.....	22
1.1.5.3. Mécanismes bactériens de persistance et chronicisation.....	22
1.1.5.3.1. Le biofilm.....	22
1.1.5.3.2. Les Small Colony Variants .....	23
1.1.5.3.3. La persistance intracellulaire .....	25
1.2. Généralités sur les hémocultures .....	25
1.2.1. Définition.....	25
1.2.2. Historique.....	26
1.2.3. Indication et objectifs.....	26
1.3. Intérêt du bouillon des flacons à hémoculture pour l'enrichissement.....	27
1.3.1. Principe de fonctionnement du BACTEC.....	27
1.3.2. Des conditions de culture optimales .....	29
1.3.3. Une automatisation du système .....	31
1.3.4. Une méthode qui améliore la sensibilité et la rapidité de la détection bactérienne.....	31
1.3.5. Orientation précoce de l'antibiothérapie .....	33
1.4. Diagnostic des IOA.....	34
1.4.1. Diagnostic clinique et radiologique .....	34
1.4.2. Diagnostic biologique et microbiologique des IOA : .....	36
1.4.2.1. Prélèvements.....	36

1.4.2.1.1.	Types de prélèvements.....	37
1.4.2.1.2.	Conditions de réalisation des prélèvements.....	38
1.4.2.1.3.	La quantité de prélèvements.....	39
1.4.2.1.4.	Acheminement des prélèvements.....	39
1.4.2.1.5.	Réception des échantillons et broyage .....	40
1.4.2.2.	Ensemencement et mise en culture.....	42
1.4.2.3.	Détection de la croissance bactérienne et identification.....	43
1.4.2.3.1.	Examen cytologique et GRAM.....	43
1.4.2.3.2.	Identification biochimique.....	44
1.4.2.3.3.	Spectrométrie de masse.....	44
1.4.2.3.4.	Biologie moléculaire.....	47
1.4.2.4.	Microorganismes impliqués dans les infections ostéo-articulaires.....	49
1.4.2.4.1.	Microorganismes classiquement retrouvés .....	50
1.4.2.4.2.	Bactéries fastidieuses et plus rares .....	50
1.4.2.4.3.	Mycobactéries et levures .....	51
1.4.2.5.	Antibiogramme .....	52
1.5.	Options thérapeutiques.....	53
1.5.1.	Stratégie thérapeutique .....	53
1.5.2.	Traitements médicamenteux .....	55
1.5.3.	Traitement chirurgical.....	57
1.5.4.	Suivi .....	57
1.5.5.	Rôle du pharmacien d'officine .....	58
2.	Travail expérimental .....	59
2.1.	Objectifs de l'étude .....	59
2.2.	Matériels et Méthodes .....	59
2.2.1.	Patients.....	59
2.2.2.	Traitement des prélèvements.....	60
2.2.2.1.	Prélèvements.....	60
2.2.2.2.	Examen direct : Numération cellulaire et GRAM.....	60
2.2.2.3.	Broyage.....	61
2.2.2.4.	Ensemencement et cultures .....	61
2.2.2.4.1.	Milieux solides .....	61
2.2.2.4.2.	Milieux liquides .....	61
2.2.2.5.	Suivi des géloses et flacons.....	62
2.2.3.	Méthodes statistiques.....	62
2.3.	Résultats .....	63
2.3.1.	Population étudiée et étiologie bactérienne des infections ostéo-articulaires...63	
2.3.2.	Taux et délais de positivité des différents examens bactériologiques .....	63
2.3.3.	Taux de récupération et pourcentage de microorganismes en fonction du milieu de culture (tableau 1) .....	64
2.3.4.	Influence de divers facteurs sur le délai de positivité des flacons à	

hémocultures : .....	65
2.4. Discussion .....	67
CONCLUSION .....	70
ANNEXES .....	71
BIBLIOGRAPHIE.....	84

## LISTE DES ANNEXES

### TABLE 1

Recovery rate and percentage of microorganisms identified in (BD BACTEC® Plus Aerobic/F)(AE) and anaerobic (BD BACTEC® Lytic/10 Anaerobic/F)(ANA) enrichment vials, and agar media.

### TABLE 2

Positive time to detection of the micro-organisms in (BD BACTEC® Plus Aerobic/F)(AE) and anaerobic (BD BACTEC® Lytic/10 Anaerobic/F)(ANA) enrichment vials, compared to agar media.

Other Gram negative bacteria: *Campylobacter fetus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*.

### TABLE 3 et 4

Comparison between positive time to detection in BD BACTEC® Plus Aerobic/F)(AE) and anaerobic (BD BACTEC® Lytic/10 Anaerobic/F)(ANA) enrichment vials, and agar media. Only positive samples, both on enrichment vials and agar plates, are counted (Aerobic: N = 394 and Anaerobic = 347).

### FIGURE 1

Positivity rate and positive time to detection (in hours) by each main class of microorganisms: data for BD BACTEC® Plus Aerobic/F)(A) and anaerobic (BD BACTEC® Lytic/10 Anaerobic/F)(B) enrichment vials, for all isolates grown from bone and synovial samples (n=496).

Bacterial species identified by MALDI-TOF were: *Streptococcus* (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. anginosus*, *S. pneumoniae*, *S. gordonii*, *S. salivarius*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. bovis*), *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdu*, *S. warneri*), other facultative aerobes Gram + (9 species : *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Granulicatella*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*), *Cutibacterium acnes* and other Gram positive anaerobes (2 species : *Actinomyces*, *Finegoldia*), Gram positive aerobe (*Corynebacterium*) and *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Proteus*) and other Gram negative bacteria (*Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella*).

## ARTICLE

## LISTES DES ILLUSTRATIONS ET FIGURES

Figure 1 Prévalence des infections ostéo-articulaires selon l'âge et le sexe des patients en 2008 et en 2013. ....	18
Figure 2 Taux de mortalité et de létalité des IOA selon le sexe, l'âge et la présence ou non de matériel chez les patients hospitalisés en France en 2008 .....	19
Figure 3 Graphique exposant les co-morbidités les plus fréquentes des IOA selon le sexe des patients.....	20
Figure 4 Photos de microscopie électronique à balayage mettant en évidence la formation et l'évolution du biofilm composé par <i>S. epidermidis</i> à la surface de polymère adhésif en cyanoacrylate au cours du temps .....	23
Figure 5 Aspect de colonies de <i>S. aureus</i> sur gélose au sang.....	24
(a- Phénotype sauvage b- Phénotype SCV) .....	24
Figure 6 Processus d'internalisation de <i>S. aureus</i> dans un ostéoblaste, en microscopie électronique à balayage .....	25
Figure 7 Détection du CO <sub>2</sub> par réflectométrie BACT/ALERT .....	28
Figure 8 Détection du CO <sub>2</sub> par fluorimétrie BACTEC.....	28
Figure 9 Nombre d'isolats détectés dans les flacons BACTEC selon les micro organismes et selon l'atmosphère respiratoire du flacon ensemencé .....	32
Figure 10 Broyage mécanique d'un prélèvement ou d'un matériel étranger.....	41
Figure 11 Exemple de galerie API.....	44
Figure 12 Principe d'ionisation par la technique MALDI.....	45
Figure 13 Technique Time Of Flight .....	46
Figure 14 Fonctionnement de la technologie Maldi-Tof.....	46
Figure 15 : Arbre décisionnel thérapeutique proposé par la SPILF dans le cadre des spondylodiscites primitives (2007) .....	54
Figure 16 : Graphiques montrant l'influence de divers antibiotiques dans la survie intracellulaire et l'émergence de SCV de <i>S. aureus</i> .....	56

**TABLE DES ABREVIATIONS**

AAF	Aéro-Anaérobie Facultatif
BLSE	Bêta-Lactamase Spectre Elargi
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CMI	Concentration Minimale d'Inhibition
CRIOGO	Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
HAS	Haute Autorité de Santé
IDSA	Infectious Diseases Society of America
IOA	Infections Ostéo- Articulaires
IOAP	Infections Ostéo-Articulaires sur Prothèse
IV	Intra-Veineuse (voie)
LAR	Liquide articulaire
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation- Time Of Flight
POA	Ponction Ostéo-Articulaire
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSI	Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
REMIC	Référentiel en microbiologie médicale
SARM	S. aureus Résistants à la Méthicilline
SCV	Small Colony Variants
SPILF	Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française
SPS	Polyanéthol Sulfonate de Sodium
UFC	Unités Formant Colonie

## INTRODUCTION

Infections d'un os ou d'une articulation par un ou plusieurs microorganismes bactériens ou fongiques, les Infections Ostéo-Articulaires, bien que relativement rares, sont des pathologies graves, fréquemment récidivantes, dont l'éradication est difficile et la prise en charge complexe. Occasionnant des incapacités fonctionnelles temporaires, voire engageant le pronostic vital du patient, l'optimisation de la détection et de l'identification des germes responsables est un enjeu de santé publique important.

Les centres de référence de ces infections, dont fait partie le CRIOGO, ont une mission spéciale d'expertise, de recherche clinique, d'amélioration de la filière de soins, de coordination pluridisciplinaire et de prise en charge des infections simples ou complexes.

D'années en années les techniques d'identification bactériennes et les milieux de culture utilisés ont évolué. On a ainsi vu apparaître des milieux liquides enrichis : les flacons à hémocultures. Propices à la croissance des bactéries anaérobies, des germes poussant lentement et difficilement sur les milieux solides conventionnels, et des Small Colony Variants, ainsi qu'à la croissance de bactéries présentant un faible inoculum dans l'échantillon, les milieux liquides ont vu leur utilisation se démocratiser et leur efficacité être relayée dans de nombreuses publications.

L'intérêt d'ensemencer un jeu de deux flacons (aérobie et anaérobie) avec les prélèvements de liquides synoviaux ou de broyat d'os, pour diagnostiquer des infections ostéo-articulaires natives ou sur matériel, n'a néanmoins jamais été démontré, nous allons donc nous y attacher. Nous avons pour cela procédé à une étude recensant près de 500 isolats de ponctions ostéo-articulaires et de liquides synoviaux chez des patients du CHU de Rennes. Cette étude compare l'intérêt de l'ensemencement des milieux liquides enrichis et des milieux gélosés conventionnels, en termes de taux et de délai de détection des différentes étiologies bactériennes impliquées dans ces infections, dans une optique d'optimisation et de précocité du diagnostic.

## 1. Rappels bibliographiques

### 1.1. Infections ostéo-articulaires

#### 1.1.1. Définition et classification des infections ostéo-articulaires (IOA)

Il n'existe pas de définition universellement acceptée des infections ostéo-articulaires, de la même manière qu'il n'existe pas de système de classification universel de ces pathologies. Ceci est dû à la multiplicité des aspects que peuvent revêtir ces pathologies, et à la diversité des critères que l'on choisit d'utiliser pour les classer.

On retiendra néanmoins la définition du CRIOGO :

« Une infection ostéo-articulaire est une infection qui touche un os, une articulation ou une prothèse ostéo-articulaire. Son éradication est difficile. Elle nécessite le plus souvent un traitement antibiotique prolongé et/ou un traitement chirurgical.»(1)

Parmi tous les facteurs de classification possibles des IOA, nous en citerons cinq : la pathogénèse, la durée, la localisation, la présence ou non de matériel, l'origine de l'infection.

##### 1.1.1.1. Classification selon la pathogénèse :

On retrouve dans la littérature une classification des IOA, dont la SPILF(2) s'est, entre autres, fait l'écho :

- les ostéomyélites qui sont des infections osseuses hématogènes
- les ostéites qui regroupent les infections osseuses aiguës ou chroniques, post-traumatiques et post-opératoires, d'expression précoce ou tardive, la contamination hématogène est rare.
- les ostéo-arthrites qui sont des inflammations articulaires septiques associées à une atteinte osseuse sous-jacente.
- Les arthrites qui sont des inflammations des articulations
- Les spondylodiscites qui sont des infections d'un disque intervertébral et des corps vertébraux adjacents, ce sont des infections hématogènes, plus rarement post-opératoires, elles touchent surtout les adultes après 50 ans.
- Le « pied du diabétique » que nous ne traiterons pas dans notre étude.

##### 1.1.1.2. Classification selon la durée de l'infection :



La durée de l'infection est une donnée cruciale car elle conditionne la prise en charge de la pathologie. Les infections ostéo-articulaires aiguës sont généralement traitées par antibiotiques uniquement, tandis que les infections chroniques donnent lieu à une prise en charge médicale mais aussi chirurgicale pour laquelle on prend davantage le temps d'argumenter le diagnostic d'infection osseuse et d'isoler l'agent infectieux.

Il n'y a pas de limite de temps absolue pour distinguer une infection aiguë d'une infection chronique mais les scientifiques se sont accordés sur un délai d'un mois : au-delà l'infection est considérée comme chronique.(3)

#### **1.1.1.3. Classification selon la localisation :**

Une infection ostéo-articulaire peut toucher diverses zones :

- Les os longs (fémur, humérus, radius...)
- La colonne vertébrale
- Les os péri-articulaires
- Des sites inhabituels tels que la clavicule, le sternum, le pubis, la mandibule.

#### **1.1.1.4. Classification selon la présence ou non de matériel :**

On distingue ici quatre catégories :

- Absence de matériel
- Patient ayant une prothèse (infection ostéo-articulaire sur prothèse : IOAP)
- Patient ayant du matériel d'ostéosynthèse interne (apposé à l'os : plaque, centromédullaire : clou...) ou externe (fixateurs).
- Patient ayant des substituts osseux et des allogreffes.

Au sein de ces catégories on différencie les infections précoces (se développant dans les quatre semaines suivant la mise en place du matériel), retardées (2 à 6 mois de délai), tardives (plus de 6 mois de délai).(2)

#### **1.1.1.5. Classification selon l'origine de l'infection :**

L'infection peut débuter selon différentes modalités :

- Inoculation directe : iatrogène lors d'un geste médical (ponction ou infiltration), iatrogène lors d'une chirurgie, ou bien consécutive à un traumatisme (lors d'une fracture ouverte par exemple).

- Inoculation hémotogène au cours d'une bactériémie symptomatique ou non. Généralement la porte d'entrée de la bactérie est difficile à retrouver.
- Inoculation contigüe à partir d'un foyer septique dont la porte d'entrée est une plaie chronique (pied du diabétique par exemple).

#### **1.1.1.6. Autres classifications :**

De nombreux scientifiques se sont penchés sur la question des infections ostéo-articulaires et se sont essayés à une classification, en voici deux exemples :

- La classification de COVENTRY (4)

Cette classification ne tient compte que des infections post-opératoires et distingue trois phases :

Type 1 : infection aiguë et précoce, en période post opératoire immédiate (moins de 4 semaines après l'intervention).

Type 2 : infection chronique et plus tardive, la prothèse est douloureuse.

Type 3 : infection aiguë et tardive, son inoculation s'est faite par voie hémotogène, la prothèse est le plus souvent asymptomatique.

- La classification de ZIMMERLI(5)

Elle ressemble à la classification de Coventry mais a comme inconvénient de ne pas tenir compte du caractère aigu ou chronique de l'infection sur prothèse.

Stade 1 : précoce (dans les 3 mois)

Stade 2 : retardée (dans les 3 à 24 mois)

Stade 3 : tardive (plus d'un an après).

#### **1.1.2. Prévalence et facteurs de risques des IOA :**

D'après les données du PMSI(6) de 2013, 37 252 séjours hospitaliers répondaient à la définition de cas d'IOA d'adultes (à partir de 15 ans) soit plus qu'en 2008 (à l'époque, cela représentait 28 453 séjours hospitaliers sur 16 millions). Les IOA sur matériel voient leur proportion évoluer (1/3 des cas en 2008 et 62% en 2013). Parmi ces IOA on retrouve plus fréquemment des arthrites, ostéomyélites et spondylodiscites. En 2013 la prévalence globale est de 70 pour 100 000 (alors qu'elle était de 54,6 en 2008), elle est plus élevée chez les hommes (90) et augmente avec l'âge (elle passe à 209/100 000 après 70 ans).

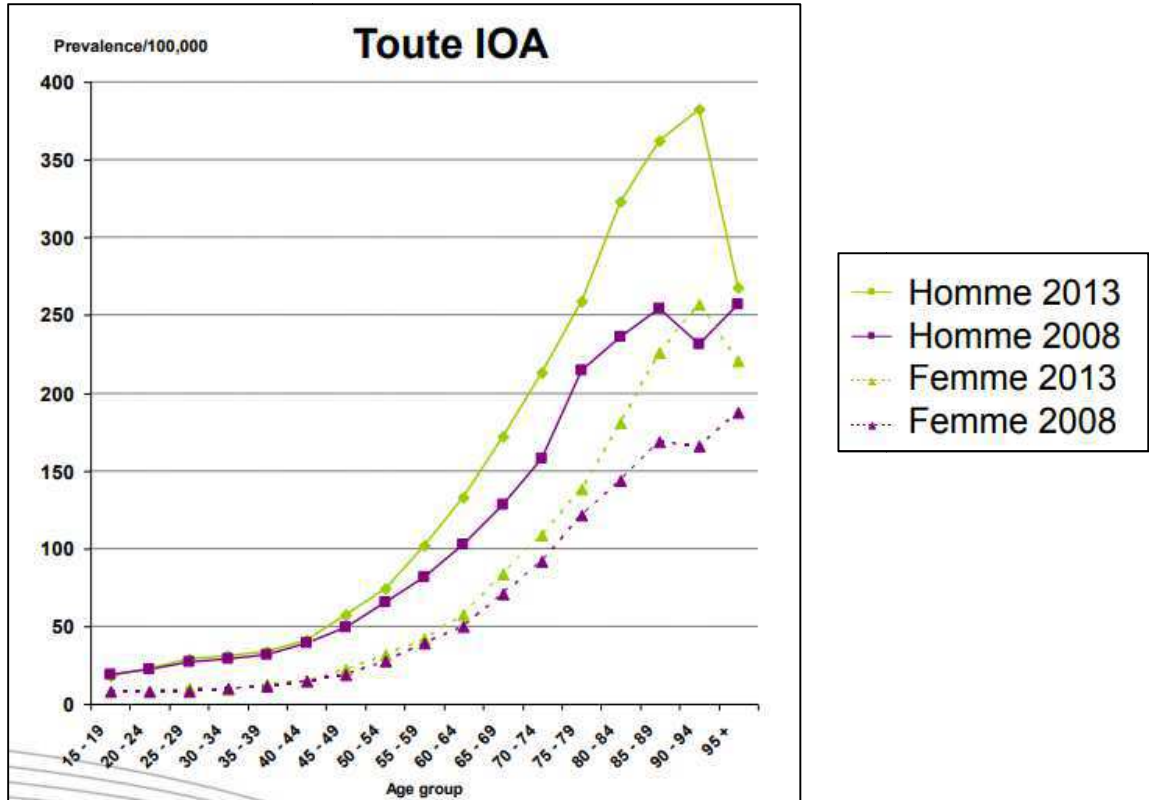


Figure 1 Prévalence des infections ostéo-articulaires selon l'âge et le sexe des patients en 2008 et en 2013(6)

Près de 50% des patients cessent de travailler à la suite d'une infection prothétique profonde. Pour l'autre moitié l'arrêt de travail est en moyenne de 2 ans. C'est pourquoi le ministère en charge de la Santé a décidé en janvier 2008, d'établir des structures dédiées, permettant de prendre en charge au mieux les patients atteints d'IOA. Ces infections ostéo-articulaires sont donc des pathologies graves, qui mettent en jeu le pronostic fonctionnel (perte de mobilité articulaire) voire le pronostic vital s'il y a bactériémie suite à la dissémination hémotogène des microorganismes infectieux.

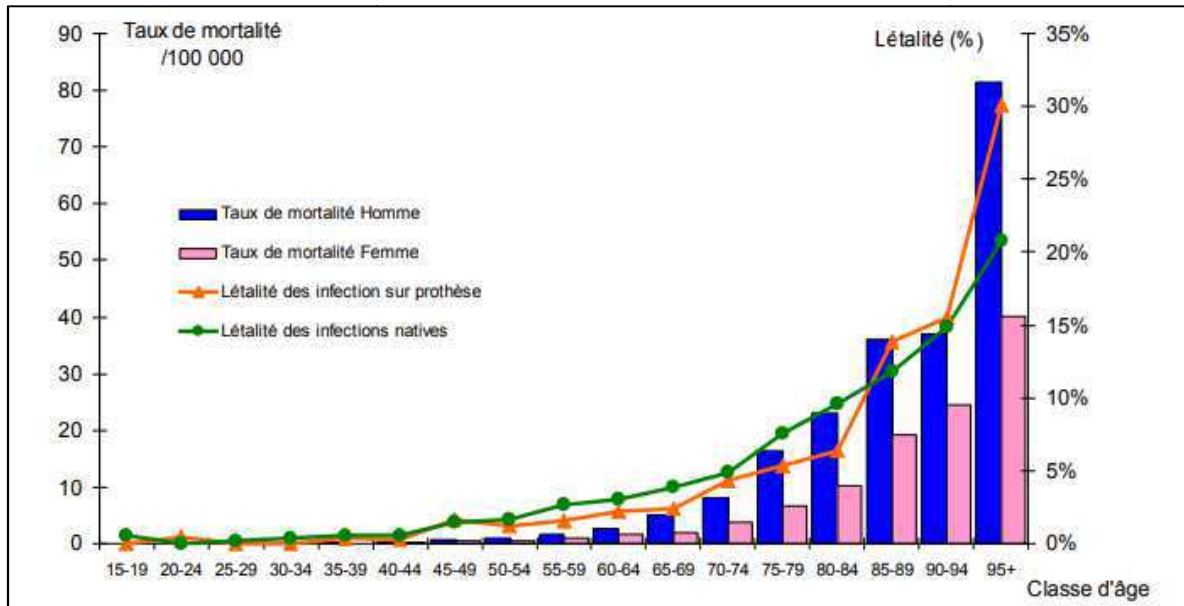


Figure 2 Taux de mortalité et de létalité des IOA selon le sexe, l'âge et la présence ou non de matériel chez les patients hospitalisés en France en 2008(7)

Certains facteurs de risques incombent à l'hôte et sont reconnus. Nous pouvons citer l'âge (le risque infectieux augmente rapidement avec l'âge et atteint un pic à 75 ans) mais aussi le sexe (la prévalence masculine est plus importante).

Les comorbidités jouent aussi un rôle non négligeable : dans l'étude réalisée par le PMSI en 2008, 47% des patients atteints d'infections ostéo-articulaires avaient au moins une comorbidité, en 2013 ils sont 70%. Le diabète est la comorbidité la plus fréquemment retrouvée (dans plus de 15% des IOA chez les hommes et près de 8% chez les femmes). En effet, le diabète est un facteur de difficulté de cicatrisation qui expose directement à l'Infection du Site Opératoire surtout lorsqu'existent une artériopathie et/ou une neuropathie associée(s). Viennent ensuite les ulcères, les affections de prothèses valvulaires, l'obésité, les cancers, l'immunosuppression...

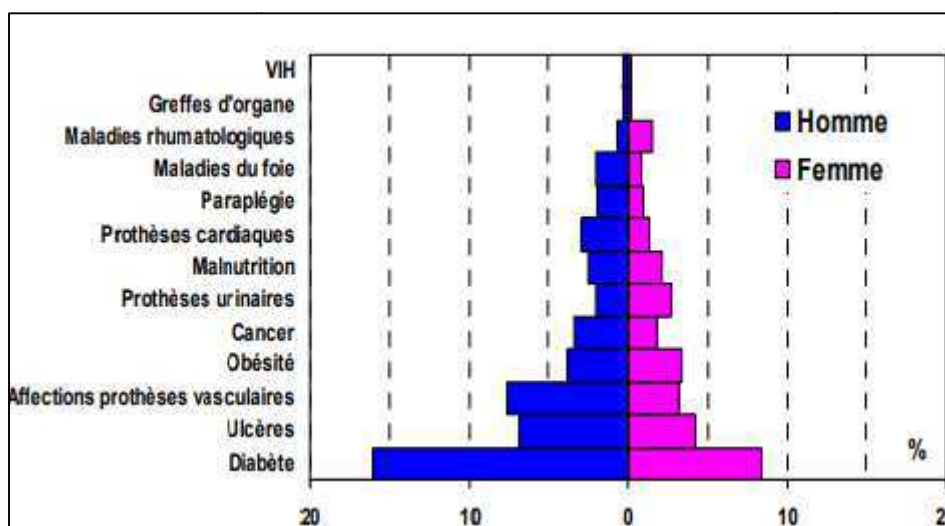


Figure 3 Graphique exposant les co-morbidités les plus fréquentes des IOA selon le sexe des patients(7)

D'autres facteurs de risques propres au patient sont plus discutés : l'existence d'un autre foyer infectieux (urinaire, dentaire..), le tabagisme, la présence d'escarre à proximité du site... On connaît aussi des facteurs de risque dépendants du geste : l'inoculation per-opératoire, la multiplicité des reprises, la présence d'un hématome post-opératoire, une cicatrice difficile, une absence d'antibioprophylaxie...

### 1.1.3. Critères de complexité :

La frontière entre infection simple et complexe n'est pas évidente.

D'après le CRIOGO(1), le terme d'infection ostéo-articulaire « complexe » recouvre essentiellement les infections sur matériel (prothèse et ostéosynthèse) et les infections post-traumatiques pour lesquelles il y a déjà un échec de prise en charge initiale médico-chirurgicale ayant entraîné une excision chirurgicale et une antibiothérapie.

Outre ces cas-là, sont dites complexes les situations chirurgicales qui nécessitent des gestes majeurs d'excision, de couverture, de reconstruction osseuse ou prothétique telles que :

- Une pseudoarthrose infectée avec perte de substance nécessitant une reconstruction osseuse ou des parties molles
- Une ostéite sur os continu nécessitant une large excision osseuse et une reconstruction de l'os ou des parties molles.
- Une infection sur prothèse articulaire nécessitant une reconstruction complexe.
- Une ostéoarthrite des grosses articulations avec des signes radiologiques d'atteinte osseuse.

- Une infection rachidienne avec ou sans matériel, qui nécessite une reconstruction osseuse.

La présence de matériel (ostéosynthèse, prothèse) complique l'attitude thérapeutique pour deux raisons. D'une part les bactéries peuvent adhérer entre elles pour constituer un biofilm sur une surface inerte, cela crée un « bouclier » résistant aux anticorps, phagocytes mais aussi antibiotiques qui ne peuvent se diffuser correctement. D'autre part les bactéries impliquées, qui sont en phase de croissance lente, sont moins sensibles aux antibiotiques.

On considère généralement que les infections osseuses ou articulaires aiguës sans matériel, les infections des parties molles, l'ostéomyélite aiguë de l'enfant et l'adolescent, l'arthrite aiguë et l'infection post-opératoire précoce ne sont pas complexes.

La présence de critères de complexité peut néanmoins changer la donne :

- Une microbiologie complexe : quand l'infection est due à un micro organisme particulier qui nécessite une prise en charge antibiotique compliquée ou que le patient est allergique à certains antibiotiques, limitant ainsi les possibilités thérapeutiques.
- Un terrain complexe : Le patient présente une défaillance viscérale suffisamment sévère (telle qu'une immunodépression, une insuffisance rénale ou hépatique par exemple) pour interférer avec le programme thérapeutique ou qui s'associe à un retentissement général chronique.

La prise en charge est elle-même complexe et fait intervenir de nombreux professionnels de santé : chirurgien, bactériologiste, infectiologue, spécialiste de l'imagerie médicale, anesthésiste, rééducateur fonctionnel, rhumatologue, pharmacologue.

#### **1.1.4. Indications des prélèvements ostéo-articulaires :**

Les prélèvements ostéo-articulaires (liquide articulaire, biopsies osseuses...) sont des marqueurs d'une éventuelle inflammation et ont également un rôle étiologique. Le diagnostic bactériologique repose sur les prélèvements ostéo-articulaires qui doivent être de qualité pour être exploitables :

- Prélèvement unique en cas d'arthrite (liquide articulaire)
- Prélèvements multiples en cas d'ostéite, ostéomyélite, spondylodiscite (biopsies osseuses, prélèvements osseux per-opératoires).

#### **1.1.5. Physiopathologie :**

##### **1.1.5.1. Physiologie du tissu osseux :**

Le tissu osseux est en constant renouvellement, et ce grâce à l'action couplée dans le temps et dans l'espace de deux types cellulaires : les ostéoclastes et les ostéoblastes.

Les ostéoclastes, d'origine mésoblastique, résorbent l'os ancien. En revanche, les ostéoblastes, d'origine mésenchymateuse, sécrètent une matrice ostéoïde protéique qui se reminéralisera par la suite. Les ostéoblastes régulent la maturation et l'activation des ostéoclastes par le biais de facteurs locaux (RANK-L/OPG, TGF- $\beta$ , BMPs, IGFs, prostaglandines...) sur lesquels nous ne nous étendrons pas.

Le remodelage osseux est le fruit de l'équilibre entre synthèse et résorption osseuse. Il a trois grandes fonctions dans l'organisme : réguler l'équilibre minéral (en assurant l'homéostasie phospho-calcique), adapter le squelette à son environnement mécanique (et diminuer ainsi le risque de fracture), et enfin renouveler le tissu osseux et réparer les dommages créés par les contraintes cycliques.

### **1.1.5.2. Réponse inflammatoire**

Lors de l'inflammation, l'équilibre entre activité ostéoblastique et ostéoclastique est rompu, engendrant une résorption osseuse. La réaction inflammatoire intrinsèque à l'infection, va causer des lésions engageant le pronostic fonctionnel. Au niveau de l'articulation on risque une destruction de la synoviale puis du cartilage (chondrolyse) et au niveau de l'os une ostéolyse et la formation de séquestres osseux, l'infection peut même se chroniciser. En cas de présence matériel, l'inflammation se localise généralement au niveau de l'interface entre l'os et le matériel.

### **1.1.5.3. Mécanismes bactériens de persistance et chronicisation**

Les bactéries ont plusieurs manières de coloniser de façon pérenne les tissus et de rendre l'infection ostéo-articulaire chronique : le biofilm qui se forme sur le matériel implanté, la persistance intracellulaire et les « Small Colony Variants » (SCV).

#### **1.1.5.3.1. Le biofilm**

Le biofilm est une communauté complexe de microorganismes adhérant généralement à un matériel d'ostéosynthèse ou une prothèse grâce à la sécrétion d'une matrice polysaccharidique adhésive et protectrice appelée « slime ». Ce « slime », indissociable du matériel, est constitué en galeries, dans lesquelles sont enchâssées des bactéries, se protégeant ainsi du système immunitaire (phagocytes), des antibiotiques, des contraintes mécaniques (lavage). Il favorise l'agrégation et les échanges entre bactéries, l'adhérence au matériel et la dormance (un ralentissement du métabolisme bactérien : les bactéries au sein du biofilm sont en phase de croissance lente et sont moins sensibles aux antibiotiques). Le biofilm protège aussi les bactéries des agressions (déshydratation, toxiques...).

Le biofilm une fois mature, relargue continuellement des bactéries planctoniques, des micro colonies et des fragments de biofilm.(8)

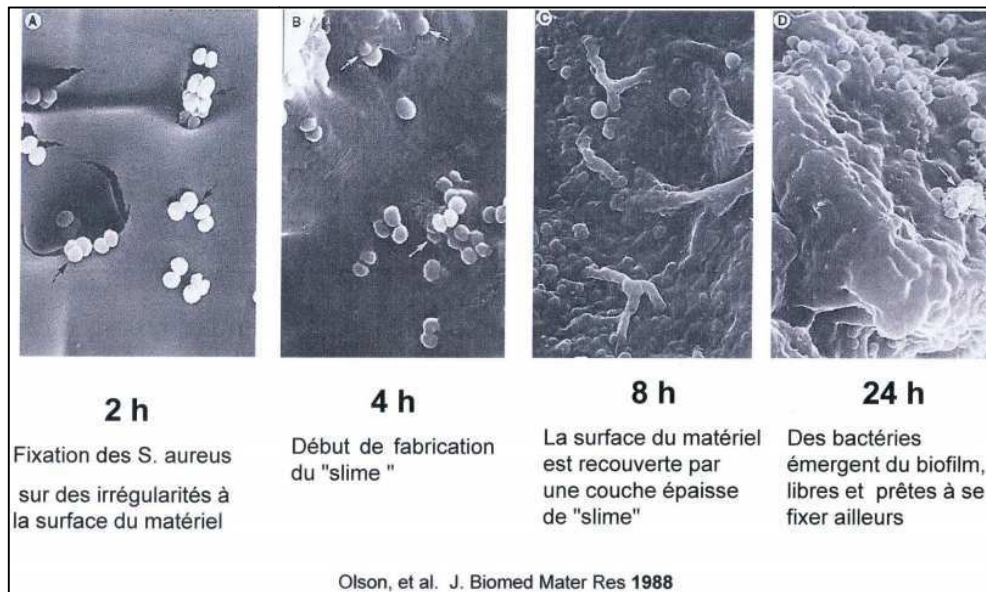


Figure 4 Photos de microscopie électronique à balayage mettant en évidence la formation et l'évolution du biofilm composé par *S. epidermidis* à la surface de polymère adhésif en cyanoacrylate au cours du temps(9)

On distingue deux types de bactéries. Les bactéries planctoniques sont les microorganismes les plus fréquemment isolés, ils flottent librement et sont éliminés par les mécanismes de défenses naturels (anticorps, phagocytes) et sont facilement accessibles aux antibiotiques. En revanche, les bactéries dites « sessiles » (eu égard à leur grande adhérence sur une surface inerte et entre elles), sont « tolérantes » aux antibiotiques. La tolérance aux antibiotiques n'est pas synonyme de résistance bien qu'elle l'augmente. Les bactéries sessiles ont plusieurs mécanismes de tolérance(10–12) : l'architecture du biofilm qui est une barrière physique à la pénétration, les enzymes matricielles qui adsorbent les antibiotiques, les gènes de résistance spécifiques présents chez certaines bactéries. Les bactéries sessiles se différencient en modifiant leur schéma d'expression génétique de manière à favoriser leur survie, c'est le fruit d'une communication entre elles appelé « quorum sensing ».

#### 1.1.5.3.2. Les Small Colony Variants

Les SCV sont des colonies bactériennes dont le comportement est modifié, du point de vue phénotypique (petite taille...), métabolique (absence de production d'ATP), biochimique (caractères biochimiques inhabituels et faibles besoins nutritionnels) et qui expriment peu de facteurs de virulence et ayant un phénotype réversible. Ces SCV ont été décrits pour de nombreuses espèces bactériennes (dont *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes*) et poussent seules ou



avec des colonies classiques.

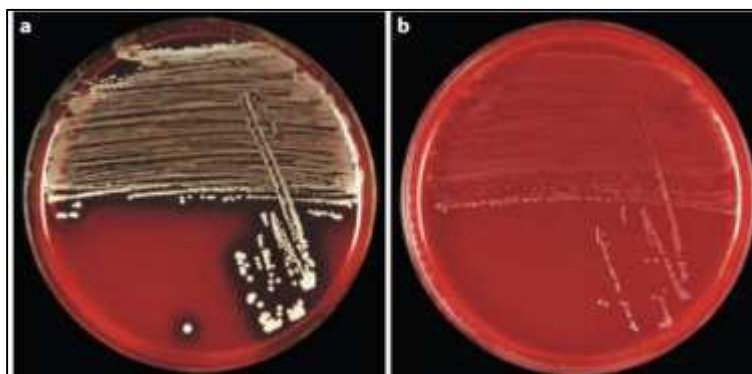


Figure 5 Aspect de colonies de *S. aureus* sur gélose au sang(13)  
(a- Phénotype sauvage b- Phénotype SCV)

On les retrouve dans 1 à 30% des échantillons cliniques selon les études mais leur incidence est sous-estimée en raison de leur croissance difficile à mettre en évidence. Ces microcolonies se distinguent du reste de la flore microbienne par leur croissance lente et leur culture retardée en raison des perturbations subies par leur ATP. En effet, afin de s'adapter à la pression de sélection spécifique de l'infection chronique (stress environnemental, baisse des ressources, traitement antibiotique...), le génome bactérien se transforme par l'apparition de variants génétiques, donnant naissance à un nouveau phénotype adapté à la survie au sein du biofilm et à la persistance intracellulaire prolongée. Ces SCV perdent donc leurs caractères distinctifs : pigmentation (c'est le cas des microcolonies de *Staphylococcus aureus* qui sont blanches et non dorées), capacité d'hémolyse, coagulase, DNase, caractères biochimiques, etc.

Ces microcolonies ont plusieurs particularités notamment leur capacité d'adhérence importante, leur temps de génération décuplé, mais aussi leur persistance dans des niches cellulaires protectrices (dont les ostéoblastes) et leur action inhibitrice de l'activité bactéricide d'un certain nombre d'antibiotiques. Ces particularités font, des SCV, des facteurs d'échec thérapeutique et d'infections chroniques et récidivantes. En effet, ces sous-populations bactériennes ont tendance à persister malgré un traitement antibiotique bien conduit et particulièrement dans les IOAP.

Pour les microbiologistes, le diagnostic des SCV est loin d'être aisé : en effet leur morphologie atypique, leurs conditions de croissance fastidieuses, et la présence d'une population mixte avec des bactéries de phénotype sauvage qui masquent les SCV, compliquent leur dépistage et leur identification.

Il apparaît donc indispensable de procéder à un examen approfondi des milieux gélosés après leur incubation prolongée, et de réaliser un antibiogramme sur toutes les morphologies détectées pour détecter les éventuelles SCV et idéalement, de procéder à une

identification par PCR 16S(14,15) ou MADI-TOF(16).

### 1.1.5.3.3. La persistance intracellulaire

Certaines espèces bactériennes (dont le *S. aureus*) peuvent être internalisées par les cellules non phagocytaires, dont les ostéoblastes, et persister à l'intérieur de ceux-ci, constituant ainsi un réservoir bactérien latent qui échappe à la réponse immunitaire et aux antibiotiques. Les capacités d'invasion et de survie intracellulaire dépendent des espèces et des souches. Cette persistance intracellulaire est un facteur de récurrence et de chronicité des infections ostéo-articulaires.(17)

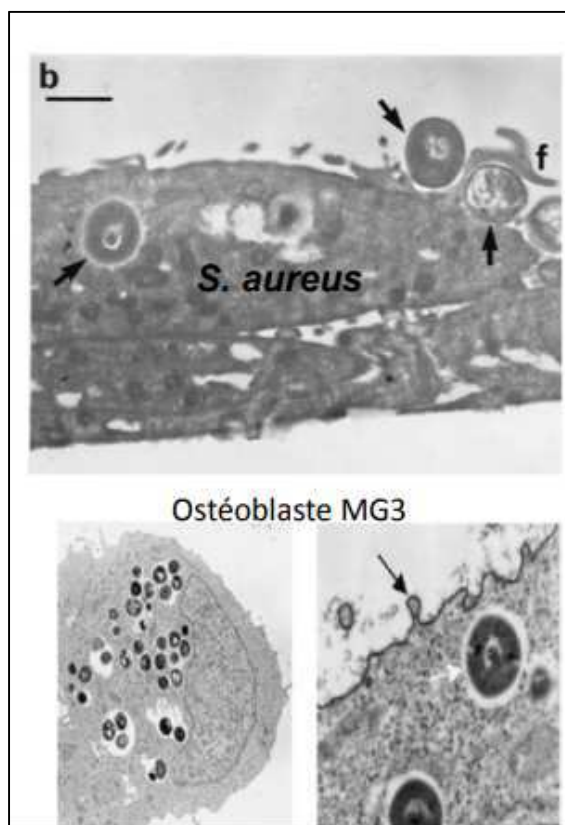


Figure 6 Processus d'internalisation de *S. aureus* dans un ostéoblaste, en microscopie électronique à balayage(17)

## 1.2. Généralités sur les hémocultures

### 1.2.1. Définition

L'hémoculture est un prélèvement aseptique de sang, en vue d'un ensemencement sur divers milieux de culture.

Chez un individu sain le sang est stérile mais en cas de bactériémie ou de septicémie, les bactéries pathogènes peuvent se propager dans l'organisme par la voie sanguine. L'hémoculture va donc permettre de confirmer ou d'infirmer la suspicion clinique.

Cet examen peut donc être utile en cas d'IOA, surtout lors d'arthrite aiguë ou lors de tout examen invasif susceptible de mobiliser des bactéries vers la voie sanguine.(18)

### 1.2.2. Historique

La technique de l'hémoculture est née au milieu du XIXe siècle, et a vu sa pratique se développer en grande partie grâce aux travaux de Koch et Pasteur.

En 1850, DAVAINÉ, un médecin français observe au microscope, du sang de mouton mort du « charbon », maladie répandue parmi le bétail et les moutons. Il constate la présence de bâtonnets dans le sang : ceux qu'on appellera plus tard « bacilles ».

Dix ans plus tard, un autre chercheur, DELAFOND, décide de mettre en culture du sang, en dehors d'un organisme vivant. Pour ce faire, il prélève le sang de moutons malades et de moutons morts du « charbon », et le dépose à l'air libre dans de petits flacons en verre. Bien qu'aucun milieu nutritif n'ait été ajouté, il constate qu'après 4 jours de culture les bâtonnets ont grandi et grossi. Ce sont les prémices de l'hémoculture.

En 1863, DAVAINÉ et PASTEUR déclarent que ces bâtonnets, baptisés « bactéries » sont responsables de la maladie du « charbon » qui décime les moutons et le bétail. Dès lors, les recherches et la pratique de l'hémoculture se développent : PASTEUR met en évidence la virulence de la bactérie cultivée en dehors de l'organisme, la stérilité du sang chez l'individu sain, mais aussi le problème de la contamination extérieure et donc la nécessité de travailler en conditions aseptiques.

Dans le même temps, KOCH, un microbiologiste allemand est le premier à réussir en 1876, la culture du bacille du charbon découvert 25 ans auparavant. Il est aussi responsable de la découverte de la bactérie responsable de la tuberculose, pour laquelle il recevra le prix Nobel de médecine et physiologie en 1905.

PASTEUR étudie également les principaux facteurs de stérilité : le choix du milieu de culture, de l'atmosphère (en effet certaines espèces bactériennes ne peuvent pousser qu'en l'absence d'oxygène), du volume prélevé...

ROSEMBACH en 1884 est l'un des premiers à avoir obtenu une hémoculture positive au cours de l'évolution de la maladie.

DOLERIS, un obstétricien hospitalier français, démocratisera la pratique de l'hémoculture en la systématisant dans son service dans le cadre de ses travaux sur la fièvre puerpérale.

Au cours du vingtième siècle, à la faveur de l'utilisation croissante de la méthode d'hémoculture, les systèmes de détection de la croissance bactérienne se sont considérablement améliorés : en 1915 la détection se faisait par observation macroscopique une ou deux fois par jour tandis que depuis les années 90 ce sont des systèmes de détection continue, basés sur une détection de CO<sub>2</sub> ou sur des techniques de fluorimétrie.

### 1.2.3. Indication et objectifs

L'hémoculture a deux objectifs principaux : diagnostique et thérapeutique.

Dans un premier temps elle aide à poser le diagnostic : devant toute fièvre inexplicquée, surtout si elle est accompagnée de signes cliniques évocateurs d'une infection (gonflement,

suppuration...), la réalisation d'hémocultures est obligatoire. Selon ARONSON(19) en milieu hospitalier la probabilité d'obtenir une hémoculture positive est de 5% si le critère de prescription est une fièvre isolée. Ce taux passe à 22% chez un patient neutropénique fébrile et à 60% chez un toxicomane (qui se drogue par voie intraveineuse).

Ensuite, l'hémoculture permettra de choisir une thérapeutique adaptée: une fois la souche bactérienne identifiée, on étudie sa sensibilité aux antibiotiques par le biais d'un antibiogramme, afin d'optimiser la thérapie instaurée par le clinicien.

D'après les recommandations officielles, on pratique une hémoculture sur prescription médicale de préférence avant tout traitement antibiotique en cas de :

- Sepsis sans point d'appel clinique d'apparition brutale accompagné de frissons et/ou d'une hyperthermie (Température corporelle supérieure à 38,5°C) et/ou d'une hypothermie (Température inférieure à 36,5°C) surtout après un acte chirurgical ou instrumental, en cas de cathéter périphérique ou central, de valvulopathie, de toxicomanie, d'immunodépression.
- Sepsis avec point d'appel clinique (méningite, endocardite, pyélonéphrite...)
- Fièvre persistante inexplicite
- Choc inexplicite
- Souffrance néonatale

L'apyrexie ne doit pas être un frein à la réalisation d'une hémoculture quand on suspecte un sepsis. Certains patients (personnes âgées, immunodéprimées...) sont plus fragiles devant une infection et doivent être pris en charge immédiatement.

### **1.3. Intérêt du bouillon des flacons à hémoculture pour l'enrichissement**

Cette technologie, qui fait intervenir des automates d'incubation et de lecture bactériologique et des flacons contenant un bouillon enrichi, est destinée à accroître la sensibilité des analyses et à réduire le délai de rendu des résultats. Plus ce délai sera court, plus le diagnostic et le traitement du patient seront précoces, réduisant ainsi le risque de rechute, de complications, de chronicisation de l'infection.... Ces flacons, destinés au départ à diagnostiquer des bactériémies et endocardites, sont aujourd'hui largement utilisés pour enrichir de nombreuses autres matrices biologiques, dont les POA.

#### **1.3.1. Principe de fonctionnement du BACTEC**

Les automates BACTEC® ont initialement été proposés pour l'analyse bactériologique de prélèvements sanguins (hémocultures) eu égard à la rapidité et à la sensibilité de cette technique associée à une lecture quasi continue. L'automate BACTEC FX (Becton Dickinson) est un système de détection bactérienne automatisé qui mesure le CO<sub>2</sub> par fluorimétrie, contrairement au Bact/Alert (bioMérieux) qui s'appuie sur la réflectométrie.

S'il fallait résumer la réflectométrie en quelques mots : le  $\text{CO}_2$  dégagé par les bactéries entraîne une diminution du pH. Cette modification de pH sera détectée par un sensor fixé au fond du flacon, une LED éclairera le détecteur et c'est la lumière réfléchiée qui sera mesurée par un photo-détecteur, d'où le terme de « réflectométrie ». Le principe de fonctionnement du BACTEC, bien que s'appuyant aussi sur la détection de la quantité de  $\text{CO}_2$  libéré, est différent car il fait appel à la fluorimétrie.

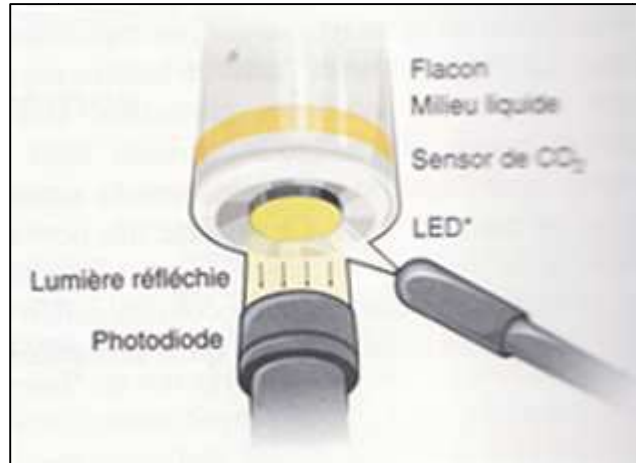


Figure 7 Détection du  $\text{CO}_2$  par réflectométrie BACT/ALERT(20)

Concernant le BACTEC, automate qui détecte le  $\text{CO}_2$ , et donc la croissance bactérienne, par fluorimétrie, il utilise lui aussi un sensor couplé à une membrane semi-perméable. Le  $\text{CO}_2$  généré par les micro organismes de l'échantillon, entraîne la réduction d'un sel de ruthénium présent dans le sensor, qui va donc émettre une fluorescence mesurée par une photodiode toutes les 10 minutes.

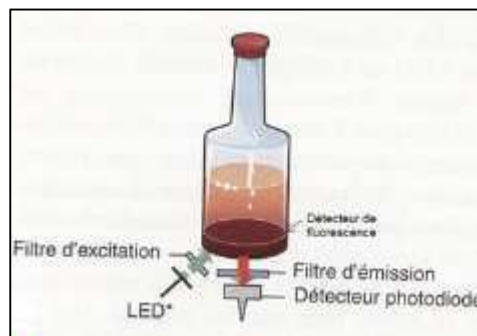


Figure 8 Détection du  $\text{CO}_2$  par fluorimétrie BACTEC(20)

On ensemence les flacons, contenant le bouillon de culture enrichi, avec les prélèvements (liquide articulaire ou broyat de POA), on les place dans le BACTEC FX pour être incubés à  $37^\circ\text{C}$ , agités continuellement et lus de manière continue durant au moins 10 jours .

Les micro-organismes présents dans les prélèvements métabolisent les nutriments du bouillon de culture, consomment l' $\text{O}_2$  et dégagent du  $\text{CO}_2$ . L'augmentation de  $\text{CO}_2$

résultant de la croissance microbienne est détectée par un sensor car elle réduit le sel de ruthénium inclus dans le sensor, une fluorescence est alors émise. La fluorescence est proportionnelle à la quantité de CO<sub>2</sub> libéré, elle est mesurée toutes les dix minutes par une photodiode.

Une lecture positive témoigne de la présence de micro organismes dans le flacon. On procèdera ensuite à des subcultures à partir de flacons détectés positifs, pour identifier les bactéries et instaurer le traitement antibiotique adéquat le plus rapidement possible.

### **1.3.2. Des conditions de culture optimales**

L'automate BACTEC fonctionne avec des flacons BD BACTEC Plus Aerobic/F et Plus Anaerobic/F. Ces flacons reçus prêts à l'emploi ne demandent ni reconstitution ni dilution. Ils sont à conserver à température ambiante (2 à 25°C), à l'abri de la lumière directe. Les flacons de bouillons à hémoculture permettent la croissance d'un large éventail de bactéries grâce à des conditions de culture optimales que nous allons détailler.

#### **1.3.2.1. Deux atmosphères respiratoires**

On distingue les flacons Aérobie dont l'atmosphère est enrichie en CO<sub>2</sub> afin de favoriser la croissance des espèces bactériennes aérobies (*Neisseria*, *Pseudomonas*...) et les flacons Anaérobie contenant CO<sub>2</sub> et N<sub>2</sub> pour rechercher les espèces bactériennes anaérobies. Ainsi on peut, en théorie, faire croître toutes les bactéries quelque soit leur type respiratoire (Aérobie stricte, Anaérobie stricte, Aérobie-Anaérobie Facultative) en ensemençant une paire de flacons.

#### **1.3.2.2. Des bouillons de culture enrichis**

MINASSIAN(21) en 2014 a démontré la nécessité d'ensemencer un milieu enrichi pour permettre la croissance des bactéries, et à plus forte raison en cas de faible inoculum dans l'échantillon, de bactérie(s) fastidieuse(s) et de SCV.

Le flacon Aérobie contient un bouillon de type trypticase soja (milieu conventionnel pour la croissance de microorganismes fastidieux ou non), tandis que le flacon Anaérobie contient un bouillon Wilkins-Chalgren (milieu semi-synthétique contenant de l'arginine, du pyruvate, de l'hémine, de la vitamine K1 ; ce milieu est adapté au développement de nombreux micro organismes anérobies stricts) et du chlorhydrate de cystéine permettant de réduire la teneur en oxygène de l'atmosphère du flacon.

Outre ces milieux de culture de base, les flacons contiennent également des facteurs de croissance, des anticoagulants et des résines inhibitrices d'antibiotiques.

Parmi les facteurs de croissance que l'on peut retrouver il y a la vitamine B6 (en flacon aérobie) qui favorise la croissance de certains streptocoques, les facteurs X (hémine,

dérivée de l'hémoglobine, présence dans les flacons anaérobies, qui favorise la croissance des germes anaérobies) et/ou V (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) indispensables aux *Haemophilus influenzae* et qui favorisent la croissance de bactéries plus rares telles que les *Actinobacillus*. Un supplément FOS peut également être ajouté dans les flacons pour favoriser la croissance des micro organismes fastidieux.

De nombreuses études(22) ont démontré l'importance d'utiliser un flacon d'hémoculture pour réaliser cette étape d'enrichissement d'échantillons d'os ou d'articulations.

### **1.3.2.3. Un meilleur isolement des microorganismes**

Au milieu de base sont aussi ajoutés des anticoagulants qui vont éviter la formation d'amas de fibrine pouvant gêner l'observation du bouillon et qui, en emprisonnant les bactéries dans leur réseau, constitueraient une entrave à leur isolement. Le plus fréquemment utilisé est le SPS (Polyanéthol Sulfonate de Sodium), qui, outre son action anticoagulante, est aussi inhibiteur de phagocytose, du lysozyme et de certains antibiotiques dont les aminosides.

Plusieurs études(23,24) ont montré que la présence de saponine dans les flacons BACTEC Lytic Anaérobie favorisait l'isolement des espèces infectieuses et permettait ainsi leur croissance accélérée.

### **1.3.2.4. Une inactivation des agents antimicrobiens**

Enfin, ces bouillons contiennent également des résines ou du charbon actif adsorbant les antibiotiques et antifongiques, ce qui a un intérêt indiscutable pour les patients ayant reçu une antibioprophylaxie avant le prélèvement (bien que les recommandations indiquent d'effectuer les prélèvements microbiologiques à distance de toute antibiothérapie) en limitant le nombre de faux négatifs.(25)

Une étude menée en 2013(26) montrait que le milieu BD Bactec Aé + était de 4,53 à 6,58 fois plus susceptible que les milieux conventionnels, de trouver un organisme pathogène en présence d'antibiotiques actifs.

La croissance accélérée des bactéries est due à l'agitation continue des flacons par l'automate et à la présence de résines, adsorbant les antibiotiques et antifongiques(25) dans les flacons BACTEC Plus Aerobic/F®, et de saponine(23) dans les flacons BACTEC Lytic Anaérobie qui favorise l'isolement des micro organismes(24).

### **1.3.2.5. L'inoculation de plus grands volumes d'échantillons**

Outre ces conditions de culture optimales, la possibilité d'inoculer de grands volumes d'échantillons augmente la sensibilité de la méthode : Host(27) a montré l'intérêt d'inoculer un volume d'échantillon conséquent pour observer les *K. kingae*.

Il a été démontré que les concentrations minimales requises pour une hémoculture positive au BACTEC FX étaient supérieures à  $10^7$ - $10^8$  UFC/ml pour la plupart des agents pathogènes de l'infection du sang(28). Pour les échantillons de sang les systèmes BACTEC FX ont produit 100% de signaux positifs à 30 UFC/ml alors qu'il y avait 8,1% de résultats faux négatifs à 5 UFC/ml.(29)

### **1.3.3. Une automatisation du système**

L'automatisation a amélioré les performances de l'enrichissement pour plusieurs raisons :

- diminution des délais de réponse grâce à une surveillance automatique et continue de la croissance microbienne. Chaque flacon dispose de sa propre cellule de lecture, chaque position de flacon assure ainsi une double fonction d'incubation et de mesure ;
- augmentation de la vitesse de croissance des microorganismes grâce à l'agitation automatique des flacons : l'agitation renouvelle les éléments nutritifs dans l'environnement des bactéries et augmente la concentration d'oxygène dissout dans le flacon aérobie ;
- amélioration de l'assurance qualité grâce au logiciel de gestion de données et à la connexion à l'informatique du laboratoire : les risques d'erreurs sont moindres

### **1.3.4. Une méthode qui améliore la sensibilité et la rapidité de la détection bactérienne**

Nombre d'études ont attesté de la sensibilité et de la rapidité de cette méthode de détection bactérienne. Gain(30) a testé l'efficacité et la rapidité d'une paire de flacons à hémoculture pour le diagnostic de la contamination bactérienne et fongique de milieux d'organo culture des greffons cornéens : dans 78% des cas la croissance bactérienne était détectée dans les 24h et dans les 48 premières heures dans 94% des cas. En outre, la positivité des contrôles microbiologiques par BACTEC 9240 précédait dans 10 cas sur 14 le changement d'aspect macroscopique. Donay(31) a montré que le système de microbiologie automatisé BD Phoenix était très performant notamment pour l'identification des souches bactériennes (temps médian d'identification de 3H) et pour la sensibilité aux antimicrobiens (temps médian de 10h30).

Il a été démontré que l'utilisation du bouillon d'enrichissement permettait un meilleur rendement que les cultures conventionnelles sur milieux gélosés, (supérieur de 10 à



25%) pour le dépistage des SARM(32) et donc pour le dépistage de bactéries résistantes aux antibiotiques en général.

En outre, cette méthode automatisée voit sa fiabilité et sa sensibilité augmentées par l'inoculation directe des échantillons dans les flacons d'hémoculture scellés, et ce sous hotte à flux laminaire. En effet, les flacons sont munis d'une capsule en plastique rigide, que recouvre un opercule en caoutchouc pouvant être perforé sans que leur étanchéité ne soit altérée après retrait de l'aiguille : cela limite au maximum les risques de contaminations liés aux manipulations.

Pour le diagnostic de l'infection articulaire prothétique, les méthodes automatisées de flacons d'hémoculture BACTEC™ ont une sensibilité (82,3%), une spécificité et un délai de positivité améliorés par rapport aux méthodes traditionnelles.(21,33,34)

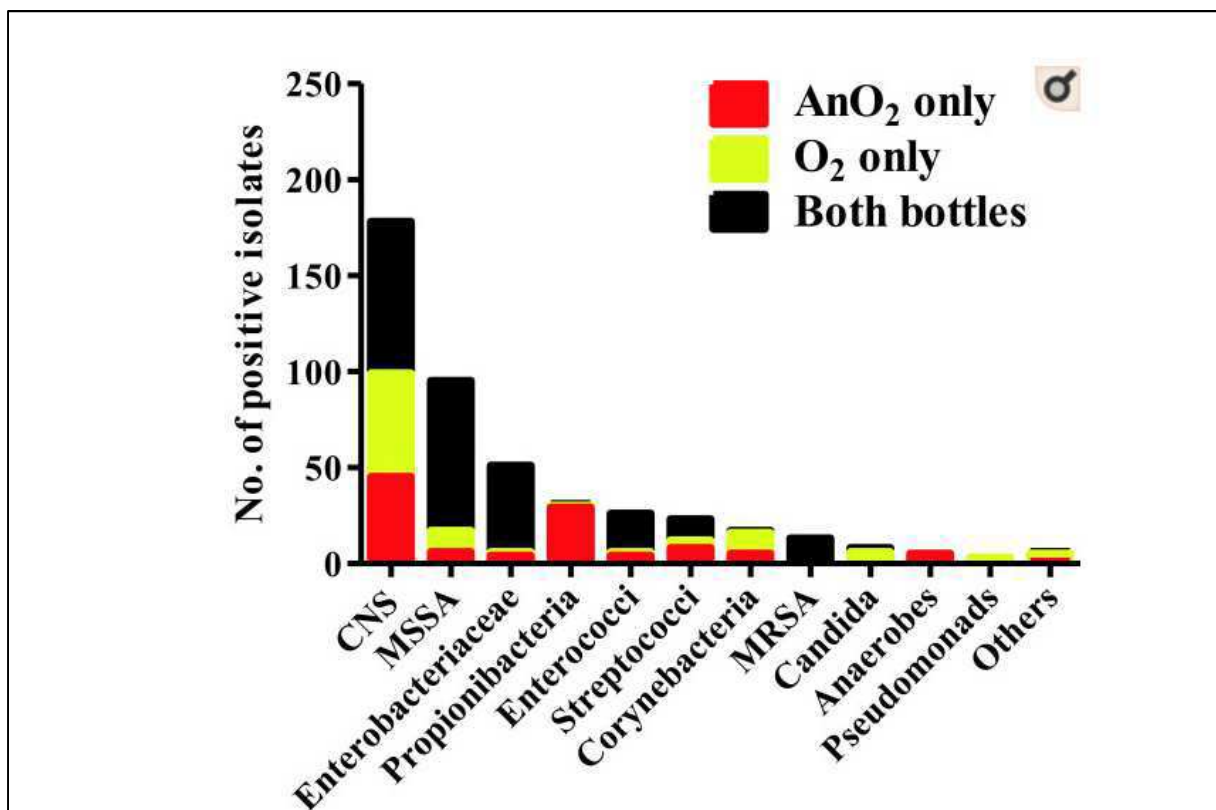


Figure 9 Nombre d'isolats détectés dans les flacons BACTEC selon les micro organismes et selon l'atmosphère respiratoire du flacon ensemencé(21)

En 2014 Minassian(21) constatait qu'une proportion significative d'échantillons seraient mal analysée si les deux flacons (Aérobie et Anaérobie) n'étaient pas ensemencés en parallèle.

C'est pourquoi les auteurs recommandent d'ensemencer un jeu de flacons par échantillon : Passerini(35) en 2014 a mis en évidence la valeur de l'inclusion des deux types de flacons pour optimiser la détection des bactéries responsables d'IOA. Patel(36) a lui aussi montré qu'avec un jeu de flacons on détectait significativement plus de pathogènes qu'avec deux flacons Aérobie.

### **1.3.5. Orientation précoce de l'antibiothérapie**

La technique d'hémoculture permettant une identification précoce des micro organismes impliqués dans l'infection (par sa sensibilité, son rendement, sa fiabilité, son délai de positivité améliorés comme nous l'avons vu plus haut), elle pourra donc guider les cliniciens pour proposer une antibiothérapie ajustée précocement, et donc un taux de survie plus élevé ainsi qu'un meilleur pronostic fonctionnel.

En effet, Chen(37) a montré lors d'une étude réalisée sur 937 épisodes de bactériémie, que plus de 25% des patients avaient reçu un traitement antimicrobien empirique inadéquat, et qu'une antibiothérapie inadéquate était associée à des taux de mortalité plus élevés.

Selon le CDC, jusqu'à 50% des antibiotiques prescrits dans les hôpitaux sont inutiles ou inappropriés, qu'il s'agisse de l'indication du traitement, du choix des antibiotiques ou de la durée du traitement.

De plus le diagnostic précoce est important : il favorise un rétablissement rapide, raccourcit la durée d'hospitalisation, réduit le risque d'effets indésirables et de résistances et cela a bien entendu un impact économique.(38)

## 1.4. Diagnostic des IOA

Le diagnostic est posé grâce à la conjonction d'arguments cliniques apportés par le médecin et le chirurgien, arguments radiologiques et enfin biologiques (grâce aux biologistes). Ces arguments permettront de suspecter l'infection mais seule la microbiologie permettra de la confirmer et d'orienter vers l'antibiothérapie la plus indiquée. Le diagnostic nécessite donc une véritable coordination entre professionnels de santé.

Les recommandations de la SPILF et de l'IDSA aident les professionnels à poser le diagnostic.

### 1.4.1. Diagnostic clinique et radiologique

Les symptômes diffèrent selon que l'infection soit aiguë ou chronique.

Dans le premier cas on peut noter de la fièvre, des douleurs, un état inflammatoire local, une désunion et/ou un écoulement au niveau de la cicatrice, une hyperleucocytose, une CRP anormalement élevée. C'est une véritable urgence thérapeutique dont le traitement doit être mis en route rapidement, une fois les prélèvements effectués.

En revanche, lors d'une infection chronique la fièvre est souvent absente, la CRP est normale, il y a peu ou pas de signes inflammatoires locaux, mais il y a des douleurs et/ou une fistulisation locale. Dans ce cas il faut confier rapidement le patient à des spécialistes afin de déterminer l'origine de l'infection.

On distingue 4 aspects cliniques orientant le diagnostic vers une IOA :

- Le syndrome septique : le patient présente de la fièvre, des frissons, une altération de l'état général voire un choc septique.
- L'incident cicatriciel : un écoulement purulent est visible, parfois une fistule, une désunion, une nécrose, une cicatrice inflammatoire persistante... cela impose une révision chirurgicale.
- Le patient se plaint de douleur, d'impotence plus ou moins bruyante et brutale : il peut s'agir d'une arthrite.
- Un dysfonctionnement de prothèse évolutif : caractérisé par une douleur chronique et un descellement évolutif.

Plusieurs techniques d'imagerie peuvent renforcer la suspicion clinique et préciser l'indication chirurgicale :(2,39)

- La radiographie osseuse : utilisée au début de la prise en charge des infections ostéo-articulaires puis en fonction de l'évolution, mais elle révèle des signes tardifs inconstants et non spécifiques (appositions périostées, géodes).

- L'échographie articulaire : met en évidence un épanchement intra-articulaire (dans le cas d'une arthrite par exemple) ou un abcès sous-périosté et permet de guider une éventuelle ponction profonde.
- L'IRM osseuse : indiquée pour les spondylodiscites et les infections osseuses chroniques, mais elle a l'inconvénient de présenter des artéfacts.
- La scintigraphie osseuse : indiquée en deuxième intention pour les spondylodiscites, et pour les infections chroniques sur matériel (pour voir s'il ya des signes d'une infection active) elle nécessite deux marqueurs (spécifique ou non d'une infection) cette technique révèle des « fixations anormales » donc elle est utile lors du diagnostic mais aussi du suivi, sa spécificité et sa sensibilité avoisinent les 90%.(40)
- La TomoDensitoMétrie et la Résonance Magnétique Nucléaire : ces deux examens, pratiqués après injection de produit de contraste (iode ou gadolinium), sont indiqués pour le diagnostic des infections osseuses chroniques, sur matériel souvent. La TDM est intéressante lors de l'étude de lésions corticales tandis que la RMN explore efficacement les anomalies médullaires et des parties molles voisines.
- L'arthrographie : rarement utilisée, elle permet, sous asepsie rigoureuse, de rechercher des trajets fistuleux ou des cavités anormales, mais surtout de réaliser les prélèvements qu'on enverra en bactériologie.
- La fistulographie : difficile, elle permet de rechercher une communication articulaire.

La conduite à tenir face aux signes cliniques et le choix des techniques d'imagerie dépendent notamment du caractère aigu ou chronique de l'infection et de la présence ou non de matériel (ostéosynthèse, prothèse).

Dans le cas des infections ostéo-articulaires aiguës :

Si c'est une arthrite, on utilise l'imagerie (échographie, TDM) pour confirmer l'épanchement intra-articulaire et on fait un bilan des parties molles péri-articulaires. Le diagnostic sera validé par la ponction articulaire dont nous reparlerons.

S'il s'agit d'une ostéite ou d'une ostéo myélite on fera une radiographie standard ainsi qu'une échographie et une TDM pour rechercher un abcès intra-médullaire sous périosté, et on fera un bilan des parties molles péri-osseuses. Un prélèvement osseux per-opératoire ou une biopsie percutanée viendront confirmer le diagnostic. C'est une urgence thérapeutique en raison du risque de chronicisation de l'infection.

Si c'est une infection aiguë sur prothèse : on utilisera les techniques de radiographie, d'échographie et de TDM pour visualiser l'origine du problème, regarder la stabilité des implants, on étendra cette observation aux parties molles. On procèdera à une ponction

articulaire et des prélèvements per-opératoires. Il s'agit d'une urgence médico-chirurgicale dont nous étudierons les différentes options de prise en charge (reprise de prothèse, lavage, antibiothérapie, « sauvetage » du matériel...) ultérieurement.

Concernant les infections ostéo-articulaires dites « chroniques » :

Si c'est une ostéite ou une ostéomyélite on étudiera à l'imagerie la continuité et la solidité osseuses, on recherchera les séquestres osseux et on déterminera l'indication opératoire et ses modalités. Des prélèvements osseux (biopsie per-cutanée en peau saine ou prélèvements per-opératoires) viendront confirmer le diagnostic.

S'il s'agit d'une infection chronique sur prothèse l'imagerie on peut, ici aussi, renforcer l'impression clinique et elle est utile pour le bilan lésionnel. On peut aussi pratiquer des scintigraphies.

#### **1.4.2. Diagnostic biologique et microbiologique des IOA :**

Le diagnostic des IOA repose fondamentalement sur les examens pratiqués au laboratoire de bactériologie. Ils vont permettre d'établir avec certitude le diagnostic et de mettre en œuvre le plus précocement possible, un traitement adapté et efficace, notamment grâce à l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

Comme tout prélèvement biologique, les prélèvements ostéo-articulaires comportent trois étapes :

- Une phase pré-analytique incluant la réalisation du prélèvement, l'enregistrement de l'analyse, la validation du prélèvement et la vérification de l'adéquation entre l'analyse demandée et le prélèvement.
- Une phase analytique qui comporte l'examen direct, la mise en culture sur divers milieux, l'identification, la réalisation d'un antibiogramme et la détermination des CMI.
- Une phase post-analytique afin d'obtenir la validation technique et biologique du prélèvement et la concertation entre le biologiste et le clinicien pour établir une éventuelle stratégie thérapeutique.

Plusieurs référentiels détaillent les modalités de prise en charge : IDSA Guidelines de 2013, les Recommandations de pratiques cliniques des infections ostéo-articulaires de la SPILF ou encore le REMIC (Référentiel en microbiologie médicale) actualisé très régulièrement.

##### **1.4.2.1. Prélèvements**

Le prélèvement est une étape clé de la prise en charge des infections ostéo-articulaires car il va permettre au biologiste d'isoler la bactérie en vue de l'identifier et de poser un diagnostic, ainsi, on pourra mettre en place le traitement antibiotique ou antifongique le plus adéquat (après étude de la sensibilité de la bactérie via l'antibiogramme par exemple).

Il convient d'être extrêmement précautionneux pour le diagnostic microbiologique des infections osseuses et articulaires car celui-ci est particulièrement ardu. Comme le réprecise le REMIC(41) ceci est dû au fait que les bactéries impliquées :

- Sont souvent des espèces qui appartiennent à la flore commensale cutanéomuqueuse donc il y a un risque important de contamination endogène du patient (lors du prélèvement), ou exogène (lors de réalisation, de la manipulation ou encore de l'ensemencement de l'échantillon) et donc un risque de faux positif.
- Peuvent être des bactéries « fastidieuses » en raison de leur croissance lente et/ou difficile sur les milieux conventionnels, du fait de leur physiologie intrinsèque (bactéries anaérobies, *Kingella kingae*) ou de leur état métabolique particulier dans le cadre des IOA (SCV, biofilm, etc).
- Sont parfois peu nombreux au niveau du site de l'infection ou sont piégés dans un biofilm ou encore ont subi une antibiothérapie préalable
- Appartiennent dans les cas d'infections plurimicrobiennes, à plusieurs espèces bactériennes associées.

#### 1.4.2.1.1. Types de prélèvements

Il existe trois grands types de prélèvements qui seront reçus au laboratoire : la ponction articulaire, les biopsies osseuses, les prélèvements per opératoires. Il y a également possibilité de faire des prélèvements superficiels de plaies ou de fistules par écouvillonnages ou du prélèvement de prothèse ou de matériel d'ostéo synthèse. Néanmoins, ces dernières techniques sont déconseillées car peu pratiques et sujettes à un fort risque de contamination par la flore cutanée. Seuls les ponctions et les prélèvements par abord en zone saine, ont une valeur prédictive correcte.

Le liquide synovial ou *synovie*, est un liquide biologique produit par la membrane synoviale afin de lubrifier les articulations et de nourrir le cartilage. Son examen, via la ponction articulaire, est essentiel pour diagnostiquer la maladie articulaire : il permet de distinguer un liquide inflammatoire (caractéristique d'une arthrite), d'un liquide « mécanique » (non inflammatoire) qui témoigne d'une arthrose.

La ponction de liquide articulaire est la méthode de première intention en raison de sa rapidité et de sa simplicité d'exécution, ne nécessitant pas d'anesthésie, elle est réalisable au chevet du patient ou en consultation. Pour certains sites profonds tels que la hanche, la ponction pourra être radioguidée.

Comme le précise le Référentiel de Microbiologie Médicale(41), une partie des liquides de ponction doit être recueillie dans un tube citraté ou hépariné, afin de prévenir la coagulation du prélèvement et d'obtenir un examen cytologique de qualité. Une autre partie va servir à ensemercer les flacons d'hémocultures aérobie et anaérobie. Enfin, une aliquote

de l'échantillon sera conservée à part pour les examens microscopiques et la culture classique. Elle permettra également un examen direct à l'œil nu, qui a cependant peu d'intérêt : un liquide trouble ou purulent peut orienter vers la présence de germes pyogènes (mais ce n'est pas spécifique). Outre son intérêt diagnostique, la ponction est aussi un premier geste thérapeutique qui aide à évacuer le liquide et donc à dégonfler partiellement l'articulation.

Un autre prélèvement possible est la biopsie osseuse qui consiste à prélever des fragments d'os. Ce prélèvement se fait en trois étapes : le repérage de l'organe ou de la lésion (sous contrôle scopique ou scanner), l'anesthésie locale profonde, la biopsie proprement dite (avec la biopsie sous scanner on peut choisir le point d'entrée de l'aiguille et son trajet).

Les biopsies percutanées ou « True cut », sont effectuées en radiologie ou au bloc opératoire, particulièrement quand elles doivent avoir lieu au niveau vertébral.

Enfin il y a les prélèvements per opératoires : cette technique, fréquemment utilisée au cours des lavages articulaires ou de reprises chirurgicales, permet d'identifier l'ensemble des germes et d'évaluer la profondeur de l'infection avant d'administrer l'antibiothérapie. Concernant ces prélèvements per-opératoires il est recommandé de ne pas effectuer le prélèvement sur une cicatrice, même désunie, et dans le cas d'une fistule, de ne pas prélever à partir de son orifice car on court le risque de n'isoler que des bactéries commensales cutanées (*Cutibacterium acnes*, Staphylocoques à coagulase négative...) dont l'intérêt diagnostique serait discutable.

En outre, on peut procéder à des prélèvements additionnels, de liquide de drainage, uniquement en cas de reprise septique. On n'utilisera leur résultat qu'en cas de positivité des prélèvements per-opératoires, pour surveiller l'activité du traitement et l'évolution de l'infection.

#### **1.4.2.1.2. Conditions de réalisation des prélèvements**

La qualité et le respect des bonnes pratiques de prélèvement est déterminant car c'est l'identification bactérienne qui conditionne le choix de l'antibiothérapie. La moindre erreur peut entraîner un mauvais diagnostic ou le choix d'un traitement inadapté, provoquant un échec thérapeutique et/ou un effet collatéral (émergence de bactéries multi résistantes pouvant conduire à une impasse thérapeutique) ainsi que des dépenses inutiles.

Le prélèvement doit toujours être effectué à distance de toute antibiothérapie. Il faut donc respecter un délai de quinze jours minimum entre un traitement médicamenteux et un prélèvement, sans quoi le résultat ne sera pas exploitable et on risque d'obtenir des résultats faussement négatifs.

Le risque de faux positifs n'est pas négligeable non plus, il fait référence aux possibles contaminations lors des différentes étapes d'acheminement du prélèvement depuis

la réalisation jusqu'à l'ensemencement des milieux de culture. Afin de diminuer le risque d'isolement de micro organismes contaminants, il faut réaliser les prélèvements dans des conditions d'asepsie chirurgicale.

#### **1.4.2.1.3. La quantité de prélèvements**

Les recommandations de l'IDSA insistent sur la nécessité d'avoir « minimum 3 mais idéalement 5 prélèvements » pour avoir un résultat à la fois qualitatif et quantitatif.

S'il y a trop de flacons inoculés on court le risque d'avoir des contaminations, mais aussi des problèmes de gestion au laboratoire (chaque prélèvement nécessite 10 minutes par prélèvement et par technicien de laboratoire, il faut que le matériel de broyage soit disponible, et la réalisation de ces prélèvements et leur exploitation a un coût non négligeable).

Dans le cas contraire, s'il n'y a pas eu suffisamment de prélèvements, on risque d'avoir des problèmes pour interpréter ces résultats. D'après une étude menée en 2003 par ALTWEG : Un prélèvement retrouvé positif sur 5 à 7 prélèvements donne un résultat spécifique à 26% tandis que s'il y a 2 prélèvements positifs, la spécificité monte à 53% et à 85% si 3 sont positifs parmi les 5 à 7 ensemencés.

Le REMIC(41) de 2018 préconise au moins 5 prélèvements per-opératoires, en des sites anatomiques différents, et si possibles pathologiques macroscopiquement.

#### **1.4.2.1.4. Acheminement des prélèvements**

Le transport doit respecter les exigences des bonnes pratiques de transport des produits biologiques à risques infectieux dont les modalités sont détaillées dans une procédure qualité du laboratoire. Le transport doit être rapide (moins de 2 heures idéalement), en flacons stériles qui seront conservés à température ambiante et non à 37°C pour éviter les faux négatifs et l'augmentation du délai de positivité. Selon le REMIC(41) si ce délai ne peut être respecté il faudra utiliser des milieux de transport plus appropriés, qui permettent la survie de bactéries fragiles ou des anaérobies. Néanmoins, aucune étude n'a établi de lien de causalité entre l'allongement du délai de prise en charge et la perte de sensibilité des cultures.

Ces prélèvements sont transportés dans des conteneurs adaptés pour protéger, les prélèvements eux-mêmes mais aussi le transporteur et la secrétaire ou les techniciens qui les recevront. Le transport des prélèvements biologiques humains est soumis à réglementation par l'instruction européenne ADR P650.

Les échantillons doivent être convenablement identifiés : l'étiquette doit mentionner le nom, prénom et date de naissance du patient ainsi que le nom du service prescripteur et la nature du prélèvement (Liquide articulaire, Ponction ostéo-articulaire...) et la localisation du



site. Les étiquettes doivent être collées immédiatement après le prélèvement, une fois la totalité des informations vérifiées avec le patient. Les échantillons dûment étiquetés doivent également être accompagnés d'un bon de demande spécifique comportant le nom du préleveur, l'heure et la date du prélèvement, les sites anatomiques et les informations cliniques (antibioprophylaxie, reprise de prothèse, corticothérapie...), sans oublier les consignes spécifiques (recherche de mycobactéries par exemple...). Le laboratoire notifiera ensuite l'heure de réception de ce prélèvement.

#### **1.4.2.1.5. Réception des échantillons et broyage**

Le processus d'accueil des échantillons doit respecter les exigences de la norme NF EN ISO 15189 afin de permettre un enregistrement convenable de la demande et une traçabilité correcte des prélèvements.

Lors de la réception du prélèvement au secrétariat du laboratoire, le personnel vérifie la présence de la fiche de transmission du prélèvement, de la prescription, les données administratives pour l'identification du patient, l'identification des échantillons. Les prélèvements sont ensuite acheminés à la paillasse de tri où les techniciens vérifient la conformité du prélèvement : adéquation des récipients ou tubes par rapport aux examens demandés, la qualité du prélèvement (coagulation...), le respect des volumes mais aussi le respect du délai et des conditions d'acheminement. Si les échantillons sont décrétés « non conformes » on en informe les prescripteurs. Les échantillons conformes seront dispatchés entre les différentes paillasses suivant les examens demandés.(42)

Compte-tenu du risque de contamination, les échantillons doivent être manipulés sous PSM de type 2 en utilisant les techniques de manipulation stérile. L'observation des cultures se fera aussi dans des conditions de stérilité maximales.

Tous les prélèvements solides (fragments d'os et de tissus), doivent subir un « pré-traitement » et être broyés dans un lieu confiné et stérile pour libérer les bactéries enchâssées dans le biofilm ou la matrice osseuse, et ainsi améliorer la sensibilité de la culture. Il existe trois techniques :

Le broyage manuel à l'aide d'un mortier et d'un pilon stériles est à proscrire, eu égard aux contaminations, aux disparités selon la nature des pièces broyées et au temps passé par les techniciens. Le bénéfice par rapport aux risques de contamination n'a pas été démontré.

Le broyage mécanique a été développé plus récemment. Les broyeurs à billes sont commercialisés non stériles (ils seront pris en charge par la stérilisation centrale) et le diluant sera ajouté au laboratoire (sous Poste de Sécurité Microbiologique de type 2). Les homogénéiseurs ou disperseurs à billes, quant à eux, sont commercialisés stériles, avec des billes en inox et du liquide diluant (eau de qualité de biologie moléculaire).

Ces outils permettent de fragmenter rapidement l'échantillon grâce aux frottements générés

entre les billes de broyage et la paroi intérieure du bol de broyage. Ils fonctionnent dans un environnement clos, protégeant ainsi l'échantillon et l'opérateur des aérosols. Ce sont des dispositifs à usage unique qui permettent en outre de limiter le nombre de manipulations et de contaminations: les échantillons sont mis directement dans le flacon stérile (contenant ou non les billes) par le chirurgien lors du prélèvement. Ce flacon ne sera ré-ouvert qu'au moment de l'ensemencement des milieux de culture par le broyat (avec billes). En outre, ces flacons ne renferment ni DNases, ni ADN, réservant ainsi la possibilité de se trouver la biologie moléculaire pour l'identification bactérienne. Par contre, le broyage ne fonctionne que sur les échantillons relativement petits.

Une étude menée par Roux(43), qui évaluait l'apport du broyage mécanique dans les diagnostic des IOAP, a retrouvé une sensibilité de la culture après broyage mécanique de 83% donc supérieure à la sensibilité après sonication de matériel explanté (78,5%) et sans commune mesure avec la sensibilité de la culture seule (60,8%). Ils rapportaient également un taux de contamination relativement faible (8,7%). Cependant, à notre connaissance, aucune étude comparative entre le broyage et la sonication n'a été menée.

Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer cette sensibilité accrue de la technique de broyage : tout d'abord la technique entrainerait une libération accrue des bactéries intra-tissulaires et intra-cellulaires, et ensuite le stress subi par les bactéries au cours du broyage accélèrerait leur évolution de la phase stationnaire (du biofilm) à la phase de croissance. Teissier(15) a mis en évidence que le pré traitement des prélèvements par broyage réduisait le délai de positivité des cultures, favorisait la détection des SCV, limitait le risque de contamination, faisait gagner du temps au laboratoire .

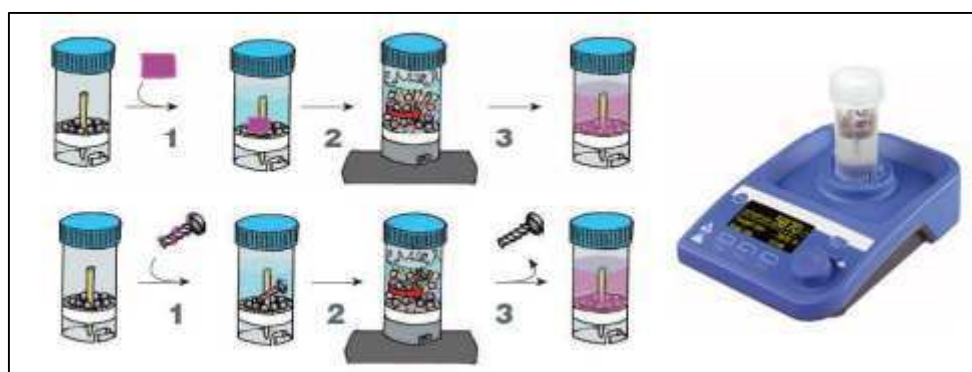


Figure 10 Broyage mécanique d'un prélèvement ou d'un matériel étranger(44)

La sonication, technique plus récente, utilise des ultra-sons pour mettre en évidence les bactéries prisonnières du biofilm. Cette technique est brève : 5 minutes à 50 Hz suffisent pour décrocher le biofilm présent sur le matériel, sans altérer la viabilité bactérienne.

Ce procédé permet d'augmenter la sensibilité de la culture surtout chez le patient traité comme l'a constaté Trampuz(45).

La Mayo Clinic quant à elle, recommande que la sonication soit précédée et suivie de trente

secondes d'homogénéisation au vortex.(46) On retrouve aussi la possibilité de centrifuger le sonicat puis d'ensemencer les milieux avec le culot de centrifugation(45).

Mais comme le rappelle Teissier(15), pour les infections sur prothèse, le broyage présente l'avantage, par rapport à la sonication, de ne pas nécessiter le retrait de l'implant et peut donc être appliqué aux IOA avec ou sans matériel, aux prises en charges chirurgicales avec ou sans retrait du matériel et plus globalement à toutes les IOA avec présence de biofilm.

Le REMIC(41) rappelle aussi que la sonication n'est pas sans risque de contamination, qu'une organisation adaptée est requise au sein de la structure de soin (notamment pour la stérilisation des contenants), que l'accréditation de la méthode est difficile et que la supériorité sur la culture après broyage mécanique n'est pas établie.

Quelque soit la technique retenue, une partie de l'échantillon non ensemencée doit être conservée par congélation au moins jusqu'au rendu définitif des résultats et idéalement jusqu'à 2 à 4 mois après ce rendu pour permettre aux cliniciens de faire d'éventuelles recherches complémentaires (mycobactéries, champignons, techniques de biologie moléculaire...).

#### **1.4.2.2. Ensemencement et mise en culture**

Pour éviter toute contamination du prélèvement on procède à la manipulation de l'échantillon, à l'ensemencement et au repiquage des milieux sous PSM-2. Il est recommandé d'ensemencer les liquides et les broyats obtenus sur des milieux riches, incubés à 35°C environ, dans différentes atmosphères (aérobie, anaérobie) et de prolonger l'incubation au minimum 14 jours.

Etant donnée l'épidémiologie bactérienne des IOA le REMIC(41) recommande d'ensemencer au minimum :

- Une gélose au sang incubée en aérobie avec lecture précoce à J1, à J2 et tardive.
- Une gélose au sang cuit supplémentée sous 5% de CO<sub>2</sub> avec lecture précoce à J1, J2 et tardive.
- Une gélose pour les bactéries anaérobies (gélose au sang ou gélose Schaedler) incubée en anaérobie avec lecture précoce à J2 ou J3, et lecture tardive.
- Un milieu liquide type bouillon Schaedler et/ou bouillon cœur-cervelle, avec lecture régulière jusqu'à J14.

Schafer recommande de faire des cultures prolongées au-delà de 7 jours, notamment à cause des bactéries anaérobies, des germes fastidieux et des SCV.

Comme nous l'avons vu plus haut, les flacons d'hémocultures peuvent être ensemencés aussi, avec des résines adsorbant les antibiotiques (sauf dans le cas de certains germes anaérobies à Gram positif comme les *Cutibacterium acnes* qui poussent uniquement en

absence de résines)(47). Leur incubation sera prolongée jusqu'à J14.

Dans la littérature(22,35) l'utilisation de ces flacons a démontré sa supériorité pour le diagnostic des bactéries fastidieuses en particulier (notamment pour l'isolement de *Kingella kingae* chez les enfants). Minassian(21) a souligné le caractère essentiel de l'ensemencement des milieux liquides pour la croissance bactérienne des échantillons avec un faible inoculum et pour les bactéries qui croissent lentement ou difficilement sur les milieux gélosés. La positivité des milieux liquides doit entraîner leur repiquage indépendamment de la positivité des autres milieux, et faire interrompre l'incubation (les substrats étant épuisés, le milieu ne permet plus la croissance d'autres bactéries).

Afin de limiter les éventuelles contaminations lors des ouvertures quotidiennes pour l'examen macroscopique par les techniciennes, il peut être intéressant de dupliquer les ensemencements des géloses anaérobies et des géloses au sang cuit, la deuxième boîte n'étant ouverte que pour l'examen tardif.

Une culture positive précoce sur milieu gélosé ne dispense pas des lectures suivantes : une infection plurimicrobienne (10 à 15% des IOA) ou la présence de bactéries à croissance lente est toujours possible.

#### **1.4.2.3. Détection de la croissance bactérienne et identification**

L'identification bactérienne répond à un arbre décisionnel s'appuyant sur divers critères (morphologiques, biochimiques...) déterminés par une multiplicité de techniques, dont l'examen direct, la spectrométrie de masse et la biologie moléculaire, mais aussi d'autres examens que nous n'aborderons pas (immuno-enzymologie, chromogénicité...).

##### **1.4.2.3.1. Examen cytologique et GRAM**

L'examen cytologique est une première étape pour le diagnostic bactériologique et permet éventuellement une orientation diagnostique rapide : on procède ainsi à une coloration de GRAM, examen rapide et simple, de sensibilité faible(48) (10 à 30%) mais de spécificité élevée (99%). La coloration de GRAM va aider le biologiste à détecter les microorganismes, à déterminer, selon leur réaction à la coloration et donc la composition de leur paroi, leur caractère GRAM positif (une membrane simple, riche en peptidoglycanes) ou GRAM négatif (moins de peptidoglycanes mais une membrane externe supplémentaire) et à observer leur morphologie (cocci ou bacilles) et leur manière de se regrouper (en amas, en chainettes, en paires...). Ces premiers éléments permettront au médecin de prescrire un antibiotique adapté en attendant les résultats des autres examens (cultures, biochimie).

Cet examen comporte également une coloration adaptée pour l'appréciation semi-quantitative des leucocytes et de la formule leucocytaire. Avec la coloration au MGG on peut détecter la présence d'une réaction cellulaire signant une infection

Pour les liquides articulaires, l'examen sera complété, à partir du tube citraté ou

hépariné, par une numération et formule des cellules sanguines et une recherche de microcristaux (pour le diagnostic différentiel des cas de goutte articulaire aiguë ou de chondrocalcinose).

Le diagnostic bactériologique diffère selon la nature de l'infection : s'il s'agit d'une infection aiguë à espèce dite « classique », on retrouvera facilement et rapidement les bactéries, l'examen direct sera positif ; tandis que dans les cas d'infections chroniques les bactéries sont dites « stressées » : l'examen direct sera négatif, on retrouvera peu de polynucléaires à neutrophiles, la culture sera lente (plus de 48 heures) et on observera des populations d'aspect différent. Dans la plupart des cas d'arthrite septique, le liquide articulaire contient plus de 10 000 éléments/mm<sup>3</sup> et plus de 90% de polynucléaires à neutrophiles, souvent altérés. En revanche, s'il s'agit d'une infection chronique sur prothèse les valeurs sont moindres : au-delà de 1700 leucocytes/mm<sup>3</sup> et plus de 65% on évoque la possibilité d'une infection. Les sensibilité et spécificité respectives sont de 94% et 88% pour les leucocytes et 97% et 98% pour les neutrophiles.

#### 1.4.2.3.2. Identification biochimique

Les caractéristiques biochimiques d'une bactérie concourent à son identification, il existe plusieurs types de galeries et plusieurs tests biochimiques pour étudier la présence ou non d'enzymes qui étaient disponibles sous forme de galeries d'identification (type API)

L'identification biochimique fut très utilisée par le passé mais s'est vue dépassée par les techniques récentes et n'est donc plus utilisée en routine au laboratoire de bactériologie.



Figure 11 Exemple de galerie API

#### 1.4.2.3.3. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge. Cette méthode a fait ses preuves dans de nombreux domaines, des biotechnologies pour l'analyse des nucléotides à la pharmacologie pour le dosage de médicaments ou la détection de stupéfiants.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une technologie récente qui est devenue en moins de dix ans la référence en matière d'identification bactérienne dans les laboratoires de microbiologie clinique. Outre l'identification des micro-organismes, le typage de souches individuelles ainsi que les tests de résistance aux antibiotiques et aux antimycotiques ont été mis au point afin d'accélérer le diagnostic microbiologique

Cette technique permet d'identifier précocement les macromolécules des micro

organismes, et notamment leurs protéines, et ce plus rapidement qu'avec les méthodes conventionnelles. Ce spectromètre utilise une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI = Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF = Time Of Flight).

Concrètement, un laser UV ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ ) d'azote  $\text{N}_2$  est dirigé sur une matrice à laquelle on mélange l'échantillon. Cette matrice va englober les molécules fragiles d'intérêt et ainsi éviter leur dégradation sous l'action du laser durant l'analyse. Le mélange se vaporise et libère les peptides : c'est la Désorption (rupture des liaisons ioniques entre les molécules et les substrats). La matrice désorbée ionise l'échantillon par transfert de protons. Les différents constituants sont séparés selon leur Ionisation vers l'électrode portant la charge inverse. Les ions passent ensuite à travers un champ électrique de force connue qui permet d'accélérer leur progression. Ensuite, l'analyseur TOF sépare les molécules ionisées selon le rapport  $m/z$  (masse/charge) : les molécules volumineuses mettront davantage de temps à atteindre le détecteur tandis que les molécules plus petites et donc légères l'atteindront plus vite. Une fois l'ion détecté le signal est amplifié, analysé et identifié par l'ordinateur qui donne les résultats sous forme de spectre. L'ordinateur recherche ensuite dans sa base de données l'identification de la bactérie correspondant aux pics enregistrés.

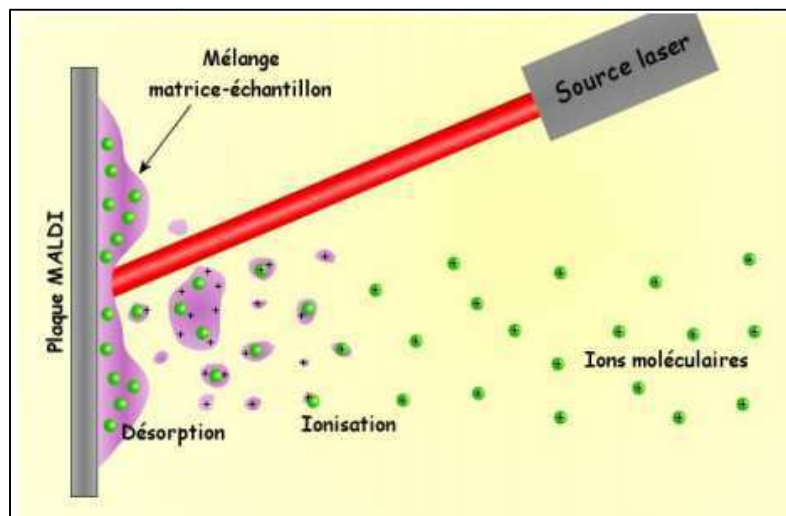


Figure 12 Principe d'ionisation par la technique MALDI(49)

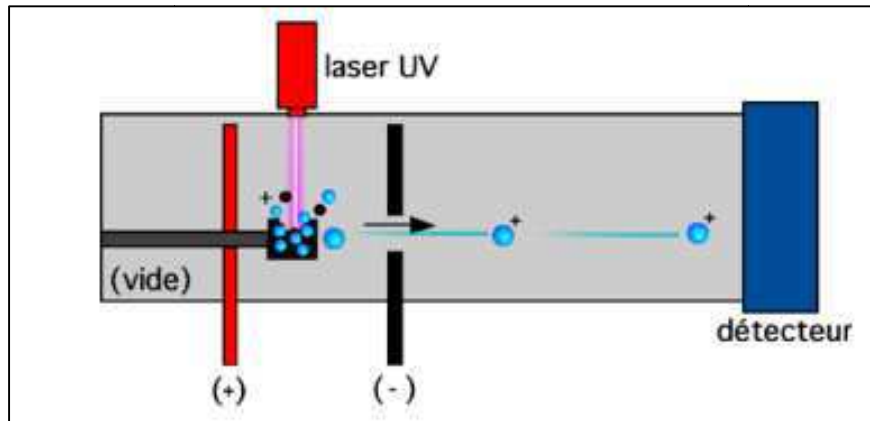


Figure 13 Technique Time Of Flight

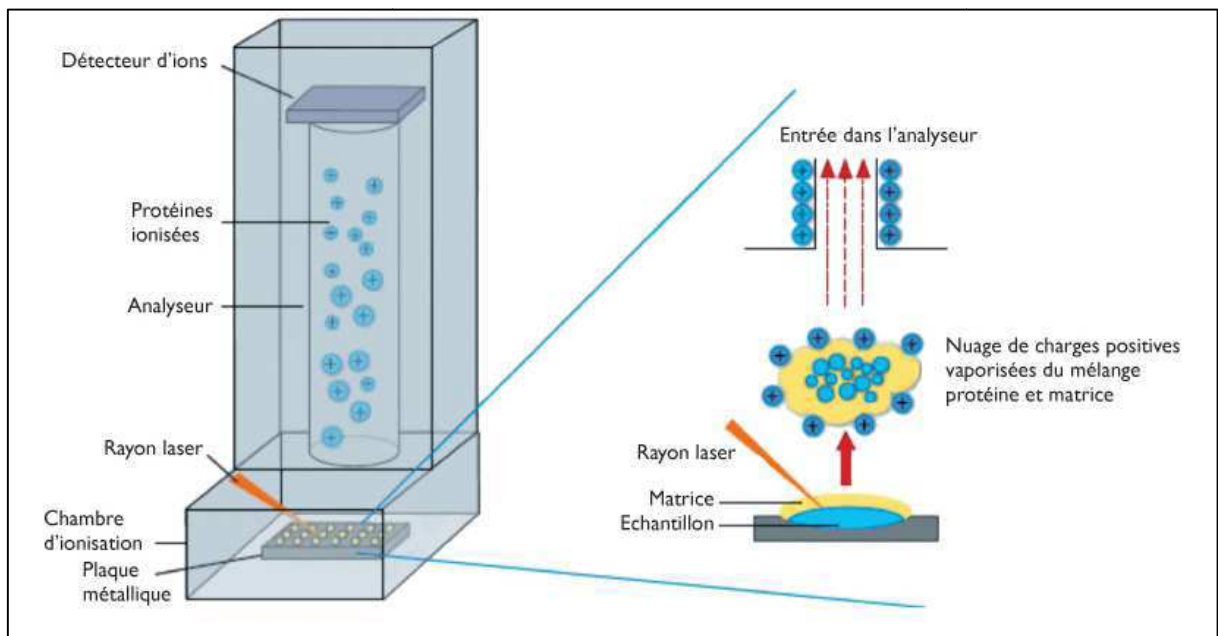


Figure 14 Fonctionnement de la technologie MALDI-ToF (50)

Avec la permission de la Mayo Clinic. Tous droits réservés.

Cette technique d'identification présente des avantages(51) : c'est une solution rapide, peu coûteuse et fiable pour l'identification de bactéries ou champignons. Non seulement le MALDI-TOF/MS permet l'identification rapide de bactéries ou levures ayant poussé sur des milieux gélosés conventionnels (après une croissance de 16-20 heures), mais il permet également d'identifier les germes à partir de flacons à hémocultures détectés positifs.(52) (48,53)

Wang(28) a aussi démontré que le temps moyen d'identification des bactéries en combinant l'utilisation de flacon d'hémocultures et le MALDI était significativement plus court (7,1H en moyenne) que les méthodes standards au labo (où travaillent les technicienne six jours/semaine et 12 heures/jour) où le délai d'identification avoisine plutôt les 48H. Cette amélioration du délai de détection et d'identification bactérienne offre la possibilité d'orienter précocement l'antibiothérapie et donc d'améliorer le pronostic fonctionnel du patient.

Ainsi, nombreuses sont les études qui ont montré le gain de temps et de précision dus à cette technique(54–57).

En outre, cette technique peut être réalisée sur un petit volume d'échantillon, ce qui est très intéressant dans le cadre du diagnostic des infections ostéo-articulaires, pour lesquelles la quantité des prélèvements est parfois un peu limitée.

Il convient néanmoins de souligner que cette méthode ne peut s'appliquer pour les bactéries trop muqueuses ou difficiles à étaler sur la matrice, et que la base de données n'est pas exhaustive et doit être mise à jour régulièrement.

Schubert(51) prévoit un développement majeur et de nouvelles perspectives pour cette technique, notamment la mise en œuvre de processus automatisés dans les laboratoires de diagnostic : processus basés sur l'inoculation de milieux de culture liquides ainsi que le transfert des milieux de culture à des incubateurs spécialisés gérés par un système robotique entièrement automatisé.

#### **1.4.2.3.4. Biologie moléculaire**

Les techniques conventionnelles de culture peuvent être complétées par des méthodes de biologie moléculaire qui mettent en évidence l'ADN bactérien. Plusieurs techniques existent, fondées sur l'amplification en chaîne par polymérase : PCR. Cette technique de répllication ciblée in vitro permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, de grandes quantités d'ADN grâce à la répétition de cycles de dénaturation de l'ADN, d'hybridation des amorces spécifiques du gène à amplifier et d'élongation du fragment par une ADN polymérase.

Les méthodes de biologie moléculaire ne dépendant, ni de la viabilité, ni du métabolisme bactérien, elles sont en théorie capables de permettre le diagnostic dans des cas complexes : micro organismes fastidieux, bactéries intra cellulaires, SCV, patient ayant reçu des antibiotiques avant le prélèvement...

Biologistes et cliniciens doivent se concerter pour décider la pertinence du recours à cette analyse, qui demeure chère et chronophage. Généralement on l'utilise dans deux cas précis :

- Forte suspicion clinique d'IOA avec antibiothérapie préalable et/ou critères biologiques (CRP, cytologie) mais cultures demeurées stériles. Dans ce cas les techniques de biologie moléculaire pourront confirmer la présence de bactéries et en assurer l'identification.



- Absence de critères cliniques mais cultures positives posant la question d'une éventuelle contamination de laboratoire ou de la présence d'une espèce possédant des caractères phénotypiques inhabituels. La présence d'ADN bactérien dans un ou plusieurs prélèvements peut permettre de confirmer l'existence d'une infection non suspectée, surtout si les PCR sont réalisées sur des échantillons différents de ceux utilisés pour les cultures classiques.

Le diagnostic moléculaire peut se faire à partir de liquide articulaire, de broyat ou de sonicat, ou encore de souches bactériennes dont l'identification pose problème. Le contexte et l'orientation clinique vont déterminer le choix de la technique :

- **La PCR universelle 16S**

Elle amplifie les gènes codant l'ADN ribosomal 16S des bactéries, c'est une PCR à large spectre, elle permet donc d'identifier la quasi-totalité des bactéries, y compris celles qui se cultivent difficilement. La spécificité de cette technique est de 65 à 94% pour les tissus et liquides synoviaux mais elle est majeure si la PCR est réalisée sur plusieurs prélèvements. Marin(44) a montré dans son étude de 2012 que la PCR 16S était plus spécifique et avait une meilleure valeur prédictive positive que les cultures classiques pour diagnostiquer une IOA. La spécificité et la VPP pour un échantillon dont la PCR16S était positive, étaient respectivement de 96,3% et 91,7% et pour atteindre cette même spécificité il fallait trois cultures positives avec le même micro organisme.

Cette méthode a l'avantage de détecter les bactéries fastidieuses, d'identifier de nouvelles bactéries et de fonctionner malgré une antibiothérapie précoce. En revanche, elle ne se substitue pas aux cultures classiques, nécessite un délai de 2 jours minimum, a une faible sensibilité globale (risques de détection de contaminants ou de faux positifs) 50 à 92% selon les études(58–60) et la sensibilité augmente si la PCR est réalisée sur sonicat.

Outre sa sensibilité imparfaite et variable selon les espèces bactériennes, la PCR16S n'arrive pas à distinguer les espèces phylogénétiquement très proches (*S. oralis*, *S. pneumoniae*, *S. mitis* possèdent la même séquence de l'ADNr16S en 5' par exemple).

Parmi ses autres inconvénients on peut souligner le délai d'obtention (à cause du séquençage), le risque de contamination présent durant tout le processus (manipulation, réactifs...), et l'impossibilité de réaliser la PCR16S dans le cas d'une infection polymicrobienne.

- **La PCR ciblée/spécifique en temps réel:**

Plus sensible que la PCR16S et plus rapide (le délai minimum est ici de 24h et non 48h) elle cible une espèce ou un genre en fonction du contexte clinique et épidémiologique (*S. aureus*, *Streptococcus. spp*, *Neisseria.meningitidis*...).

L'utilisation de la PCR spécifique *Kingella* a, par exemple, démontré une nette supériorité en termes de sensibilité et de rapidité de diagnostic par rapport aux techniques

de cultures classiques sur liquide articulaire chez les enfants de moins de 4 ans : sur 89 cas de l'étude d'Ilharreborde(61) 7 sont revenus positifs à *K. kingae* en culture mais 24 des cas négatifs en culture sont revenus positifs en PCR spécifique *Kingella*.

62

Il y a une véritable complémentarité entre la PCR universelle et la PCR spécifique en temps réel : la première permet d'identifier micro organismes fastidieux et anaérobies mais pour plus de sensibilité et un meilleur diagnostic, notamment dans les infections ostéo-articulaires, il convient de se tourner vers la PCR spécifique en temps réel.

Il existe encore d'autres techniques de biologie moléculaire qui aident à diagnostiquer les infections ostéo-articulaires : notamment des **tests moléculaires rapides**, par exemple le test GeneXpert qui permet de diagnostiquer en moins d'1 heure des IOA à SARM et SARM directement à partir des prélèvements ostéo-articulaires, avec une sensibilité de 94,4% et une spécificité de 100%. Ces tests donnent une orientation thérapeutique précoce : Dubouix(62) parle d'un délai de 72 min au lieu de 79h pour les cultures classiques mais malgré ces bons résultats leur utilisation reste limitée car ils ne sont applicables qu'à de petites séries. Titecat(63) et Valour(14) ont, eux aussi, conclu que cette technique permettait la mise en œuvre d'un traitement antibiotique de première intention adapté à la présence de SARM ou SARM en environ 1 heure et réduisait fortement l'utilisation d'antibiotiques à large spectre : ce qui permet d'améliorer le pronostic fonctionnel des patients souffrant d'infections ostéo-articulaires.

Il y a également la détection de **biomarqueurs synoviaux**. En effet, des marqueurs de l'inflammation sont détectables avec des prélèvements de sang (Globules Blancs, Vitesse de sédimentation, CRP, Il-6) ou de liquides articulaires (leucocytes, cytokines comme les interleukines-6, enzymes et peptides antimicrobiens tels que la leucocyte estérase  $\alpha$ -défensine). La révélation est rapide mais se pose la question de la stabilité du biomarqueur et du coût qui varie en fonction du marqueur à analyser : allant de 2,4€ pour la CRP à 300€ pour l' $\alpha$ -défensine (coût 2019).

#### 1.4.2.4. **Microorganismes impliqués dans les infections ostéo-articulaires**

Les prélèvements analysés peuvent révéler la présence de plusieurs bactéries qui ne sont pas forcément toutes pathogènes. Il peut s'agir de bactéries commensales, de contaminations, et parfois, selon l'origine du prélèvement, le contexte du prélèvement et de la manipulation, on considèrera que ce sont de simples bactéries opportunistes et on ne s'alarmera pas.

En revanche, si un ou plusieurs flacons d'enrichissement reviennent positifs à un germe non commensal tel que *Brucella*, *Campylobacter*... alors on réalisera

systématiquement un antibiogramme.

#### 1.4.2.4.1. Microorganismes classiquement retrouvés

Les étiologies bactériennes des IOA sont différentes selon le terrain du patient, son âge... Parmi les espèces fréquemment incriminées dans les infections ostéo-articulaires on retrouve les staphylocoques : pour les IOA sur os natif l'étiologie dominante est *S. aureus* et pour l'infection sur matériel les responsables sont généralement les staphylocoques à coagulase négative (*S. epidermidis* notamment). Il n'y a pas, à notre connaissance, de données épidémiologiques pour les infections de matériel d'ostéosynthèse.

Premier agent pathogène responsable d'IOA, le *S. aureus* est un cocci GRAM+ retrouvé dans des tableaux cliniques variés (de l'infection aigue à l'infection chronique et récidivante). Plusieurs facteurs de virulence contribuent à sa localisation osseuse : la présence d'une protéine liant la fibronectine (favorisant l'adhésion aux biomatériaux), la protéine de liaison au fibrinogène (qui a un rôle dans les infections des plaies et les infections sur corps étranger tels que des prothèses), la protéine liant le collagène (elle se fixe sur le collagène qui représente 90% de la matrice du tissu osseux, c'est un facteur de virulence important dans les arthrites)(14). La lecture macroscopique doit être attentive à la recherche des différents aspects de colonies, notamment de micro-colonies pouvant signer la présence de variants métaboliques (SCV)

On retrouve également fréquemment des entérobactéries (dans les infections aiguës, et surtout chez les nouveaux-nés), des *Cutibacterium acnes* (infections chroniques) et des entérocoques. D'après l'étude menée sur dix ans par Titécat(63), qui recensait 50 006 souches bactériennes impliquées dans les infections ostéo-articulaires, les cocci gram + étaient majoritaires (plus de 71% des cas) avec 27% de *S. aureus* et 54% de staphylocoques à coagulase négative. Les entérobactéries représentaient 12,5% des isolats, les *Cutibacterium acnes* dans 5,8% des cas et les *Pseudomonas aeruginosa* dans 3,6% des cas.

#### 1.4.2.4.2. Bactéries fastidieuses et plus rares

Le diagnostic bactériologique peut être difficile à poser quand on se trouve en présence de germes à croissance lente et/ou difficile (anaérobies), fragiles (*Kingella kingae*), présentant un état métabolique particulier (bactérie du biofilm), ayant perdu leurs caractéristiques phénotypiques (SCV)..., d'où l'intérêt diagnostique d'utiliser des flacons à hémocultures.

Parmi les espèces dites « exigeantes », qu'on aura plus de mal à faire croître sur les milieux de cultures conventionnels (gélose au sang, gélose chocolat...), on retrouve les HACCEK (bacilles GRAM négatif à croissance lente et exigeante dont font partie *Haemophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Capnocytophaga spp.*,

*Eikenella corrodens* et *Kingella kingae*, cette dernière étant particulièrement responsable d'infections ostéo-articulaires chez les enfants), mais aussi *Pasteurella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Corynebacterium*... Ces bactéries ont des besoins nutritionnels très spécifiques, c'est pourquoi des milieux enrichis tels que les flacons à hémocultures offrent un moyen de les détecter plus facilement et plus rapidement.

Parmi les possibles mais plus rares étiologies bactériennes des infections ostéo-articulaires on peut citer *Tropheryma whipplei*, bacille gram positif responsable de la maladie de Whipple (infection chronique caractérisée par des arthralgies et des troubles gastro-intestinaux, diagnostiquée principalement grâce à une PCR quantitative salivaire et fécale).

On peut aussi retrouver des bactéries tels que *Brucella* (coccobacille gram négatif pouvant entraîner une spondylodiscite aigüe), *Borrelia* (responsable de la maladie de Lyme, à suspecter devant une arthrite aigüe hémotogène), *Neisseria gonorrhoeae* (chez l'adolescent et le jeune adulte) *N. meningitidis*

D'autres bactéries rares et fastidieuses comme *Mycoplasma*, peuvent être à l'origine de ces IOA. Elles ont la particularité de ne pas présenter de paroi et de ne pas être sensibles à des antibiotiques comme les bêta-lactamines. Elles ont un pouvoir arthritogène puisqu'elles entraînent des arthrites septiques ou réactionnelles, principalement au niveau des hanches et des genoux. Ces bactéries ne sont pas visibles au GRAM, et nécessitent des milieux de culture spécifiques sur lesquels ils croissent en deux à vingt jours. Leur diagnostic par flacon d'hémoculture n'est pas toujours probant.(64)

Les exigences de culture fastidieuses et la croissance relativement lente de ces bactéries, peuvent altérer la fiabilité des systèmes automatisés. Des milieux spécialisés et des conditions d'incubation spéciales doivent être mises en place pour une culture optimale de ces bactéries.

#### **1.4.2.4.3. Mycobactéries et levures**

Bien que les bactéries soient les organismes les plus couramment rencontrés, les mycobactéries (*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*) et les champignons (*Candida*...) peuvent aussi être facteurs d'infections ostéo-articulaires, comme le détaillent Hogan(65) ou encore Yombi(66). La gestion de ces derniers est souvent plus complexe, notamment en présence de corps étrangers. Leur culture nécessite des milieux complexes (voire un NSB 3 pour *M. tuberculosis*), et des incubations prolongées. Les nouveaux traitements conduisant à une immunosuppression accrue, il est probable que les infections osseuses mycobactériennes et fongiques seront plus fréquentes. Les PCR 16S et spécifique seront donc un atout non négligeable du diagnostic.

#### 1.4.2.5. AntibioGramme

L'antibiogramme a un intérêt thérapeutique individuel puisqu'il permet de mesurer la sensibilité d'une souche bactérienne à un ou plusieurs antibiotiques et donc de dépister d'éventuelles résistances acquises : on pourra ainsi orienter au mieux les choix thérapeutiques. Il a aussi un intérêt épidémiologique collectif : en effet, il sert au suivi épidémiologique des résistances bactériennes, ainsi, les spectres cliniques des antibiotiques vont pouvoir évoluer et l'antibiothérapie probabiliste sera adaptée. Dans le cas des infections ostéo-articulaires il apparaît essentiel pour éviter tout échec thérapeutique qui aurait des conséquences graves pour le pronostic fonctionnel voire vital du patient.

La HAS et la Société Française de Microbiologie(41) rappellent que l'antibiogramme ou l'antifongogramme doivent être réalisés sur tous les aspects de colonie isolées, notamment pour les staphylocoques, car il est fréquent d'observer plusieurs phénotypes de résistance pour une même espèce bactérienne chez le même patient (en particulier si SCV). Certains micro-organismes sont naturellement résistants à plusieurs antibiotiques, on parle de « résistance innée » (*Clostridium difficile*, *P. aeruginosa*...) contrairement aux résistances acquises dues à un mutant résistant ou à l'acquisition de gènes par transfert génétique. La prévalence des résistances acquises dépend de 3 facteurs : la pression antibiotique, la transmission clonale de souches résistantes et la transmission de mécanismes de résistance entre bactéries de même espèce ou d'espèces différentes.

Au laboratoire de bactériologie on va donc étudier la sensibilité des bactéries aux antibiotiques par mesure directe de la CMI qui reflète l'inhibition macroscopique de la croissance bactérienne, puis lecture interprétative selon les règles d'expertise du CA-SFM et de l'EUCAST en vigueur. Il y a plusieurs façons de déterminer la CMI, nous en citerons trois :

La dilution en milieu liquide consiste à préparer une gamme de milieux contenant l'antibiotique en plus ou moins grande concentration, et à les ensemercer, ainsi qu'un tube témoin dépourvu d'antibiotiques, avec une quantité de bactéries identique. La galerie ainsi préparée sera incubée à 37°C pendant 18 heures. Enfin elle sera examinée à l'oeil nu ou à l'aide d'un lecteur de densités optiques.

Outre cette méthode de référence assez fastidieuse et lente, on peut choisir la technique de l'E-test (technique de diffusion rapide en milieu gélosé). Concrètement il s'agit de déposer sur une gélose de Mueller-Hinton (milieu servant spécifiquement à mesurer l'activité des antibiotiques), une bandelette présentant un gradient de concentration d'antibiotique. Suivant la sensibilité de la bactérie à l'antibiotique un diamètre d'inhibition va se dessiner autour de la bandelette. La lecture s'effectuera après 24 à 48h d'incubation à 37°C, directement au niveau de la zone à lire.

On peut aussi utiliser la méthode de diffusion ou des disques en milieu solide. Cette technique consiste à ensemencer la gélose en l'inondant de la souche à tester, par écouvillonnage, et à déposer des disques de papier buvard imprégnés d'un antibiotique à une certaine concentration. Selon le diamètre d'inhibition on déterminera pour chaque antibiotique testé, si la bactérie y est sensible /résistant/ intermédiaire. Il y a des valeurs critiques des diamètres d'inhibition (en mm) par antibiotique selon l'espèce :

- Résistant si le diamètre est inférieur à d
- Intermédiaire s'il est compris entre d et D
- Sensible s'il est supérieur à D

Concernant le choix des antibiotiques à tester le CA-SFM recommande par espèce ou groupe microbien :

- un antibiogramme standard (disques ou CMI) pour déterminer les antibiotiques nécessaires à l'orientation thérapeutique en fonction des indications cliniques (type d'infection) et de la prévalence de la résistance acquise.
- des tests complémentaires pour détecter un mécanisme de résistance ou un antibiotique de recours

Certaines molécules sont représentatives de leur groupe d'antibiotiques, d'où l'usage d'un nombre restreint d'antibiotiques pour chaque antibiogramme. De la même façon, certaines résistances à des antibiotiques dits « antibiotiques marqueurs » révèlent des mécanismes de résistance plus ou moins exprimés par la famille d'antibiotiques. L'interprétation des antibiogrammes est réalisée par le biologiste médical.

Il est essentiel d'identifier les mécanismes de résistance des bactéries pour que la prise en charge du patient soit efficace et rapide. Le dialogue et la coopération entre biologistes et cliniciens sont indispensables pour élaborer une stratégie thérapeutique adaptée.

## **1.5. Options thérapeutiques**

### **1.5.1. Stratégie thérapeutique**

La prise en charge des infections ostéo-articulaires est multidisciplinaire et fait agir de nombreux professionnels de santé : rhumatologues, infectiologues, chirurgiens, bactériologues etc... Une fois le diagnostic infectieux posé, il convient d'établir une stratégie thérapeutique la plus adaptée puis de mettre en place le traitement (médicamenteux et/ou chirurgical), une fois l'infection enrayée, on aura une phase de suivi importante (en raison du caractère persistant des bactéries impliquées dans les infections ostéo-articulaires, et de la

possible présence de matériel, les professionnels de santé doivent être particulièrement vigilants, car une infection aigue peut se chroniciser et une infection nosocomiale être diagnostiquée...).

La stratégie sera élaborée par l'équipe soignante en fonction du contexte, de la ou des bactérie(s) impliquée(s), des antécédents du patient, de la présence ou non de matériel... Elle sera ensuite expliquée au patient au cours de ses consultations et de son hospitalisation, avant d'être validée ou adaptée lors de la présentation du dossier en réunion de concertation pluridisciplinaire en cas d'infection complexe. Cette stratégie prévoit le nombre et le type d'interventions chirurgicales nécessaires, ainsi que la durée et les modalités de l'antibiothérapie, la durée prévisible d'hospitalisation, les modalités de la rééducation, les chances de succès, les alternatives et les risques de la prise en charge médicale et chirurgicale. Elle pourra bien entendu être remaniée durant l'hospitalisation selon la complexité du cas, l'évolution et les premiers résultats obtenus.

L'IDSA, l'HAS et la SPILF proposent des référentiels pour orienter les professionnels de santé dans leur choix de prise en charge.

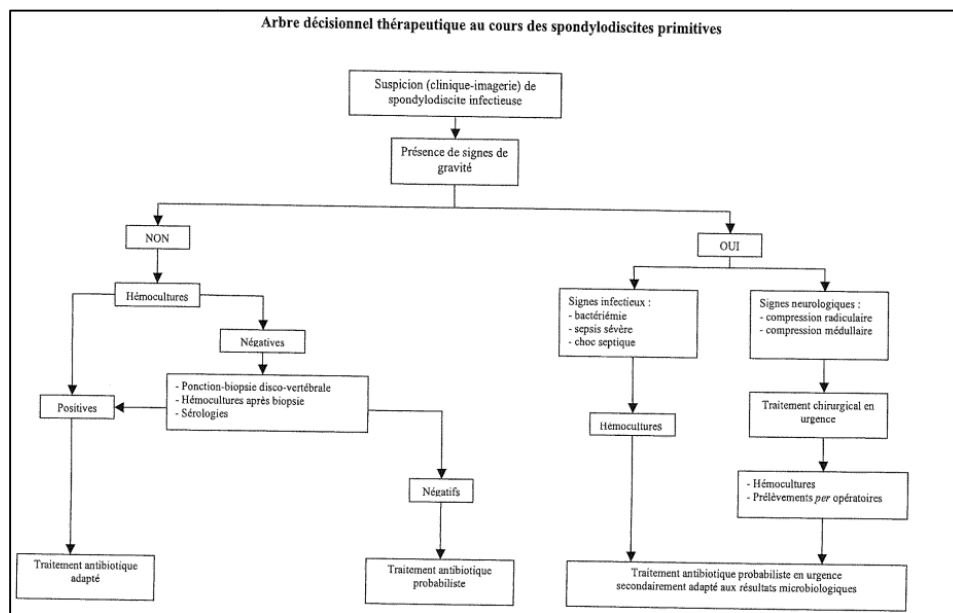


Figure 15 : Arbre décisionnel thérapeutique proposé par la SPILF dans le cadre des spondylodiscites primitives (2007)(67)

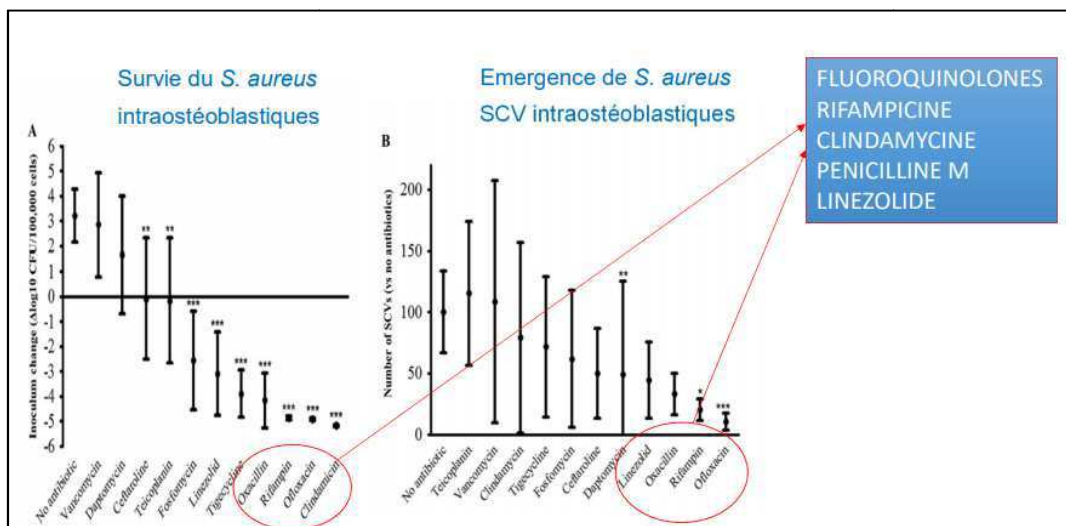
### 1.5.2. Traitements médicamenteux

On distingue l'antibiothérapie probabiliste, curative et suppressive.

L'antibiothérapie sera débutée une fois tous les prélèvements microbiologiques effectués. Dans le cas d'une urgence thérapeutique (arthrite septique et/ou suspicion de bactériémie associée et/ou choc septique), on procède à une antibiothérapie probabiliste via des bêta-lactamines et/ou gentamicine et/ou glycopeptides en intra-veineuse. Ces cas sont de véritables urgences diagnostiques et thérapeutiques du fait de leur morbidité potentielle donc sans attendre le résultat des examens bactériologiques, on donne un antibiotique à large spectre pour diminuer l'inoculum bactérien tout en étant le plus bactéricide possible sur les bactéries en croissance stationnaire et exponentielle.

S'il n'y a pas d'urgence thérapeutique on attend les résultats microbiologiques pour déterminer avec précision l'antibiotique le plus adapté pour la guérison et la préservation fonctionnelle optimale. Les antibiotiques sont choisis en fonction de la sensibilité de l'agent infectieux à l'antibiotique en question (déterminée lors de l'antibiogramme), de la biodisponibilité (la diffusion dans les sites infectés varie : globalement il y a une bonne diffusion dans le liquide articulaire mais c'est beaucoup moins évident au niveau osseux), de la tolérance du traitement par le patient. Se posent aussi les questions de la voie et de la durée de traitement.

On cherche un antibiotique qui soit efficace sur l'espèce bactérienne (la CMI doit être optimale), sur sa phase de réplication (SCV, biofilm), sur la localisation du micro-organisme, sur la stabilité vis-à-vis des mutations résistantes. L'utilisation d'antibiotiques actifs sur les bactéries en phase stationnaire doit être favorisée : rifampicine (elle est bactéricide et diminue considérablement l'émergence de SCV), et fluoroquinolones par exemple.





*Figure 16 : Graphiques montrant l'influence de divers antibiotiques dans la survie intracellulaire et l'émergence de SCV de S. aureus(14)*

Comme nous l'avons dit plus haut, la diffusion osseuse du principe actif varie selon l'antibiotique, ainsi la biodisponibilité des fluoroquinolones, par exemple, est excellente, tandis qu'elle est faible pour les aminoglycosides.(68)

D'après Senneville(69)et la SPILF(2) :

- La diffusion est supérieure à 30%, donc excellente pour : les fluoroquinolones, lincosamides, rifampicine, acide fusidique, fosfomycine, métronidazole, linézolide.
- La diffusion est considérée comme moyenne (15-30%) : bêta-lactamines, glycopeptides, cotrimoxazole, phénicolés.
- La diffusion est faible (< 15%) pour les aminoglycosides et les inhibiteurs de bêta-lactamase.

La biodisponibilité varie aussi en fonction de la voie d'administration : 100% pour la voie IV, plus variable pour la voie orale : les molécules les mieux assimilées étant les fluoroquinolones, la rifampicine, la clindamycine et les moins bien absorbées étant la gentamicine et la pénicilline G. Enfin, d'autres paramètres, intrinsèques au patient, influencent la pharmacocinétique (l'âge, une éventuelle insuffisance rénale ou hépatique, le poids, les médicaments associés, etc...).

L'association de plusieurs antibiotiques permet de contrer l'émergence de mutants résistants et d'obtenir une synergie d'action pour enrayer l'infection au plus vite. La SPILF(2) dans ses recommandations de 2009, insiste sur le fait que dans le cas d'une infection à staphylocoque il ne faut jamais utiliser seul(s) la rifampicine, l'acide fusidique, les fluoroquinolones et la fosfomycine, mais bien associer entre eux plusieurs antibiotiques. L'antibiothérapie curative est associée si besoin à un traitement chirurgical.

L'antibiothérapie suppressive (ABS), par Bactrim® (association de sulfaméthoxazole et de triméthoprime) par exemple, est une alternative au traitement médico-chirurgical des infections de prothèse articulaire si le patient refuse l'opération ou que celle-ci est contre-indiquée (patient très âgé).(70)

La durée de l'antibiothérapie varie de quelques jours à des années. S'il s'agit d'une IOAP l'antibiothérapie est longue : de 6 semaines à 3 à 6 mois, voire au-delà avec une administration IV au départ (durant 3 à 4 semaines pour diminuer le plus rapidement possible la concentration bactérienne, or les concentrations osseuses dépendent des concentrations sériques et la biodisponibilité en IV est de 100%).(71)

La voie d'administration, orale ou intraveineuse, ne dépend pas de la gravité de l'infection mais du type d'antibiotique utilisé. Certaines infections seront traitées pendant toute leur durée par voie veineuse, d'autres par voie orale. D'autres infections encore, nécessiteront un traitement par voie veineuse initialement (la présence d'hémocultures positives évocatrice d'une phase bactériémique, impose de réaliser une antibiothérapie bactéricide par voie parentérale dans la période initiale), puis un relai par voie orale.

Certains autres antibiotiques commencent à être plus largement utilisés dans les IOA, tels que la daptomycine ou le linézolide.

### **1.5.3. Traitement chirurgical**

Selon la gravité de l'infection, le contexte, la présence ou non de matériel d'ostéosynthèse ou de prothèse, un traitement médical peut ne pas suffire et il faut utiliser la chirurgie pour éliminer le foyer infectieux.

On peut citer par exemple deux modalités de changement de prothèse(1) :

- Changement de prothèse articulaire en 1 temps : Le chirurgien procède au nettoyage de la cavité articulaire, à l'ablation de la prothèse infectée, au traitement des lésions osseuses et durant la même opération, à la réimplantation d'une nouvelle prothèse.
- Changement de prothèse articulaire en 2 temps : Lors de la première opération, le chirurgien procède au nettoyage de la cavité articulaire, à l'ablation de la prothèse infectée puis au traitement des lésions osseuses. La cavité articulaire est parfois comblée par une entretoise temporaire. Puis, quelques semaines ou quelques mois après, le chirurgien procède à une seconde opération où il réalise un nouveau nettoyage, l'ablation de l'entretoise, la reconstruction articulaire (avec parfois une greffe osseuse) et la réimplantation d'une nouvelle prothèse.

### **1.5.4. Suivi**

A la suite du traitement médico-chirurgical, un suivi clinique, biologique, pharmacologique et radiographique est mis en place au travers des consultations de contrôle réunissant médecins et chirurgiens de l'hôpital, conjointement avec le médecin traitant. En effet, malgré une prise en charge optimale, il est possible que le patient rechute (en raison de bactéries fastidieuses et fréquemment récidivantes généralement impliqués dans ces pathologies) ou d'une mauvaise observance. Ce suivi dure en moyenne 2 ans.

### **1.5.5. Rôle du pharmacien d'officine**

Le rôle des pharmaciens dans la prise en charge des infections ostéo-articulaires avec ou sans matériel, est important. Outre les praticiens hospitaliers présents dans les laboratoires de bactériologie, les pharmaciens d'officine ont, eux aussi, un rôle clé.

Ils peuvent être le premier maillon du système de santé à détecter une éventuelle infection si, au comptoir le patient mentionne des signes cliniques évocateurs. Ils peuvent ainsi orienter le patient vers une prise en charge hospitalière, mentionner l'existence des Centres Régionaux comme le CRIOGO, pour une infection ostéo-articulaire complexe.

Ils ont un rôle à jouer plus particulièrement à la sortie de l'hôpital, lors de la dispensation des traitements puisqu'à la délivrance s'ajoutent les conseils pour une optimisation thérapeutique. Ils participent à la continuité des soins ville-hôpital.

## **2. Travail expérimental**

### **2.1. Objectifs de l'étude**

L'objectif principal était d'évaluer les performances de la méthode d'ensemencement de flacons à hémocultures pour l'optimisation du diagnostic rapide des infections ostéo-articulaires. On a donc enregistré le délai de détection des cultures pour les flacons aérobie et anaérobies ensemencés avec des prélèvements de liquide articulaire ou de broyat d'os, et on l'a comparé aux méthodes de culture sur milieux gélosés.

On voulait en premier lieu comparer les taux et délais de positivité des différents examens bactériologiques : examen direct, culture en milieux gélosés et en flacons à hémocultures aérobie et anaérobie.

On souhaitait étudier l'influence de l'origine du prélèvement (liquide synovial ou broyat d'os) et du résultat de l'examen direct sur le délai de positivité des cultures bactériennes, ainsi que l'impact de l'étiologie bactérienne et de l'atmosphère respiratoire des flacons à hémocultures, sur ce délai de détection de la croissance bactérienne.

Enfin, on voulait comparer le délai de positivité des flacons à hémocultures (BACTEC Plus Aerobic/F et BACTEC Lytic/10/Anaerobic/F) lus en continu par l'automate, et des milieux de culture gélosés conventionnels analysés par mirage toutes les 24H par les techniciennes de laboratoires

### **2.2. Matériels et Méthodes**

#### **2.2.1. Patients**

Cette étude épidémiologique a été menée au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Pontchaillou à Rennes, en Ille-et-Vilaine (35) sur des patients ayant subi des prélèvements ostéo-articulaires et des ponctions de liquide articulaire au CHU entre février 2015 et octobre 2016. Le CHU de Rennes est Centre National de Référence pour les Infections Ostéo-Articulaires. Avant l'étude, les praticiens avaient été informés des méthodes d'analyse qui seraient mises en œuvre et des conditions nécessaires à la collecte d'échantillons cliniques.

Ont été retenus tous les prélèvements bactériologiques réalisés entre février 2015 et octobre 2016 ayant un code d'IOA : POA ou LAR.

Les prélèvements pluri microbiens ont été exclus de l'étude qui recense donc 496 prélèvements recueillis chez 305 patients (étant données les recommandations du REMIC certains patients ont eu plusieurs prélèvements). On dénombre 246 liquides synoviaux et 250 prélèvements de ponctions et biopsies osseuses.

Le recueil des données (qui comprend la quantité de colonies bactériennes visibles à l'examen direct, puis en culture aérobie sur boîte, le nombre d'hématies et de leucocytes

ainsi que les temps de pousse, le type d'articulation prélevée et la présence éventuelle de prothèse ou d'ostéosynthèse) a été réalisé (de manière prospective) par les externes en pharmacie présents dans le service, dans le cadre de leur stage hospitalo-universitaire, obligatoire lors de la cinquième année du cursus de Pharmacie.

## **2.2.2. Traitement des prélèvements**

On a pris en charge l'analyse bactériologique des prélèvements ostéo articulaires selon la procédure LBM IT 00685 version 04 et les recommandations du REMIC 2010 (4<sup>e</sup> version). Cette procédure décrit le traitement des prélèvements osseux (biopsies osseuses, fragments d'os, produits d'alésage) et des liquides articulaires. Des prélèvements étagés, idéalement au nombre de 5, ont été réalisés au bloc opératoire. Les liquides articulaires étaient ponctionnés en radiologie (ponction radio-guidée) ou dans un service médico-chirurgical. La réalisation technique de l'analyse était effectuée par les techniciens habilités et les résultats étaient validés par les biologistes.

### **2.2.2.1. Prélèvements**

Les os, fragments d'os, biopsies osseuses, produits d'alésage, tendons ont été placés dans un flacon stérile ou une bouteille en HDPE stérile de 30 mL.

Les liquides articulaires étaient eux, placés dans un tube hépariné et un tube type Falcon stériles ou une bouteille en HDPE 30 mL stériles.

Les prélèvements étaient conservés à température ambiante, et on ensemençait dans les 2h suivant le prélèvement.

La recherche de Mycobactéries a été réalisée uniquement sur prescription médicale ciblée, pour cette analyse les prélèvements étaient conservés à 4°C.

Chez les enfants de moins de cinq ans une recherche de *Kingella kingae* était systématiquement effectuée sur le liquide articulaire, par une PCR.

### **2.2.2.2. Examen direct : Numération cellulaire et GRAM**

Un examen direct a été effectué, avant le broyage, directement sur un frottis de l'échantillon coloré par la coloration de Gram.

Pour les liquides articulaires on a utilisé la technique de numération des éléments en cellule à usage unique (Kova-Slide). La formule sanguine se faisait après cyto centrifugation : la centrifugeuse plaque les cellules de manière homogène en divers endroits de la lame et absorbe le liquide résiduel, donnant ainsi une excellente représentation des types de cellules, une meilleure vision des noyaux et préservant l'intégrité cellulaire. Pour les liquides

articulaires et les biopsies osseuses on a effectué une coloration de GRAM à partir d'une pastille cyto centrifugation ou directement sur frottis quand le prélèvement était visqueux.

### **2.2.2.3. Broyage**

Tous les prélèvements d'os et de liquide articulaire ont été broyés selon la technique décrite précédemment.(60)

Pour le broyage on a utilisé un broyeur Retsch MM400, des tubes contenant 10 billes INOX AISI 304 Grade 1000 (afbma) dans 10 ml d'eau distillée (qualité biologie moléculaire). Ces tubes étaient stérilisés au laboratoire de Bactériologie et conservés à température ambiante près du broyeur durant 3 mois maximum, avant d'être stérilisés à nouveau. On vidait les tubes contenant l'eau et les billes en inox dans le pot du prélèvement puis on versait l'ensemble dans des pots de 30 ml stériles qu'on introduisait dans le broyeur.

### **2.2.2.4. Ensemencement et cultures**

L'ensemble des cultures a été effectué sous un PSM nettoyé et vidé, avec des gants et un masque en respectant les bonnes pratiques d'asepsie et d'organisation du travail.

#### **2.2.2.4.1. Milieux solides**

A partir du pot qui contenait les 10 ml de broyat ou le liquide articulaire, on a ensemencé (isolement en quadrant) différents milieux gélosés avec 50 µl de broyat (1 goutte à la pastette à embout large) :

- Gélose au sang
- Gélose chocolat PolyViteX

Pour ces deux milieux l'incubation se faisait sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> durant 72H et la lecture était effectuée quotidiennement par les techniciennes. On détectait ainsi les bactéries Aérobie Strictes et AAF.

Une deuxième gélose au sang était ensemencée et incubée sous atmosphère anaérobie pendant 5 jours, et lue à J2 et à J5, pour détecter d'éventuelles bactéries Anaérobies strictes (et les AAF).

#### **2.2.2.4.2. Milieux liquides**

On a ensemencé avec 1ml de broyat un milieu VF (Viande Foie), pour déterminer le type respiratoire de la bactérie. Ce milieu a été placé en incubation aérobie pendant 10 jours avant d'en lire le résultat.

A partir de chaque prélèvement on a inoculé 3ml de broyat par flacon Bactec aérobie (BD BACTEC™ Plus Aerobic/F)(AE) et Anaérobie (BD BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F)(ANA) avec des aiguilles type 1,2 x 40. Les flacons anaérobies Lytic / F ont été

utilisés préférentiellement par rapport aux flacons Plus anaérobies / F, car le taux de récupération des bactéries et des levures s'est révélé nettement supérieur à celui des flacons Plus anaérobie / F, tandis que les flacons Plus aérobie / F et Anaerobic Lytic étaient plus performants. Les fioles / F étaient équivalentes (Rocchetti et al. 2016).

Les flacons étaient ensuite incubés dans des chambres automatiques (Bactec® FX, Becton Dickinson) pendant 10 jours et la détection se faisait automatiquement.

On préparait également 1 microtube contenant au minimum 500 µl de broyat pour la Biologie Moléculaire éventuelle. Il était conservé au congélateur (- 20°C).

On a noté pour tous les prélèvements le temps d'incubation nécessaire à la positivité de l'échantillon.

#### **2.2.2.5. Suivi des géloses et flacons**

Pour les milieux gélosés on a procédé à une identification bactérienne pour chaque morphotype de colonie différent observé sur chaque prélèvement.

Si les géloses et les flacons étaient positifs on faisait une coloration de GRAM sur les flacons, et s'il y avait une concordance on conservait les flacons à température ambiante. S'il y avait une discordance entre boîtes et flacons (des espèces ou un nombre d'espèces différents) on refaisait une culture à partir des flacons positifs.

Si les boîtes étaient négatives, contrairement aux milieux liquides, on refaisait un GRAM et on remettait en culture les flacons positifs.

L'intégralité des souches est conservée en bouillon glycérolé au congélateur pendant 10 ans.

#### **2.2.2.6. Identification bactérienne**

Les bactéries ont été identifiées à partir de colonies uniques par la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF (MALDI-TOF Biotyper, Bruker®) ou par PCR 16S.(48,60)

### **2.2.3. Méthodes statistiques**

Le logiciel d'analyse statistique utilisé était SPSS-statistics 19.0. Les variables de continuation ont été exprimées en médiane  $\pm$  inter-quartile. Le test de Kolmogorov-Smirnov a été utilisé pour déterminer si la population respectait une distribution gaussienne (en termes d'âge et de temps de pousse des hémocultures).

On a procédé à une ANOVA par rang de Fiedman pour comparer les variables quantitatives (temps de positivité des flacons BACTEC Aérobie, Anaérobie, et de la gélose). Le test non paramétrique de Wilcoxon (ou Mann-Whitney) a été utilisé pour comparer les variables

continues.

Les variables qualitatives ont été exprimées sur n (%). Un test de Chi-carré ou de Fischer (si l'effectif théorique était inférieur à 5) a été utilisé pour comparer des variables qualitatives (la proportion de positivité des milieux de culture).

Les différences étaient considérées comme significatives si  $p < 0,05$ .

## 2.3. Résultats

### 2.3.1. Population étudiée et étiologie bactérienne des infections ostéo-articulaires

Cette étude recense 496 prélèvements mono microbiens prélevés chez 305 patients. Parmi nos patients 67,5% étaient des hommes et 32,5% des femmes, l'âge médian était de 65 ans. On a recensé 246 échantillons de liquides synoviaux et 250 broyat d'os. On retrouvait 46 espèces bactériennes avec une majorité de bactéries Gram positif : 311 prélèvements positifs à *Staphylococcus sp* dont 178 étaient des *Staphylococcus aureus*.

En deuxième étiologie bactérienne (n= 133) on retrouvait les *Staphylococci* à coagulase négative (SCN) dont *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdu* et *S. warneri*. Venaient ensuite les streptocoques au nombre de 58 (principalement  $\beta$ -hémolytiques avec *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*... mais aussi des streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques avec *S. pneumoniae* et les streptocoques oraux dont *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. salivarius*) et des entérocoques (n= 3). Concernant les autres Gram + retrouvés dans les liquides synoviaux et broyat d'os on peut citer les Cutibacterium acnes (n = 43), et d'autres bactéries moins fréquentes (*Actinomyces*, *Fingoldia*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Granulicatella*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Aerococcus*, *Bacillus*).

On a recensé 64 prélèvements de bactéries Gram négatif dont 43 échantillons positifs aux entérobactéries (*E. coli*, *K. oxytoca*, *Enterobacter sp.*, *Pantoea agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marescens*, *Morganella morganii*) et 21 échantillons avec d'autres bactéries gram négatif (dont *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter fetus*, *Moraxella catarrhalis* et *Neisseria gonorrhoeae*).

### 2.3.2. Taux et délais de positivité des différents examens bactériologiques

L'examen direct était positif pour 99/496 isolats (20,0%) dont 56 liquides synoviaux (soit 22,8% de l'ensemble des liquides synoviaux) et 43 broyats d'os (17,2% de l'ensemble des ponctions ostéo-articulaires). Il y avait un meilleur taux de positivité des flacons aérobie (83,3%) qu'anaérobie (80,4%), néanmoins, la culture sur gélose est plus sensible (87,5%). En revanche, concernant le délai de positivité, il apparaît évident que les flacons à



hémoculture aérobie et anaérobie, dont les délais de détection médians sont respectivement de 13h et 15h, sont plus intéressants que la culture sur milieux gélosés qui n'est détectée par mirage que toutes les 24h.

### 2.3.3. Taux de récupération et pourcentage de microorganismes en fonction du milieu de culture (tableau 1)

Le taux de récupération et le pourcentage de micro-organismes identifiés ont été testés pour un ensemencement dans des flacons d'enrichissement anaérobie (BD BACTEC™ Plus Aerobic / F) (AE) (BD BACTEC™ Lytic / 10 Anaerobic / F) (ANA) et sur milieu d'agar.

Une différence significative a été observée entre les deux flacons pour l'espèce anaérobie *C. acnes*, récupérés dans un flacon anaérobie (95% des cas contre 11,9% dans des flacons aérobies) ( $p = 0,23$ ).

Une meilleure récupération a également été observée dans une fiole aérobie pour *Streptococcus sp* : 94,8% de récupération en flacon aérobie au lieu de 82,8% en milieu anaérobie ( $p = 0,07$ ). C'est aussi le cas pour les staphylocoques qui poussent mieux en milieu aérobie (89,4% de croissance, tous staphylocoques confondus) qu'anaérobie (83,3%).

Concernant les bactéries GRAM négatif : on a un meilleur taux de récupération en flacon Aérobie : 95,3% des entérobactéries poussent en flacon aérobie tandis que 79% poussent sur flacon Anaérobie. Mais la différence est particulièrement significative pour les autres bactéries à GRAM négatif détectés dans notre étude (*Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella*) puisqu'on a un taux de récupération en flacon Aérobie qui est doublé par rapport au flacon Anaérobie (85,7% au lieu de 42,9%). (Tableau 2)

Outre la comparaison des performances des deux flacons en matière de récupération des bactéries on a également comparé la performance du flacon le plus efficace avec le milieu d'agar. On voit que pour les *Cutibacterium acnes* la différence est significative ( $p = 0,23$ ), en effet seuls 6 des 43 prélèvements poussent sur milieu d'agar. Pour les autres types de bactéries le taux de récupération en milieu d'agar reste élevé, mais on ne tient pas compte ici du délai de positivité de ces milieux conventionnels.

15,5% des micro-organismes ont été identifiés uniquement à partir de flacons aérobies et 12,7% uniquement à partir de flacons anaérobies, ce qui indique qu'il est important d'utiliser les deux conditions atmosphériques pour une détection optimale. 2,6% des micro-organismes n'ont été identifiés que grâce aux cultures solides, les prélèvements avaient été retrouvés positifs à *C. acnes* (n=1), *S. aureus* (n=4), *S. hominis* (n=1), *S. Warneri* (n=3), *S. Epidermitis* (n=2), *S. Dysgalactiae* (n=1), *S. Pyogenes* (n=1). On note que parmi ces derniers, seuls les streptocoques présentaient un examen direct positif. Dans tous les autres

cas, le fait que seule les bactéries soient uniquement retrouvés sur la gélose pose la question d'une éventuelle contamination de ces milieux lors de l'ensemencement, ce serait donc de simples Faux Positifs.

### **2.3.4. Influence de divers facteurs sur le délai de positivité des flacons à hémocultures :**

#### **- Temps de détection en fonction du type d'échantillon (liquide synovial ou échantillons broyés) :**

Toutes espèces bactériennes combinées, le temps de détection était de 13h (8-23) dans BACTEC™ Plus Aerobic / F, de 15h [9-30] dans Lytic / 10 Anaerobic / F et de 24,0h [24-48] sur gélose. , attestant d'une récupération plus rapide dans les flacons de Bactec ( $p < 0,001$ ).

Aucune différence n'a été observée entre les deux types d'échantillons ( $p > 0,05$ ). Dans BACTEC™ Plus Aerobic / F, le temps de détection était de 12,0h [7.3-18.1] dans le liquide synovial et de 13,5h [9.1-24.1] dans les échantillons broyés. Dans Lytic / 10 Anaerobic / F, le temps de détection était de 13,2h [7.2-28.0] dans les liquides synoviaux et de 16,0h [9,9 à 31,0] dans les échantillons broyés. Sur le milieu gélosé, le temps de détection était de 24,0h [24-48] à partir du liquide synovial et de 24,0 [24-48] à partir d'échantillons broyés.

#### **- Délai de détection en fonction de l'examen direct :**

Le temps de positivité était toujours significativement corrélé à la positivité de l'examen direct. Lorsque l'examen direct était positif, le temps de détection était de 6,6h [5.2-10.5] dans BACTEC™ Plus Aerobic / F, de 8.4h [5.2-14.2] dans Lytic / 10 Anaerobic / F et de 24.0h [24-24] sur gélose.

Lorsque l'examen direct était négatif, le moment de la détection était de 15,4h [10,4-27,2] dans BACTEC™ Plus Aerobic / F, 17,6 [11,1-37,1] dans Lytic / 10 Anaerobic / F et 24 [24-48] sur gélose.

#### **- Délai de détection en fonction de l'espèce et de l'atmosphère de la culture (tableau 2)**

Tous les organismes aérobies ou aérobies facultatifs ont été détectés en moins de 43,8h et 30h respectivement dans des flacons aérobies et des flacons anaérobies. Le temps de détection positif était toujours significativement plus rapide dans les flacons que sur le milieu d'agar ( $p < 0,001$ ) à l'exception de *C. acnes*. *C. acnes* ont été détectés en 240h [67,5-246] dans des flacons aérobies, 126h [99-183,75] en flacons anaérobies et en 84h [24-102] sur des milieux en gélose, ce qui a été considéré comme non significativement différent ( $p = 0,345$ ). .

Le nombre d'espèces isolées identifiées à partir de flacons aérobies (BACTEC™ Plus aéro-bique / F) et anaérobies (BACTEC™ Lytic / 10 anaérobie / F), ainsi que leur délai de détec-

tion ont été décrits dans les **figures 1 et 2**. On voit notamment sur ces figures que la majorité des staphylocoques poussent entre 16 et 48h, et ce quelque soit l'atmosphère respiratoire du flacon observé. Concernant les espèces Gram négatif, elles poussent presque exclusivement durant les 24 premières heures d'incubation, tout comme les streptocoques. On remarque également que les bactéries gram négatif poussent plus facilement sur le flacon aérobie qu'anaérobie, comme l'ensemble des bactéries, mis à part les *Cutibacterium acnes*. Ces derniers, étant donné leur type respiratoire anaérobie strict, ne poussent que sur les flacons anaérobies au bout d'au moins 72h d'incubation (et plus généralement 5 jours). Au cours de notre étude certains *Cutibacterium acnes* ont exceptionnellement été mis en évidence sur milieu d'hémocultures aérobie au bout de 144h d'incubation, cela pose la question d'une éventuelle contamination.

### **Comparaison des délais de détection toutes espèces confondues, des milieux gélosés avec les milieux liquides (flacons à hémocultures) tableaux 3 et 4**

La différence de délai de détection entre les flacons d'enrichissement BD BACTEC™ Plus aérobie / F (AE) ou anaérobie (BD BACTEC™ Lytic / 10 anaérobie / F) (ANA) et le milieu d'agar est présentée dans les tableaux 3 et 4.

On constate que dans 10% des cas les bactéries qui étaient détectés au bout de 48h sur milieu gélosés, étaient détectés précocement (dans les 24H) en flacons à hémoculture. Et c'est le cas pour 13% des cas en flacons anaérobies. Et il y a respectivement 3,6 et 3,4% de prélèvements, détectés au bout de 72h sur gélose, mais positifs en moins de 24h sur flacon d'hémocultures aérobie et anaérobie.

Lors de notre étude on a remarqué que pour les prélèvements détectés sur gélose et par flacon Aérobie, 77,6% sont détectés en 24h ou moins sur flacon d'hémoculture Aérobie alors que seuls 66,15% reviennent positif à la lecture du milieu gélosé à 24H.

En atmosphère Anaérobie, 75,2% des prélèvements sont détectés en 24h ou moins alors que seuls 69,5% sont positifs sur gélose à 24H.

## 2.4. Discussion

Les étiologies bactériennes retrouvées dans nos échantillons sont conformes aux données de la littérature : Titécat(63) retrouvait une majorité de *S. aureus* (27%), de Staphylocoques à coagulase négative (54%), d'entérobactéries (12,5%) et de *C. acnes* (5,8%). De la même manière Bémer(60) retrouvait, dans les IPOA monomicrobiennes, une majorité de *S. aureus* (40%), *S. epidermidis* (17%), autres SCN (8%), mais aussi 14% de streptocoques et entérocoques, 10% de BGN (*P. aeruginosa* et entérobactéries) et 8% de bactéries anaérobies (majoritairement *C. acnes*).

On retrouve néanmoins plus de *C.acnes* (8,6%) que la moyenne, nous nous sommes donc penchés sur l'origine de ces prélèvements. Rappelons que notre étude recense, sans distinction de pathogénicité, tous les prélèvements de liquides synoviaux et de broyats d'os pour lesquels une culture bactérienne a été détectée sur au moins un milieu de culture (solide ou liquide). L'étude de Sampedro(72) réalisée sur 61 isolats de *C.acnes* isolés d'un prélèvement orthopédique montrait que suivant leur phylotype tous les *C. acnes* n'étaient pas pathogènes et responsables d'infections, il s'agissait parfois de simples agents ayant colonisé le milieu de culture. Au cours de notre étude, 93% des flacons anaérobies ensemencés par ces 43 isolats étaient positifs, 11,6% des flacons aérobies étaient positifs : en effet, *C. acnes* est un bacille anaérobie préférentiel aérotoleérant. 50% des isolats provenaient de patients avec du matériel (prothèse, ostéosynthèse). Les isolats retrouvés positifs sur gélose (11,6%) provenaient tous de patients avec du matériel (épaule ou rachis. Les isolats positifs sur flacon aérobie poussaient tous, à l'exception d'un seul, sur flacon anaérobie mais pas sur gélose. Dans les cas où un seul milieu de culture révèle la présence de *C. acnes* l'hypothèse d'une contamination peut être émise. Il faut donc tenir compte du contexte clinique et pas uniquement des résultats microbiologiques.

L'examen direct est considéré comme peu sensible, le taux de positivité variant de 10 à 30%(53), ce que confirment nos travaux (20% de positivité).

Le broyage par billes stériles est connu pour améliorer le taux de récupération des germes (la sensibilité de la culture après broyage est 83,7% au lieu de 60,8% en culture seule) avec un taux de contamination évalué à 8,7%(43).

Concernant l'intérêt comparé des flacons à hémoculture et des milieux gélosés en termes de positivité des échantillons, Bémer(60) et le groupe CRIOGO ont montré un taux de positivité de 69% sur les géloses au chocolat, 70,1% sur les géloses au sang, 68,8% sur bouillon de Schaedler et 83% dans les flacons BACTEC, ce qui est conforme à nos résultats. Les performances des milieux liquides enrichis ont été testées sur divers échantillons.

Caldero(73) a montré, pour des échantillons de LCR, que la récupération était meilleure sur flacons BACTEC (95,8%) que sur les milieux gélosés (53,3%). Hughes et al(34) ont quant à eux, analysé des échantillons de matériel de chirurgie articulaire prothétique et ont constaté que les flacons BACTEC étaient plus sensibles (87%) que le bouillon d'enrichissement à la viande cuite (Cooked Meat Medium), (83%) et que le bouillon FAB (Fastidious Anaerobe Broth (57%), deux milieux liquides pour les bactéries anaérobies. Tous ces milieux d'enrichissement étaient très spécifiques (97-100%).

Outre la composition du milieu d'enrichissement et l'apport de la lecture en continu en temps réel par l'automate (alors que la lecture des géloses ne se fait qu'une fois par jour par les techniciennes de laboratoires de microbiologie), la sensibilité importante des flacons à hémocultures tient aussi au volume d'ensemencement. Mermel en 1993(74) démontrait déjà que la sensibilité des hémocultures était proportionnelle au volume d'ensemencement. Ce dernier est supérieur pour les milieux liquides (3 mL) par rapport aux milieux gélosés (50 µl) donc la sensibilité augmente : on détectera donc mieux les germes.

Toutes espèces confondues, nos isolats étaient détectés positifs sur gélose dans 87,5% des cas, sur flacon aérobie dans 83,3% des cas et sur flacon anaérobie dans 80,4% des cas. Les milieux de culture utilisés à l'heure actuelle sont cependant suffisamment performants pour qu'une majorité d'espèces bactériennes soit détectée. Mais on constate que toutes les espèces n'ont pas une aussi bonne détection dans tous les milieux. Comme l'a décrit Minassian(21), les deux flacons ne sont pas aussi performants pour toutes les étiologies bactériennes. Les germes AAF comme les staphylocoques et streptocoques poussent aussi bien en aérobose qu'en anaérobose mais pour des germes comme *C. acnes* (anaérobies préférentiels mais aérotolestants) le flacon anaérobie sera plus intéressant (93% de flacons anaérobies positifs et 11,6% de flacons aérobies positifs) tandis que les germes aérobies (*P. aeruginosa*) croissent préférentiellement dans les flacons aérobies.

Notre étude a montré que dans 15,5% des cas les microorganismes n'étaient détectés qu'en flacon aérobie et dans 12,7% des cas uniquement en flacon anaérobie.

Parmi les germes retrouvés uniquement en flacon aérobie et pas en anaérobie on a 20,8% de *S. aureus*, 29,9% de Staphylocoques à Coagulase Négative et pour le reste (près de 50%) il s'agit de *Bacillus licheniformis*, *Corynebacterium striatum*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium abscessus*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*. 75% des germes retrouvés uniquement en flacon anaérobie sont des *C. acnes* et des *S. epidermitis*, et pour les 25% restants il s'agit de *S. aureus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *C. fetus*, *Lactobacillus sp*, *Bacillus sp*, *Fingoldia magna*, *Clostridium paraputrificum*, *S. sanguis*. On peut donc dire que pour détecter le spectre bactérien le plus large possible il faut ensemercer à la fois des flacons aérobies et anaérobies.

Néanmoins, outre la sensibilité des milieux de culture il convient de prendre en compte le délai de détection des germes. Ce délai conditionne la rapidité du choix de l'antibiothérapie. Le caractère précoce de la prise en charge des infections ostéo-articulaires est d'autant plus important que ces pathologies peuvent dégénérer rapidement, occasionnant un handicap fonctionnel, voire dans certains cas, engageant le pronostic vital.

La nécessité d'une incubation prolongée de 14 jours a été recommandée par Schäfer et al (2008)(75) mais il a été prouvé que l'utilisation de flacons à hémocultures réduisait le temps d'incubation à moins de 14 jours avec un bon taux de récupération de la plupart des bactéries(21).

Dans son étude comparant l'efficacité et la rapidité de flacons à hémocultures avec les méthodes microbiologiques conventionnelles pour les milieux d'organoculture de milieux cornéens, Gain(30) constatait que les flacons à hémocultures étaient toujours détectés plus rapidement que les milieux gélosés (avec respectivement 95,5% et 65,2% de détection en 24H ou moins). Le gain de sensibilité était de 25% et le taux de contamination de 8%. Notre étude vient confirmer que dans la majeure partie des cas la détection en milieu d'enrichissement BACTEC précède la lecture des géloses (en aérobie 77,6% des isolats étaient positifs en 24H et 93% en 48H tandis qu'en anaérobie 75,2% des flacons étaient retrouvés positifs en 24H et 86,4% en 48H, toutes espèces confondues).

Expérimentalement, on a montré que toutes étiologies bactériennes confondues le délai de positivité médian était légèrement plus tardif en flacon Anaerobic Lytic/F (15.0h [9-30]) qu'en flacon Plus Aerobic/F (13h [8-23]) mais bien plus précoce que les milieux gélosés conventionnels (24.0h [24-48]) ( $p < 0.001$ ), attestant de l'intérêt d'ensemencer les flacons BACTEC pour accélérer le diagnostic. Et pour l'ensemble des bactéries à part *C.acnes* ( $p = 0,345$ ) le délai de détection sur flacons BACTEC est significativement plus rapide que les milieux d'agar ( $p < 0.001$ ).

## CONCLUSION

L'utilisation du BACTEC et du MALDI-TOF a permis de gagner un temps précieux pour la détection et l'identification des germes présents dans les échantillons de liquides synoviaux et de broyats d'os. La majorité des bactéries a été détectée en moins de 24H donc bien avant les milieux gélosés conventionnels, et ce grâce à la composition du milieu d'enrichissement des flacons à hémocultures et à la détection de la croissance bactérienne en temps réel par le système de détection automatisé BACTEC. L'utilisation du MALDI-TOF pour identifier directement les espèces incriminées, sur les milieux d'enrichissement, a également été déterminante pour le diagnostic précoce.

La détection et l'identification rapide des germes impliqués dans ces infections ostéo-articulaires a permis d'accélérer le choix et la mise en place de l'antibiothérapie la plus indiquée, et ainsi, d'améliorer le pronostic fonctionnel chez les patients.

On a constaté que dans 15,5% des cas les microorganismes n'étaient identifiés que dans les flacons aérobies et dans 12,7% des cas uniquement dans les flacons anaérobies : il apparaît donc nécessaire d'utiliser les deux conditions atmosphériques, et donc d'ensemencer un jeu de deux flacons par prélèvement, pour optimiser la détection de tous les germes impliqués dans les infections ostéo-articulaires.

## ANNEXES

Table 1

	Number of isolates	Recovery rate (%)				
		Plus Aerobic/F vials	Lytic/10 Anaerobic/F vials	<i>p</i>	Agar media	<i>p</i>
<i>Staphylococcus sp</i>	311	278 (89.4)	259 (83.3)	0,006	303 (97.4)	0,03
<i>S. aureus</i>	178	166 (93.3)	155 (87.1)	0,001	177 (99.4)	0,82
<i>Coagulase negative staphylococci (SCN)</i>	133	112 (84.2)	104 (78.2)	0,41	126 (94.7)	0,08
<i>Streptococcus sp.</i>	58	55 (94.8)	48 (82.8)	0,07	57 (98.3)	0,05
<i>Cutibacterium acnes</i>	43	5 (11.6)	40 (93)	0,23	6 (14)	0,23
<i>Enterobacteria</i>	43	41 (95.3)	34 (79.1)	-	42 (97.7)	-
Other Gram negative bacteria	21	18 (85.7)	9 (42.9)	0,47	19 (90.5)	-
All species	496	413 (83.2)	399 (80.4)	0,75	434 (87.5)	<0,001

Table 2

	Positive time to detection (h)			
	Plus Aerobic/F vials	Lytic/10 Anaerobic/F vials	Agar media	<i>p</i>
<i>Staphylococcus sp</i>	15.0 [9.0-25.0]	16.0 [11.0-27.0]	24.0 [24-48]	<0.001
<i>S. aureus</i>	10.0 [7.0-14.0]	12.0 [9.0-19.0]	24.0 [24-24]	<0.001
<i>SCN</i>	28.5 [21.0-43.8]	22.0 [18.0-30.0]	48.0 [24-72]	<0.001
<i>Streptococcus sp.</i>	9.0 [6.0-12.0]	8.0 [5.25-11.0]	24.0 [24-24]	<0.001
<i>Cutibacterium acnes</i>	240.0 [67.5-246]	126 [99-183.75]	84.0 [24-102]	0.345
<i>Enterobacteria</i>	9.0 [6.0-12.0]	7.5 [5.0-11.0]	24.0 [24-24]	<0.001
<i>Other Gram negative bacteria</i>	11.0 [4.75-14.0]	7.0 [5.0-11.5]	24.0 [24-48]	0.001
All	13.0 [8.0-23.0]	15.0 [9.0-30.0]	24.0 [24-48]	<0.001



Table 3

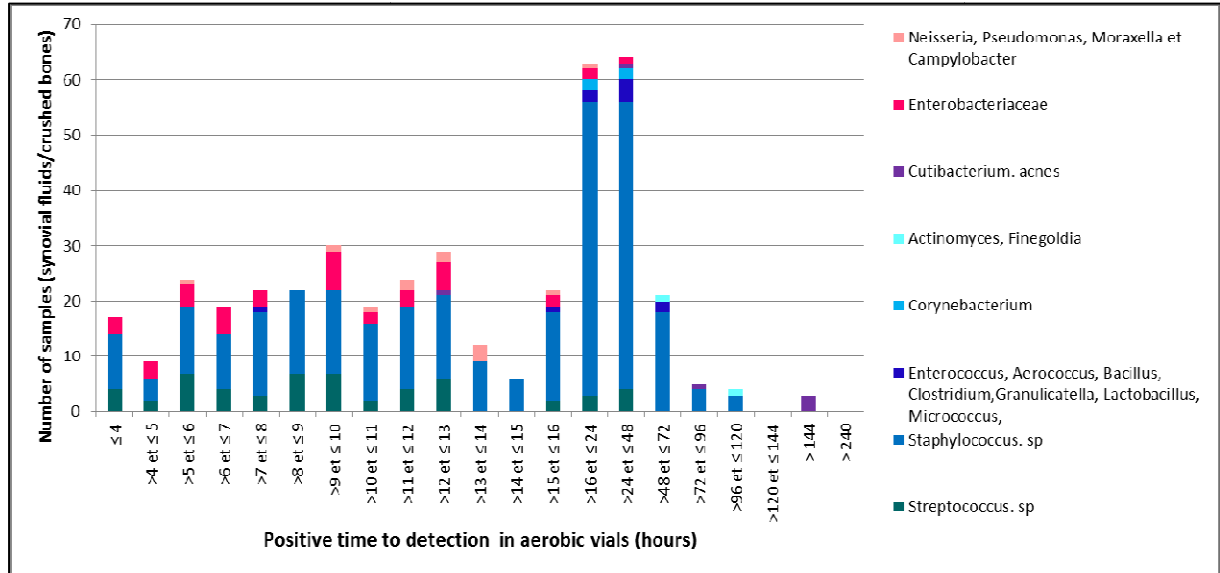
		Positive time to detection on Agar media					
		24h	48h	72h	96h	120h	> 144h
Positive time to detection in Aerobic vials	< or = 24h	244 (61,9%)	39 (9,9%)	14 (3,6%)	3 (0,75%)	4 (1%)	2 (0,5%)
	>24 or ≤ 48h	10 (2,5%)	43 (10,9%)	6 (1,5%)	2 (0,5%)	/	/
	>48 or ≤ 72h	4 (1%)	2 (0,5%)	16 (4,1%)	/	/	/
	>72 or ≤ 96h	1 (0,25%)	/	/	1 (0,25%)	/	/
	>96 or ≤ 120h	2 (0,5%)	1 (0,25%)	/	/	/	/
	>120 or ≤ 144	/	/	/	/	/	/
	>144h	/	/	/	/	/	/

Table 4

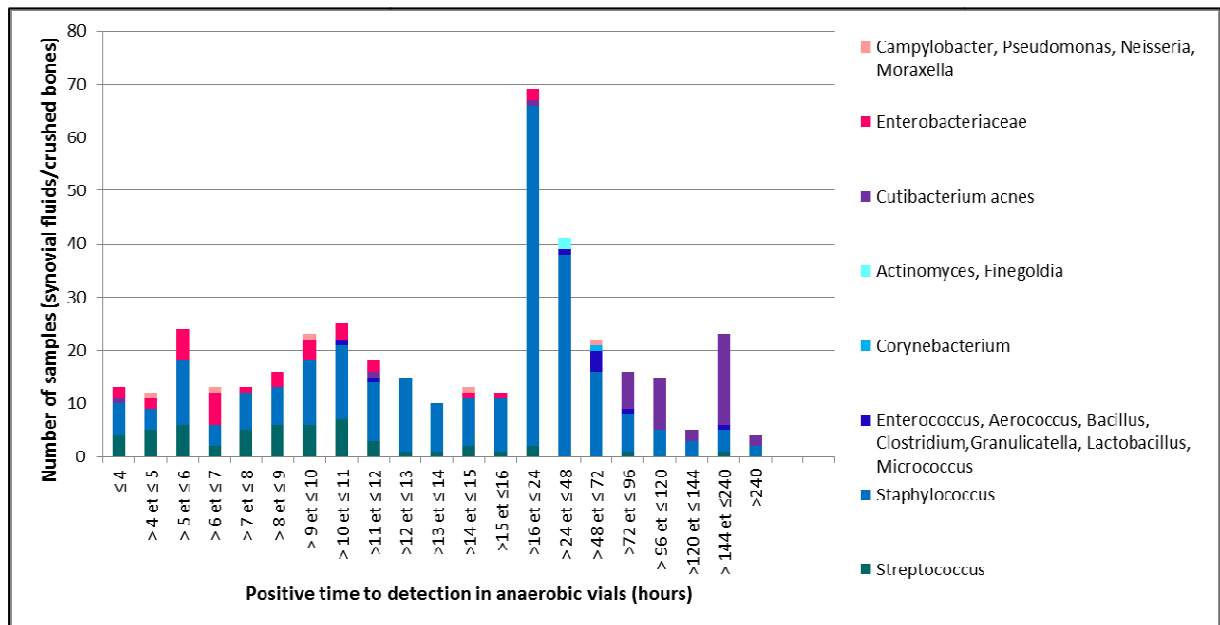
		Positive time to detection on Agar media					
		24h	48h	72h	96h	120h	> 144h
Positive time to detection in anaerobic vials	< or = 24h	198 (57,1%)	45 (13%)	12 (3,4%)	3 (0,8%)	1 (0,3%)	2 (0,6%)
	>24 or ≤ 48h	15 (4,3%)	14 (4%)	8 (2,3%)	2 (0,6%)	/	/
	>48 or ≤ 72h	7 (2%)	6 (1,7%)	4 (1,15%)	/	/	/
	>72 or ≤ 96h	9 (2,6%)	/	2 (0,6%)	/	/	/
	>96 or ≤ 120h	5 (1,4%)	1 (0,3%)	/	/	/	/
	>120 or ≤ 144	3 (0,9%)	1 (0,3%)	/	1 (0,3%)	/	/
	>144h	4 (1,2%)	3 (0,9%)	/	1 (0,3%)	/	/

Figure 1

A



B



**Positive time to detection of bone samples inoculated in enrichment vials (Bactec®) in aerobic versus anaerobic conditions**

Guillaume Coiffier<sup>1,2,3</sup>, Emmanuelle Ducasse<sup>4</sup>, Arthur Keraudren<sup>4</sup>, Emilie Prat<sup>4</sup>, Hortense Modeste<sup>4</sup>, Elise Recalt<sup>4</sup>, Jean-David Albert<sup>1,2,3</sup>, Olivier Loreal<sup>1</sup>, Pascal Guggenbuhl<sup>1,2,3</sup>, Anne Jolivet-Gougeon<sup>1,3,4,5\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM 1241 NUMECAN/ CIMIAD F-35000 Rennes, France

<sup>2</sup> Service de Rhumatologie, Hôpital Sud, CHU F- 35000 Rennes, France

<sup>3</sup> Centre de Référence en Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest (CRIOGO)

<sup>4</sup> Université de Rennes 1 F- 35000 Rennes, France

<sup>5</sup> Pole Biologie Rennes University Hospital, 35043, Rennes, France

**\*Corresponding author**

Anne Jolivet-Gougeon, INSERM NuMeCan/CIMIAD, Université de Rennes 1, 2, avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes, France

Phone: (33) 2 23 23 49 05 – Fax: (33) 2 23 23 49 13

E-mail: [anne.gougeon@univ-rennes1.fr](mailto:anne.gougeon@univ-rennes1.fr)

**ABSTRACT**

The performance of a pair of blood culture vials (BACTEC® Plus Aerobic/F, and Anaerobic Lytic/F) were analyzed with 496 bone clinical specimens (246 synovial fluids and 250 crushed bone samples), at the Teaching Hospital of Rennes (France). A total of 46 different bacterial and fungal species were identified, with *S. aureus* and beta-hemolytic *Streptococcus* as the most frequently detected. *C. acnes* were detected in anaerobic vials in 40 cases/ (95.2%) and also in aerobic vials in only 5 cases (11.9%). The positive time to detection was significantly shortened when vials were used compared to agar plates ( $p < 0.001$ ), except for *C. acnes* ( $p = 0.345$ ). Overall recovery rate of aerobic or microaerophilic bacteria was 18 (85.7%) and 9 (42.9%) in the Plus Aerobic/F vials and Anaerobic Lytic/F vials, respectively. Median positive time to detection was later with the Anaerobic Lytic/F vials (15.0 h) compared to the Plus Aerobic/F (13.0 h). Positivity rate was similar for Anaerobic Lytic/F vials (80.4%) and Plus Aerobic/F vials (83.2%) ( $p=0.25$ ). Some microorganisms were only identified from aerobic vials (15.5%) or from anaerobic vials (12.7%), indicating the importance of using both atmosphere conditions for optimal positive time to detection. This work confirms the interest in using both aerobic and anaerobic vials to optimize the positive time to detection of all microorganisms isolated from bone and joint infections.

**KEY WORDS:** bone infection; blood vials; positive time to detection

## 1. Introduction

The diagnosis of bone infections based on clinical, bacteriological, radiological and histological arguments, and its interpretation is facilitated by the publication of guidelines, such as the recommendations of the “Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française” (SPILF) (Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al., 2009) or the “Infectious Diseases Society of America” (IDSA) (Osmon et al., 2013).

It is therefore essential to make prolonged cultures beyond 7 days (Schafer et al., 2008), using an enrichment in liquid media (Minassian et al., 2014); that remains essential to allow growth of bacteria with a low inoculum in the sample, and to facilitate the growth of anaerobic bacteria, fastidious bacteria and "small colony variants".

The minimal microorganism concentrations required for positive blood culture using BACTEC FX were demonstrated to be  $>10^7$ - $10^8$  colony forming units/mL for most of the blood stream infection pathogens (Wang et al., 2015). For blood samples, the BACTEC FX systems yielded 100% positive signals at 30 CFU/mL, whereas there were 8.1% (11/135) false-negative results at 5 CFU/mL (Park, Han, & Shin, 2017). It is widely recognized that strict aerobic bacteria are not detected (or poorly detected) in anaerobic vials (as strict anaerobic bacteria are not detected (or poorly detected) in aerobic vials). These vials can contain additives to improve the level of detection, as saponin (Elliott et al., 1998) as a lysing agent or resins (Spaargaren, van Boven, & Voorn, 1998; Zadroga et al., 2013) to trap some antibiotics. However, this is often of no clinical significance, since the same organism had grown in the corresponding vial. Many studies demonstrated the importance of using blood vial to perform this enrichment step of bone or prosthetic joint samples (Alizadeh, Kabiri Movahed, & Mohammadnia, 2016; Rocchetti et al., 2016). But if this highlights the value of enclosing the two types of vials for optimum positive time to detection (Passerini et al., 2014), no study can attest the advantage to use both vials for diagnostic of bone and prosthetic joint infections.

The objective of this study was to evaluate the duration of incubation required for diagnosis of bone infections, using BD BACTEC FX instrumented blood system, by recording the time

to culture detection for both aerobic and anaerobic vials inoculated with crushed bone samples or synovial fluid samples, and compare them to standard culture method on agar media.

## **2. Material and Methods**

### *2.1 Design of the study*

A monocentric study was conducted at the University Hospital of Rennes (France). Bone samples (synovial fluids and surgery bone samples) were prospectively collected by surgeons, clinicians or radiologists. Practitioners have been, prior to the study, aware of the methods of analysis that would be implemented and the conditions necessary for collecting clinical samples. Synovial fluids and osteoarticular samples were routinely analyzed at the laboratory of Bacteriology (University Hospital of Rennes, France).

### *2.2 Direct examination*

Direct examination was performed, before crushing, directly on a smear of the specimen stained by Gram staining.

### *2.3 Cultures*

All samples were crushed as already described (Bemer et al., 2016). For each sample, 3mL of crushed sample were inoculated in each aerobic (BD BACTEC® Plus Aerobic/F)(AE) and anaerobic (BD BACTEC® Lytic/10 Anaerobic/F)(ANA) enrichment vials. Incubation was performed in automatic chambers for 10 days (BACTEC® FX, Becton Dickinson). The time to detection (hours) of positive vials was daily recorded. The time of positive growth on solid agar media (Bemer et al., 2016) was also recorded: two 50- $\mu$ l volumes were each spread onto a PolyViteX chocolate agar plate and incubated under a CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere for 3 days (to recover aerobic and facultative anaerobic bacterial species) and onto a blood agar plate incubated in an anaerobic atmosphere for 5 days (to recover strictly anaerobic and facultative aerobic bacterial species).

## 2.4 Bacterial identification

Each bacteria species was identified from a single colony by the MALDI-TOF mass spectrometry technique (Biotyper, Bruker®) or from pure cultures by 16SrDNA PCR if necessary (Bemer et al., 2014; Lallemand et al., 2017). Polymicrobial samples were excluded of the analyzed data.

## 2.5 Statistical analysis

The statistical analysis software used was SPSS-statistics 19.0. Continue variables were expressed on mean  $\pm$  SD. Wilcoxon non parameter test was used to compared continue variables. Qualitative variables were expressed on n (%). Chi-square or Fischer test (if theoretical effectif was lower than 5) was used to compared qualitative variables. Differences were considered significant if  $p < 0.05$ .

# 3. Results

## 3.1 Population studied

In this study, 46 bacterial species were identified from 496 samples (collected in 305 patients). Among the 496 samples, 246 were synovial fluids and 250 were crushed samples. The species identified were *Staphylococcus* (*aureus* and Coagulase negative Staphylococci, SCN), *Streptococcus* (*S.pyogenes*, *S.agalactiae*, *S.dysgalactiae*, *S.anginosus*, *S bovis complex*, *S.pneumoniae*, *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. salivarius*), *Enterococcus* sp., *Cutibacterium acnes*, *Enterobacteriaceae* (*E.coli*, *K.oxytoca*, *Enterobacter* sp., *Pantoea agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marescens*, *Morganella morgani*), *Campylobacter fetus*, *Pseudomonas aruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, and fungi or Mycobacteria.

## 3.2 Direct examination

Direct examination was positive for 99/496 isolates (20.0%) (51/305 patients; 16.7%),

considering the isolated bacterial species. For synovial fluid, positivity rate was 56/246 (22.8%) and for surgery samples was 43/250 (17.2%).

### 3.3 Recovery rate and percentage of microorganisms according to culture media (Table 1)

Recovery rate and percentage of microorganisms identified was tested in (BD BACTEC® Plus Aerobic/F)(AE), anaerobic (BD BACTEC® Lytic/10 Anaerobic/F)(ANA) as enrichment vials, and in agar media. A significant difference was observed between the two vials for the anaerobic species *C. acnes*, recovered in anaerobic vial (95% of cases *versus* 11.9% in aerobic vials) ( $p < 0.001$ ). A better recovery was also observed in aerobic vial for *Streptococcus* sp. ( $p = 0.04$ ), *Enterobacteria* ( $p = 0.03$ ) and other Gram negative bacteria ( $p = 0.004$ ) (Table 1). Some microorganisms were only identified from aerobic vials (15.5%) (*S. aureus*, *Negative Coagulase Staphylococci*, *Bacillus licheniformis*, *Corynebacterium striatum*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium abscessus*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*), or from anaerobic vials (12.7%) (*C. acnes*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *C. fetus*, *Lactobacillus* sp, *Bacillus* sp, *Fingoldia magna*, *Clostridium paraputrificum*, *S. sanguis*), indicating the importance of using both atmosphere conditions for optimal positive time to detection. These are essentially strict aerobic bacterial species in aerobic vials and strict anaerobic species for anaerobic vials. Only 2.6% of bacteria have only been identified on agar media: *C. acnes* (n=1), *S. aureus* (n=4), *S. hominis* (n=1), *S. warneri* (n=3), *S. epidermidis* (n=2), *S. dysgalactiae* (n=1), and *S. pyogenes* (n=1). Of these, only two species were also positive by direct examination and/or combined to positive blood cultures (*S. dysgalactiae* and *S. pyogenes*), but in all the other cases, contamination was widely suspected.

### 3.4 Positive time to detection

#### 3.4.1 Time to detection according to the type of sample (synovial fluid and crushed samples)

All bacterial species combined, the positive time to detection was 13h (8-23) in BACTEC®



Plus Aerobic/F , 15.0h [9-30] in Lytic/10 Anaerobic/F, and 24.0h [24-48] on agar media, attesting a faster recovery in BACTEC® vials ( $p < 0.001$ ). No difference was observed between the two types of samples ( $p > 0.05$ ). In BACTEC® Plus Aerobic/F, the positive time to detection was 12.0h [7.3-18.1] from synovial fluid and 13.5h [9.1-24.1] from crushed samples. In Lytic/10 Anaerobic/F, the time of detection was 13.2h [7.2-28.0] from synovial fluids and 16.0h [9.9-31.0] from crushed samples. On agar media, the positive time to detection was 24.0h [24-48] from synovial fluid and 24.0 [24-48] from crushed samples.

#### 3.4.2 Time to detection according to direct examination

The positive time to detection was always significantly correlated with the positivity of direct examination. When direct examination was positive, the positive time to detection was 6.6h [5.2-10.5] in BACTEC® Plus Aerobic/F, 8.4h [5.2-14.2] in Lytic/10 Anaerobic/F and 24.0h [24-24] on agar media. When direct examination was negative, the time of detection was 15.4h [10.4-27.2] in BACTEC® Plus Aerobic/F, 17.6 [11.1-37.1] in Lytic/10 Anaerobic/F and 24 [24-48] on agar media.

#### 3.4.3 Time to detection according to species and culture atmosphere (Table 2)

All of aerobic or facultative aerobic organisms were detected within 43.8h and 30h in aerobic vials and anaerobic vials, respectively. For an incubation period  $\leq$  to 24h, 77.6% of the aerobic vials versus 75.2% of the anaerobic vials were detected positive by the automated system. Only after a 48h-period of incubation, 93.1% of aerobic vials and 86.4% of anaerobic vials were positively detected. After 144 hours of incubation, only 2.3% of the anaerobic vials still came out positive from the automatic chamber (*C. acnes*).

Number of isolated species identified from Aerobic vials (BACTEC® Plus Aerobic/F) and Anaerobic vials (BACTEC®Lytic/10 Anaerobic/F), with their positive time to detection were described on Figure 1. No *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Neisseria* or *Moraxella* was detected after 48h and 72h incubation from aerobic and anaerobic vials, respectively. Between 96 and 144 hours of incubation, only 4 aerobic vials were detected positive (*Staphylococcus* sp.,  $n = 3$ ; *Actinomyces*,  $n = 1$ ), while 20 anaerobic

vials were detected positive (*C. acnes*, n = 12; *Staphylococcus* sp. n = 8). Beyond 144h of incubation, only 3 aerobic vials came out positive from the automatic chamber (*C. acnes* n = 3), against 27 anaerobic vials (*C. acnes*, n = 19; *Staphylococcus* sp., n = 6; *Streptococcus*, n = 1; *Bacillus*, n = 1). In conclusion, we can therefore say that anaerobic species grow later, as expected, and preferentially in anaerobic vials.

#### *3.4.4 Time to detection according to the type of medium used (aerobic and anaerobic vials and agar media)*

The positive time to detection was always significantly faster in vials than on agar media ( $p < 0.001$ ) except for *C. acnes*. *C. acnes* were detected, in 240h [67.5-246] in aerobic vials, 126h [99-183.75] in anaerobic vials and in 84h [24-102] on agar media, which was considered as not significantly different ( $p = 0.345$ ). The comparison of positive time to detection of bacteria (all species combined) from BD BACTEC® Plus Aerobic/F)(AE) and anaerobic (BD BACTEC® Lytic/10 Anaerobic/F)(ANA) enrichment vials, versus agar media were shown in Table 3.

## **4. Discussion**

This study identified, without distinction of pathogenicity, all samples of synovial fluids and bone crushes for which a bacterial culture was detected on at least one culture medium (solid or liquid). The positive time to detection, for both aerobic and anaerobic vials, required for diagnosis of bone and joint infections, was evaluated using BD BACTEC FX instrumented blood system, and showed the interest in using both aerobic and anaerobic vials to optimize the speed of diagnosis.

Direct examination is recognized as insensitive, with positivity rates between 10 and 30% (Lallemand et al., 2017), which was confirmed by this work.

The use of sterile beads to crush the samples is known to improve the recovery rate of prosthetic joint infection up to 83.7% (instead of 60.8% in case of culture without grinding), with a contamination rate of 8.7% (Roux et al., 2011).

Concerning the comparative advantage of blood culture vials and agar media in terms of sample positivity, Bemer et al. (Bemer et al., 2016) and the CRIOGO group demonstrated a positivity rate of 69% on chocolate agar plate, 70.1% on blood agar plate, 68.8% in Schaedler anaerobic broth medium and 83% in BACTEC® blood culture vials, that is in accordance with our results. Today, culture media and preprocessing of samples are therefore powerful enough to detect the majority of bacterial species responsible for bone and joint infections. However, the positive time to detection must also be taken into account, especially during septic arthritis where the care of the patient must be as fast as possible, and in case of surgical revision requiring a rapid therapeutic adjustment. Enrichment of the culture of osteoarticular specimens and the need for prolonged incubation has been widely demonstrated for optimum detection. Anaerobic Lytic/F vials were used preferentially to Plus Anaerobic/F vials, because the recovery rate (RR) of bacteria and yeast was demonstrated significantly better than in the Plus Anaerobic/F vials, while performance of Plus Aerobic/F vials and Anaerobic Lytic/F vials was equivalent (Rocchetti et al., 2016). Elliott et al. (Elliott et al., 1998) showed that significantly more gram-positive organisms ( $P < 0.05$ ) and gram-negative organisms ( $P < 0.05$ ), including *Enterobacteriaceae* ( $P < 0.05$ ) were recovered from the lytic medium. An incubation of 14 days has been recommended (Schafer et al., 2008), but without the use of blood culture vials as enrichment media. The use of blood culture vials has been shown to reduce incubation time to less than 14 days, with a good recovery of most of pathogenic bacteria as attested by sub-culturing of negative samples (Minassian et al., 2014; Schafer et al., 2008). BACTEC® vial enrichment has already been tested for different samples, such as cerebrospinal fluid samples (Calderaro et al., 2016) with a better recovery of 95.8% versus 53.3% on agar media). Hugues et al. (Hughes et al., 2011) analyzed samples from prosthetic joint revision surgery, and showed that automated BACTEC® blood culture vials were the most sensitive method (87%), as compared with cooked meat enrichment broth (83%), fastidious anaerobic broth (57%) and direct plates (39%); all were highly specific (97-100%).

Regarding the positive time to detection of blood culture vials, for sterility testing of corneal organ culture media, Gain et al. (Gain et al., 2002) estimated that 78% of blood

culture flasks were detected within 24 hours and 94% within 48 hours, which joins our results. Average time to detection in the lytic medium was 15.8 h, compared to 22.7 h in the other medium ( $P < 0.001$ ) (Elliott et al., 1998). Minassian et al. (Minassian et al., 2014) showed that the respiratory atmosphere of the inoculated blood culture vial influenced the detection of microorganisms: *Staphylococci*, *Streptococci*, *Enterococci* and *Enterobacteriaceae* were found in both aerobic and anaerobic vials, whereas strict anaerobic bacteria (including *Cutibacterium acnes*) only grew in anaerobiosis, and *Pseudomonas* or *Candida* grew almost exclusively in aerobic flasks. Our study confirmed these conclusions and showed the interest, to improve the rapidity of diagnosis, of using a set of two vials (aerobic and anaerobic).

## 5. Conclusion

The vast majority of bacterial species were identified after only 24 hours of incubation and often less, thanks to enrichment vials. The use of MALDI-TOF to directly identify bacteria/yeasts on enrichment media has also saved valuable time for diagnosis. In 15.5% of cases, some microorganisms were only identified from aerobic vials and in 12.7% from anaerobic vials, indicating the importance of using both atmosphere conditions for optimal positive time to detection. Multiplying the number of culture media and making at least 4 specimens for surgical sampling facilitates microbiological interpretation and makes it easier to suspect cases of contamination.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Arvieux C. CRIOGO :: Les IOA :: Les infections ostéo-articulaire (IOA) : définition [Internet]. [cité 28 mars 2019]. Disponible sur: <http://www.criogo.fr/les-ioa/definition-d-une-infection-osteo-articulaire-complexe>
2. la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF), 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), et al. [Clinical practice recommendations. Osteoarticular infections on materials (prosthesis, implant, osteosynthesis]. *Med Mal Infect.* nov 2009;39(11):815-63.
3. Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN. Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. 3. Osteomyelitis associated with vascular insufficiency. *N Engl J Med.* 5 févr 1970;282(6):316-22.
4. Coventry MB. Treatment of infections occurring in total hip surgery. *Orthop Clin North Am.* oct 1975;6(4):991-1003.
5. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 14 oct 2004;351(16):1645-54.
6. Grammatico-Guillon DL. Evolution des infections ostéo-articulaires (IOA) en France : PMSI 2008 vs 2013. 2016;15.
7. Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S, Lecuyer A-I, Gaborit C, Rosset P, et al. Bone and joint infections in hospitalized patients in France, 2008: clinical and economic outcomes. *J Hosp Infect.* sept 2012;82(1):40-8.
8. Jacqueline C, Caillon J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother.* sept 2014;69 Suppl 1:i37-40.
9. Olson ME, Ruseska I, Costerton JW. Colonization of n-butyl-2-cyanoacrylate tissue adhesive by *Staphylococcus epidermidis*. *J Biomed Mater Res.* juin 1988;22(6):485-95.
10. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 14 juill 2001;358(9276):135-8.
11. Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* mai 2015;34(5):877-86.
12. Richards JJ, Melander C. Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem.* 21 sept 2009;10(14):2287-94.
13. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol.* avr 2006;4(4):295-305.
14. Valour F, Rasigade J-P, Trouillet-Assant S, Gagnaire J, Bouaziz A, Karsenty J, et al. Delta-toxin production deficiency in *Staphylococcus aureus*: a diagnostic marker of bone and joint infection chronicity linked with osteoblast invasion and biofilm formation. *Clin Microbiol Infect.* juin 2015;21(6):568.e1-11.
15. Teissier G. Apport du broyage mécanique des prélèvements per-opératoires et de la PCR pan-bactérienne dans le diagnostic des infections de prothèse articulaire de hanche et de genou. 2013;134.
16. Al-Maleki AR, Mariappan V, Vellasamy KM, Shankar EM, Tay ST, Vadivelu J. Enhanced intracellular survival and epithelial cell adherence abilities of *Burkholderia pseudomallei* morphotypes are dependent on differential expression of virulence-associated proteins during mid-logarithmic growth phase. *J Proteomics.* 25 juin 2014;106:205-20.

17. Ahmed S, Meghji S, Williams RJ, Henderson B, Brock JH, Nair SP. Staphylococcus aureus fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect Immun.* mai 2001;69(5):2872-7.
18. Letertre-Gibert P, Desbiez F, Vidal M, Mrozek N, Bruno P, Tauveron I, et al. Blood cultures after bone biopsy in diabetic foot osteomyelitis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* sept 2017;89(1):78-9.
19. Aronson MD, Bor DH. Blood cultures. *Ann Intern Med.* févr 1987;106(2):246-53.
20. FRAPERIE P, MAYE-LASSERRE M. Microbiologie médicale [Internet]. 2016 [cité 28 mars 2019]. Disponible sur: <https://microbiologiemedicale.fr/>
21. Minassian AM, Newnham R, Kalimeris E, Bejon P, Atkins BL, Bowler ICJW. Use of an automated blood culture system (BD BACTEC™) for diagnosis of prosthetic joint infections: easy and fast. *BMC Infect Dis.* 4 mai 2014;14:233.
22. Alizadeh AM, Kabiri Movahed R, Mohammadnia M. Comparative Evaluation of Conventional and BACTEC Methods for Detection of Bacterial Infection. *Tanaffos.* 2016;15(2):112-6.
23. Elliott TS, Stevens CM, Macrae F, Hart IT, Healing DE, Palmer M, et al. Improved recovery of antibiotic-stressed microorganisms on inclusion of saponin in aerobic blood culture media. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* août 1998;17(8):566-9.
24. Nolte FS, Williams JM, Jerris RC, Morello JA, Leitch CD, Matushek S, et al. Multicenter clinical evaluation of a continuous monitoring blood culture system using fluorescent-sensor technology (BACTEC 9240). *J Clin Microbiol.* mars 1993;31(3):552-7.
25. Spaargaren J, van Boven CP, Voorn GP. Effectiveness of resins in neutralizing antibiotic activities in bactec plus Aerobic/F culture medium. *J Clin Microbiol.* déc 1998;36(12):3731-3.
26. Zadroga R, Williams DN, Gottschall R, Hanson K, Nordberg V, Deike M, et al. Comparison of 2 blood culture media shows significant differences in bacterial recovery for patients on antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* mars 2013;56(6):790-7.
27. Høst B, Schumacher H, Prag J, Arpi M. Isolation of *Kingella kingae* from synovial fluids using four commercial blood culture bottles. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* août 2000;19(8):608-11.
28. Wang M-C, Lin W-H, Yan J-J, Fang H-Y, Kuo T-H, Tseng C-C, et al. Early identification of microorganisms in blood culture prior to the detection of a positive signal in the BACTEC FX system using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Microbiol Immunol Infect.* août 2015;48(4):419-24.
29. Park J, Han S, Shin S. Comparison of Growth Performance of the BacT/ALERT VIRTUO and BACTEC FX Blood Culture Systems Under Simulated Bloodstream Infection Conditions. *Clin Lab.* 1 janv 2017;63(1):39-46.
30. Gain P, Thuret G, Chiquet C, Vautrin A-C, Carricajo A, Tchapyguine F, et al. [Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media]. *J Fr Ophtalmol.* avr 2002;25(4):367-73.
31. Donay J-L, Mathieu D, Fernandes P, Prégermain C, Bruel P, Wargnier A, et al. Evaluation of the automated phoenix system for potential routine use in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* avr 2004;42(4):1542-6.
32. Brown DFJ, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother.* déc 2005;56(6):1000-18.
33. von Essen R, Hölttä A. Improved method of isolating bacteria from joint fluids by the use of blood culture bottles. *Ann Rheum Dis.* juin 1986;45(6):454-7.
34. Hughes HC, Newnham R, Athanasou N, Atkins BL, Bejon P, Bowler ICJW. Microbiological diagnosis of

- prosthetic joint infections: a prospective evaluation of four bacterial culture media in the routine laboratory. *Clin Microbiol Infect.* oct 2011;17(10):1528-30.
35. Passerini R, Cassatella MC, Salvatici M, Bottari F, Mauro C, Radice D, et al. Recovery and time to growth of isolates in blood culture bottles: comparison of BD Bactec Plus Aerobic/F and BD Bactec Plus Anaerobic/F bottles. *Scand J Infect Dis.* avr 2014;46(4):288-93.
  36. Patel R, Vetter EA, Harmsen WS, Schleck CD, Fadel HJ, Cockerill FR. Optimized pathogen detection with 30- compared to 20-milliliter blood culture draws. *J Clin Microbiol.* déc 2011;49(12):4047-51.
  37. Chen H-C, Lin W-L, Lin C-C, Hsieh W-H, Hsieh C-H, Wu M-H, et al. Outcome of inadequate empirical antibiotic therapy in emergency department patients with community-onset bloodstream infections. *J Antimicrob Chemother.* avr 2013;68(4):947-53.
  38. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest.* juill 2000;118(1):146-55.
  39. Dupon M, Chossat I, Lafarie S, Dutronc H. Infections de prothèse osseuse. *M ISE AU POINT.* 2001;8.
  40. Nanni C, Errani C, Boriani L, Fantini L, Ambrosini V, Boschi S, et al. <sup>68</sup>Ga-citrate PET/CT for evaluating patients with infections of the bone: preliminary results. *J Nucl Med.* déc 2010;51(12):1932-6.
  41. Bourlet T, Bouchara J-P, Galinier J-L. Infections osseuses et articulaires. In: *Rémic : référentiel en microbiologie médicale.* 6e édition 2018. Société française de microbiologie; 2018. p. 313-20.
  42. Bailly P, Dhondt JL, Drouard L, Houlbert C, Soubiran P, Szymanowicz A, et al. [Guidelines concerning sample reception and request recording of laboratory tests]. *Ann Biol Clin (Paris).* déc 2010;68 Spec No 1:105-10.
  43. Roux A-L, Sivadon-Tardy V, Bauer T, Lortat-Jacob A, Herrmann J-L, Gaillard J-L, et al. Diagnosis of prosthetic joint infection by beadmill processing of a periprosthetic specimen. *Clin Microbiol Infect.* mars 2011;17(3):447-50.
  44. Pin C, Rolfe MD, Muñoz-Cuevas M, Hinton JCD, Peck MW, Walton NJ, et al. Network analysis of the transcriptional pattern of young and old cells of *Escherichia coli* during lag phase. *BMC Syst Biol.* 16 nov 2009;3:108.
  45. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med.* 16 août 2007;357(7):654-63.
  46. Monsen T, Lövgren E, Widerström M, Wallinder L. In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections. *J Clin Microbiol.* août 2009;47(8):2496-501.
  47. Bossard DA, Ledergerber B, Zingg PO, Gerber C, Zinkernagel AS, Zbinden R, et al. Optimal Length of Cultivation Time for Isolation of *Propionibacterium acnes* in Suspected Bone and Joint Infections Is More than 7 Days. *J Clin Microbiol.* 2016;54(12):3043-9.
  48. Lallemand E, Arvieux C, Coiffier G, Polard J-L, Albert J-D, Guggenbuhl P, et al. Use of MALDI-TOF mass spectrometry after liquid enrichment (BD Bactec™) for rapid diagnosis of bone and joint infections. *Res Microbiol.* mars 2017;168(2):122-9.
  49. Désorption-ionisation laser assistée par matrice. In: Wikipédia [Internet]. 2018 [cité 28 mars 2019]. Disponible sur: [https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=D%C3%A9sorption-ionisation\\_laser\\_assist%C3%A9e\\_par\\_matrice&oldid=149155546](https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=D%C3%A9sorption-ionisation_laser_assist%C3%A9e_par_matrice&oldid=149155546)
  50. Riat A, Abdessalem C, Emonet S, Greub G, Schrenzel J. Quels bénéfices pour les cliniciens de la mise en place du MALDI-TOF/MS dans le laboratoire de bactériologie ? - *Revue Médicale Suisse* [Internet]. 2014 [cité 28 mars 2019]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-450/Quels-benefices-pour-les-cliniciens-de-la-mise-en-place-du-MALDI-TOF-MS-dans-le-laboratoire-de-bacteriologie>

51. Schubert S, Kostrzewa M. MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends. *Curr Issues Mol Biol.* 2017;23:17-20.
52. Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol.* avr 2010;48(4):1481-3.
53. Lallemand E, Coiffier G, Arvieux C, Brillet E, Guggenbuhl P, Jolivet-Gougeon A. MALDI-TOF MS performance compared to direct examination, culture, and 16S rDNA PCR for the rapid diagnosis of bone and joint infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* mai 2016;35(5):857-66.
54. Harris P, Winney I, Ashhurst-Smith C, O'Brien M, Graves S. Comparison of Vitek MS (MALDI-TOF) to standard routine identification methods: an advance but no panacea. *Pathology.* oct 2012;44(6):583-5.
55. Moon H-W, Lee SH, Chung H-S, Lee M, Lee K. Performance of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive cocci routinely isolated in clinical microbiology laboratories. *J Med Microbiol.* sept 2013;62(Pt 9):1301-6.
56. Tan KE, Ellis BC, Lee R, Stamper PD, Zhang SX, Carroll KC. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol.* oct 2012;50(10):3301-8.
57. Bizzini A, Jaton K, Romo D, Bille J, Prod'hom G, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J Clin Microbiol.* févr 2011;49(2):693-6.
58. Fihman V, Hannouche D, Bousson V, Bardin T, Lioté F, Raskine L, et al. Improved diagnosis specificity in bone and joint infections using molecular techniques. *J Infect.* déc 2007;55(6):510-7.
59. Qu X, Zhai Z, Li H, Li H, Liu X, Zhu Z, et al. PCR-based diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* août 2013;51(8):2742-6.
60. Bémer P, Léger J, Tandé D, Plouzeau C, Valentin AS, Jolivet-Gougeon A, et al. How Many Samples and How Many Culture Media To Diagnose a Prosthetic Joint Infection: a Clinical and Microbiological Prospective Multicenter Study. *J Clin Microbiol.* févr 2016;54(2):385-91.
61. Ilharreborde B, Bidet P, Lorrot M, Even J, Mariani-Kurkdjian P, Liguori S, et al. New real-time PCR-based method for *Kingella kingae* DNA detection: application to samples collected from 89 children with acute arthritis. *J Clin Microbiol.* juin 2009;47(6):1837-41.
62. Dubouix-Bourandy A, de Ladoucette A, Pietri V, Mehdi N, Benzaquen D, Guinand R, et al. Direct detection of *Staphylococcus osteoarticular* infections by use of Xpert MRSA/SA SSTI real-time PCR. *J Clin Microbiol.* déc 2011;49(12):4225-30.
63. Titécat M, Senneville E, Wallet F, Dezèque H, Migaud H, Courcol R-J, et al. Bacterial epidemiology of osteoarticular infections in a referent center: 10-year study. *Orthop Traumatol Surg Res.* oct 2013;99(6):653-8.
64. Waites KB, Canupp KC. Evaluation of BacT/ALERT system for detection of *Mycoplasma hominis* in simulated blood cultures. *J Clin Microbiol.* déc 2001;39(12):4328-31.
65. Hogan JI, Hurtado RM, Nelson SB. Mycobacterial Musculoskeletal Infections. *Infect Dis Clin North Am.* 2017;31(2):369-82.
66. Yombi JC, Seyler L, Cornu O, Barbier O, Libouton X, Rodriguez-Villalobos H, et al. Difficult to treat osteoarticular infections : Focus on Mycobacterial and Fungal infection. *Acta Orthop Belg.* mars 2017;83(1):110-23.
67. 2007-Spondylodiscites-Court.pdf [Internet]. [cité 28 mars 2019]. Disponible sur: [http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/\\_documents/consensus/2007-Spondylodiscites-](http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/_documents/consensus/2007-Spondylodiscites-)



Court.pdf

68. Pea F. Penetration of antibacterials into bone: what do we really need to know for optimal prophylaxis and treatment of bone and joint infections? *Clin Pharmacokinet.* 2009;48(2):125-7.
69. septproto.pdf [Internet]. [cité 28 mars 2019]. Disponible sur: <http://www.crioac.org/sites/default/files/pdf/septproto.pdf>
70. Prendki V, Ferry T, Sergent P, Oziol E, Forestier E, Fraisse T, et al. Prolonged suppressive antibiotic therapy for prosthetic joint infection in the elderly: a national multicentre cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* sept 2017;36(9):1577-85.
71. Bernard L, Dinh A, Ghout I, Simo D, Zeller V, Issartel B, et al. Antibiotic treatment for 6 weeks versus 12 weeks in patients with pyogenic vertebral osteomyelitis: an open-label, non-inferiority, randomised, controlled trial. *Lancet.* 7 mars 2015;385(9971):875-82.
72. Sampedro MF, Piper KE, McDowell A, Patrick S, Mandrekar JN, Rouse MS, et al. Species of *Propionibacterium* and *Propionibacterium acnes* phylotypes associated with orthopedic implants. *Diagn Microbiol Infect Dis.* juin 2009;64(2):138-45.
73. Calderaro A, Martinelli M, Montecchini S, Motta F, Covan S, Larini S, et al. Higher recovery rate of microorganisms from cerebrospinal fluid samples by the BACTEC culture system in comparison with agar culture. *Diagn Microbiol Infect Dis.* avr 2016;84(4):281-6.
74. Mermel LA, Maki DG. Detection of bacteremia in adults: consequences of culturing an inadequate volume of blood. *Ann Intern Med.* 15 août 1993;119(4):270-2.
75. Schäfer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Infect Dis.* 1 déc 2008;47(11):1403-9.

---

**DUCASSE, Emmanuelle - Pertinence de l'utilisation de flacons à hémoculture aérobie et anaérobie pour l'optimisation du diagnostic rapide des infections ostéo-articulaires.**

90 feuilles, illustrations, graphiques, 30 cm.- Thèse : Pharmacie (Officine);  
Rennes 1; 2019 ; N° .

---

Résumé français

Les performances d'une paire de flacons à hémoculture (BACTEC Plus Aerobic / F et Anaerobic Lytic / F) ont été analysées avec 496 prélèvements ostéo-articulaires (246 liquides synoviaux et 250 échantillons d'os broyés) à l'hôpital universitaire de Rennes (France). Au total, 46 espèces ont été identifiées. Le délai avant la détection était significativement raccourci lorsque les flacons étaient utilisés plutôt que les milieux gélosés ( $p < 0,001$ ), sauf pour *C. acnes* ( $p = 0,345$ ). Le délai de positivité médian était plus précoce avec les flacons anaérobies Lytic / F (15,0 h) et Plus Aerobic / F (13,0 h) par rapport aux géloses (24,0 h). Certains microorganismes n'ont été identifiés que dans des flacons aérobie (15,5%) ou anaérobies (12,7%), ce qui indique qu'il est important d'utiliser les deux conditions atmosphériques pour optimiser le temps de détection de tous les microorganismes impliqués dans les infections ostéo-articulaires.

Résumé anglais

The performance of a pair of blood culture vials (BACTEC Plus Aerobic/F, and Anaerobic Lytic/F) were analyzed with 496 bone clinical specimens (246 synovial fluids and 250 crushed bone samples), at the Teaching Hospital of Rennes (France). A total of 46 species were identified. The positive time to detection was significantly shortened when vials were used compared to agar plates ( $p < 0.001$ ), except for *C. acnes* ( $p = 0.345$ ). Median positive time to detection was earlier with the Anaerobic Lytic/F vials (15.0 h) and Plus Aerobic/F (13.0 h) than agar plates (24.0 h). Some microorganisms were only identified from aerobic vials (15.5%) or from anaerobic vials (12.7%), indicating the importance of using both atmosphere conditions for optimal positive time to detection of all microorganisms isolated from bone and joint infections.

---

Rubrique de classement : [Exemple :] BACTERIOLOGIE

---

Mots-clés : Infections ostéo-articulaires, Hémoculture, BACTEC

---

Mots-clés anglais MeSH : Joint infections, Blood culture vials, BACTEC

---

Président : Madame Latifa BOUSARGHIN

JURY : Assesseurs : Madame Anne GOUGEON [directeur de thèse]

Monsieur Thomas GICQUEL

Madame Solène PATRAT-DELON

---