

41<sup>e</sup>

RÉUNION INTERDISCIPLINAIRE DE  
CHIMIOTHÉRAPIE ANTI-INFECTIEUSE

LUNDI 13 & MARDI 14  
DÉCEMBRE 2021

PALAIS DES CONGRÈS • PARIS



# Evaluation microbiologique des ostéites du pied diabétique



Bacterial Virulence



Chronic Infections



Inserm

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale

Catherine Dunyach-Remy,  
Alix Pantel, Jean-Philippe Lavigne  
CHU Nîmes



41<sup>e</sup>

RÉUNION INTERDISCIPLINAIRE DE  
CHIMIOTHÉRAPIE ANTI-INFECTIEUSE

LUNDI 13 & MARDI 14  
DÉCEMBRE 2021

PALAIS DES CONGRÈS • PARIS



**Orateur : Catherine Dunyach-Remy, CHU NIMES**

Je ne déclare aucun lien d'intérêt potentiel

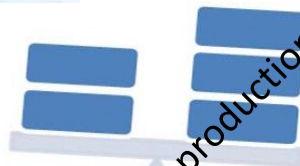
© RICA I 2021 Tous droits réservés.

© RICA I 2021 Tous droits réservés.

## Problématique : distinguer l'infection de la colonisation

### COLONISATION

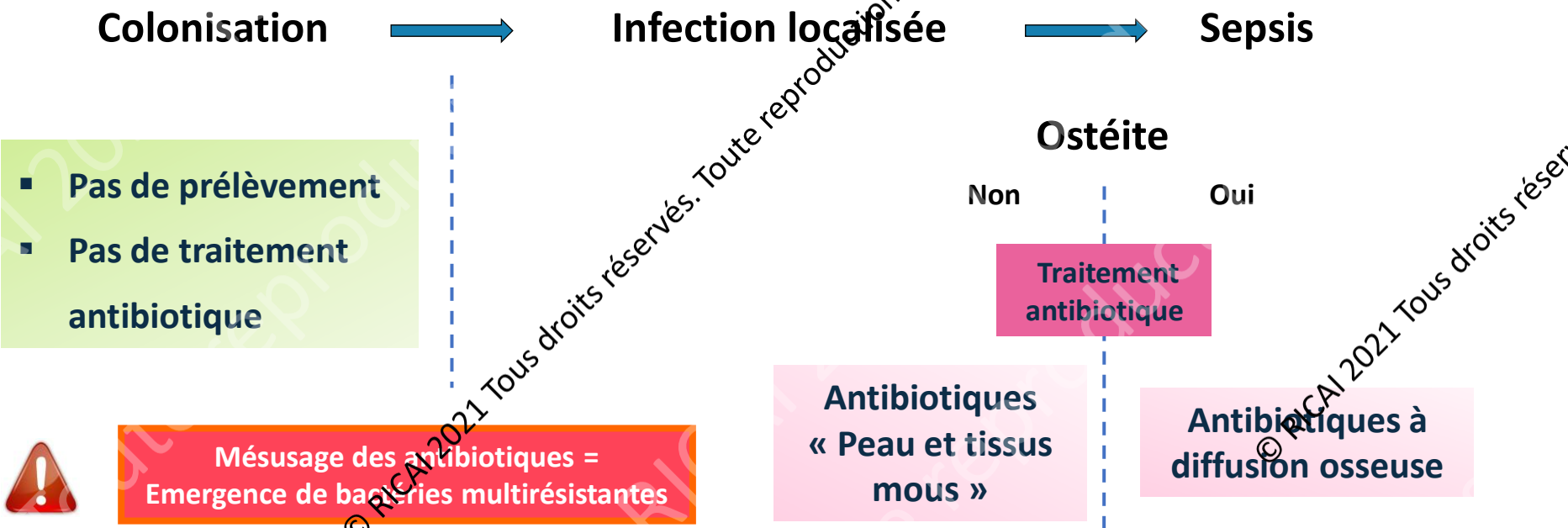
- Processus physiologique
- Présence de bactéries sur la peau  
(avec/sans multiplication)  
sans dommage pour l'hôte



### INFECTION

- Processus pathologique
- Modification du microbiote cutanée
- Bactéries virulentes
- Signes cliniques +++
  - ⇒ Absence de cicatrisation
  - ⇒ Extension: os +++

# Pourquoi faire cette distinction?



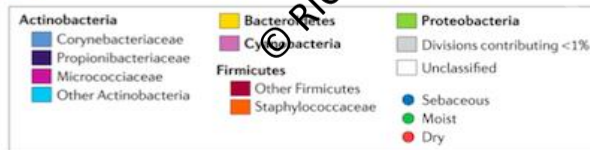
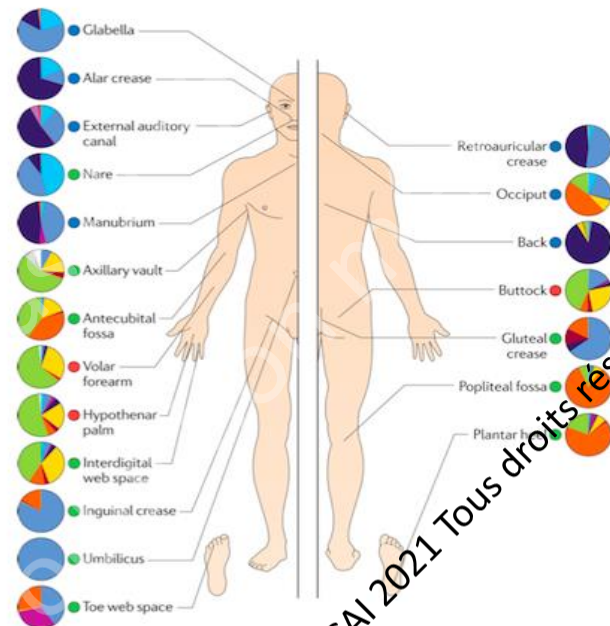
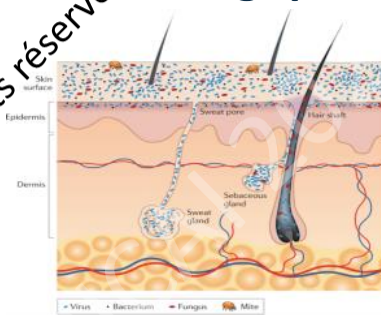
Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICA 2021 Tous droits réservés.



## Microbiote cutané

- Caractéristiques peau  $\neq$  selon les régions du corps
- > 14 phyla, 15-30000 espèces bactériennes adaptées aux différentes niches écologiques



## Signes cliniques? 4 Grades

### Consensus of International Working Group on Diabetic Foot and IDSA (2019)



Présence d'Ostéite ? 30 et 40

## Critères microbiologiques?

### COLONISATION

- ⇒ SCN
- ⇒ Corynébactéries

Bactéries au potentiel  
de virulence peu connu:

- ⇒ Entérocoques
- ⇒ *P. aeruginosa*

### INFECTION

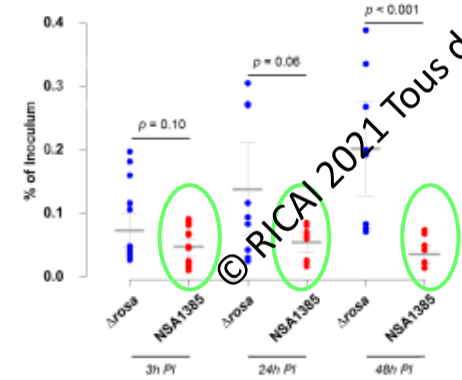
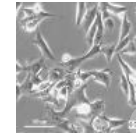
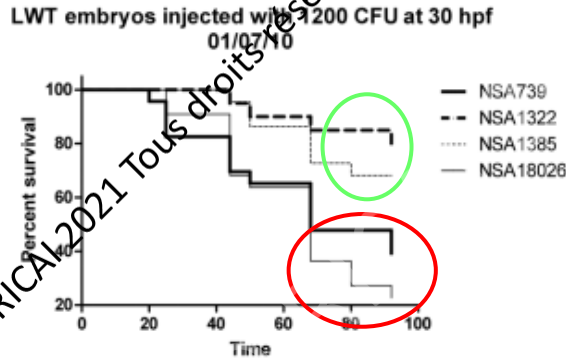
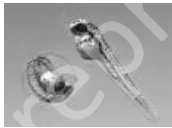
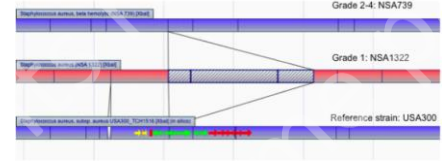
- ⇒ *S. aureus*
- ⇒ Streptocoques  $\beta$ -hémolytiques
- ⇒ Anaérobies
- ⇒ Entérobactéries: *E. coli*, *P. mirabilis*,  
*Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.



Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

## 2 populations de *S. aureus*

- Majorité des souches virulentes
- Existence de *S. aureus* colonisants
  - Région spécifique de 40 Kb en amont de *isd* : bactériophage ROSA-like
  - Faible potentiel de virulence et diminution survie dans ostéoblastes



Messad N. et al., Diabetes 2015  
Rasigade JP et al., J Infect Dis 2016

© RICA I 2021 Tous droits réservés.



## Présence de SCN dans les échantillons osseux

Tableau II – Écologie des osseines des plaies du pied chez le diabétique.

Bactéries	Références								
	51	17	52	38	53	54	55	56	57
Cocci à Gram +									
<i>S. aureus</i>	40 %	27 %	47 %	26 %	47 %	38 %	86 %	33 %	31 %
SCN	10 %	50 %	11 %	26 %	11 %	12 %	10 %	14 %	-
Streptococci	45 %	27 %	61 %	12 %	3 %	1 %	-	9 %	3 %
<i>Enterococcus</i> sp.	29 %	8 %	28 %	8 %	1 %	-	18 %	12 %	-
Autre	10 %	-	-	2 %	-	-	-	4 %	2 %
Bacilles à Gram -									
Entérobactéries	55 %	20 %	14 %	18 %	29 %	36 %	11 %	19 %	32 %
<i>Pseudomonas</i> sp.	5 %	15 %	11 %	2 %	9 %	10 %	43 %	2 %	19 %
<i>Acinetobacter</i> sp.	-	-	-	-	-	3 %	-	-	13 %
Aérobie	60 %	4 %	15 %	5 %	-	-	-	4 %	-
Polymicrobien	70 %	ND	83 %	ND	ND	ND	ND	ND	ND

## *Pseudomonas et Enterococcus?*

Ertapenem versus piperacillin/tazobactam for diabetic foot infections (SIPRESTEP): prospective, randomised, controlled, double-blinded, multicentre trial

Lancet 2005; 366: 1695-703

Benjamin A Lipsic, David G Armstrong, Diane M Citron, Alan D Tice, David E Morgenstem, Murray A Abramson

Table 5: Favourable clinical response rates, for species with at least 20 isolates at FUA, by baseline pathogen

	Ertapenem (n=173)	Piperacillin/tazobactam (n=151)*	Observed differences (95% CI)
Gram-positive aerobic cocci	149/176 (84.7%)	132/166 (79.5%)	5.1 (-3.1 to 13.6)
Enterococcus†	19/22 (86.4%)	8/9 (88.9%)	-2.5
Enterococcus faecalis	13/15 (86.7%)	12/16 (75.0%)	11.7 (-19.2 to 41.1)
Staphylococcus aureus	75/90 (83.3%)‡	62/79 (78.5%)	4.9 (-7.6 to 17.2)
Mecillin resistant	7/18 (38.9%)	10/15 (66.7%)	11.1 (-19.8 to 42.7)
Mecillin susceptible	60/71 (84.5%)	52/64 (81.3%)	3.3 (-9.9 to 17.1)
Streptococcus agalactiae	15/21 (71.4%)	22/26 (84.6%)	-13.2 (-38.3 to 10.0)
Gram-negative aerobic bacilli	64/73 (87.7%)	43/56 (76.8%)	10.9 (-2.3 to 26.2)
Enterobacteriaceae§	36/42 (85.7%)	26/33 (78.8%)	6.9 (-11.1 to 25.9)
Pseudomonas aeruginosa	15/18 (83.3%)	7/10 (70.0%)	13.3 (-18.2 to 48.7)

© RICA I 2021 Tous droits réservés. Toute reproduction, même partielle est interdite.

## Critères microbiologiques?

### COLONISATION

- ⇒ SCN
- ⇒ Corynébactéries

Bactéries au potentiel  
de virulence peu connu:

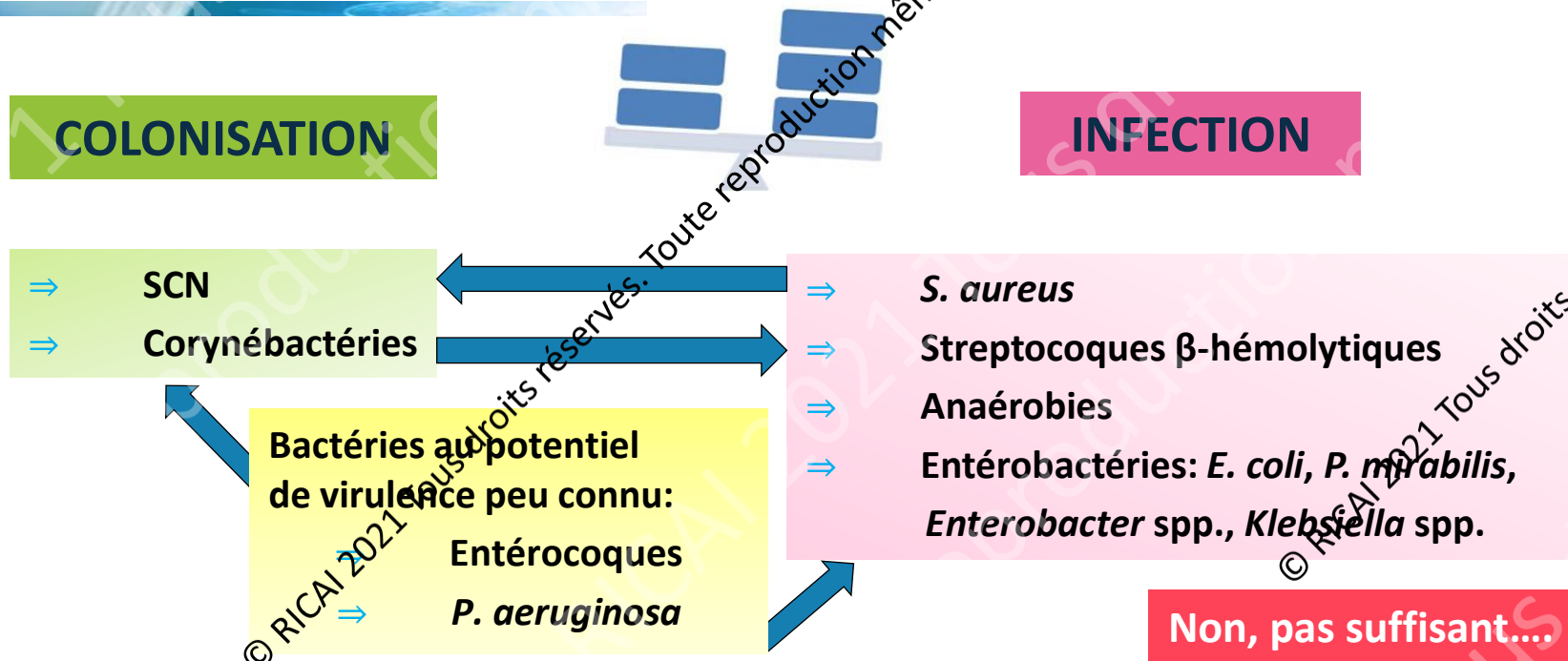
- ⇒ Entérocoques
- ⇒ *P. aeruginosa*

### INFECTION

- ⇒ *S. aureus*
- ⇒ Streptocoques  $\beta$ -hémolytiques
- ⇒ Anaérobies
- ⇒ Entérobactéries: *E. coli*, *P. mirabilis*,  
*Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.

Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

## Critères microbiologiques?



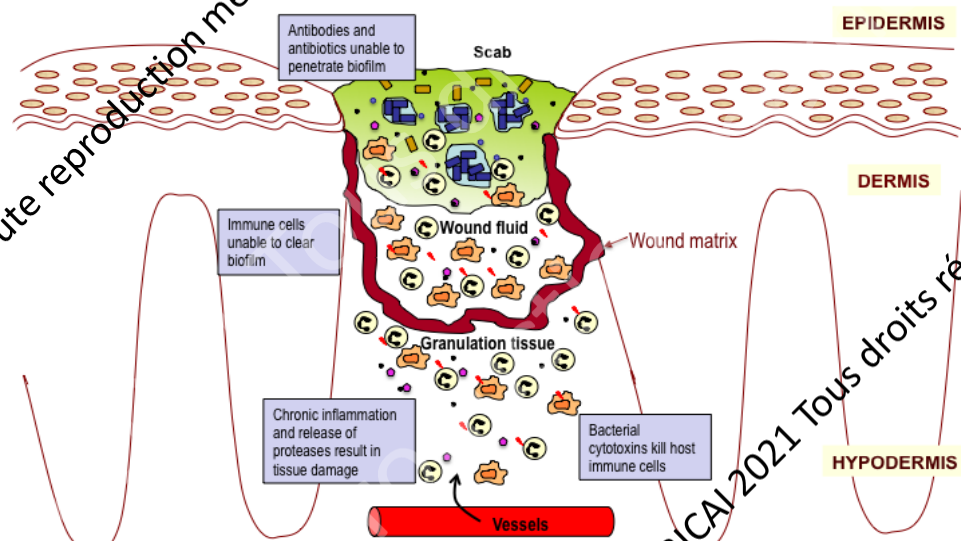
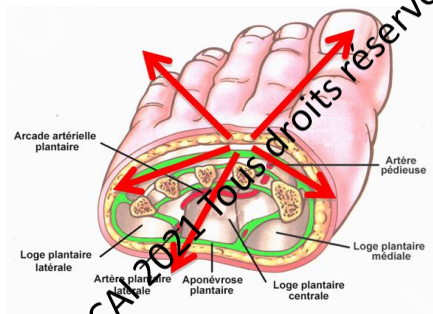
Non, pas suffisant....





## Organisation en biofilm pathologique

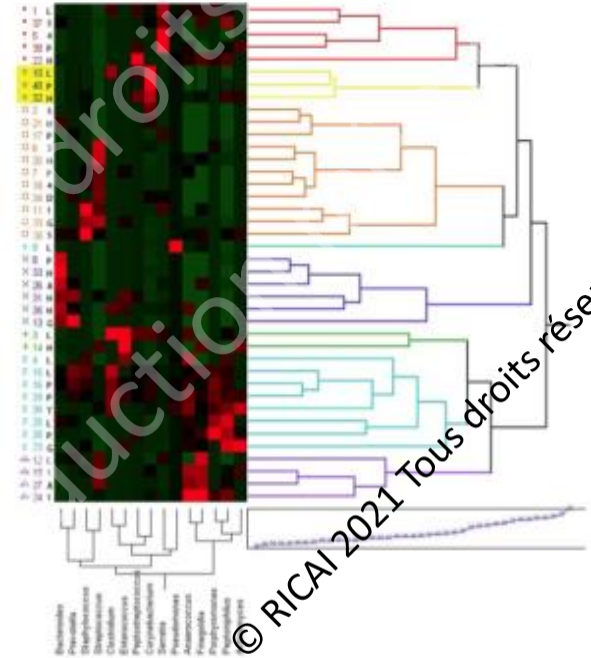
- Plaies chroniques  
⇒ 80% des bactéries en biofilm  
(plaies aiguës 5%)



👤 Macrophages 🟡 Planktonic bacteria 🟢 Biofilm matrix with pH, pO<sub>2</sub>, water gradients 🔴 Antibiotic chelator enzymes 🔴 Bacterial cytotoxins  
🟠 Neutrophils 🟦 Biofilm bacteria embedded in protective EPS 🔵 Quorum sensors 🟡 Antibiotics

## Organisation en biofilm pathologique

- Organisation en FEP  
(Functionally Equivalent Pathogroups)
  - ⇒ Communauté bactérienne formant une unité fonctionnelle pathogène
  - ⇒ Organisation non aléatoire
  - ⇒ Communication / QS
  - ⇒ Relations symbiotiques, partage des nutriments



## Coopération entre les bactéries pathogènes

### ■ Associations *P. aeruginosa* et *S. aureus*

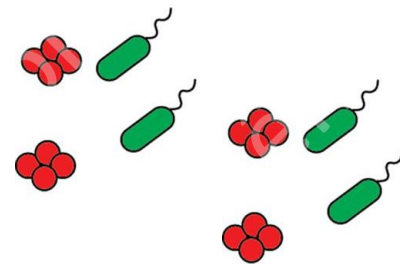
⇒ Infections plus sévères

⇒ Augmentation de l'antibiotolérance si cultivées ensemble

*Pastar I et al. PLoS One 2014; Rosenbluth DB et al., Chest 2004; DeLeon S et al., Infect Immun 2014*

### ■ Associations avec *B. fragilis*

⇒ Augmentation de la pathogénicité dans les infections polymicrobiennes impliquant *E. coli* et *C. perfringens* dans un modèle de souris diabétiques de type 2





# Coopération entre les bactéries pathogènes et commensales

## ■ *H. kunzii*

- ⇒ CGP isolé dans les IPD (80% des souches)
- ⇒ Culture polymicrobienne (60% *S. aureus*)

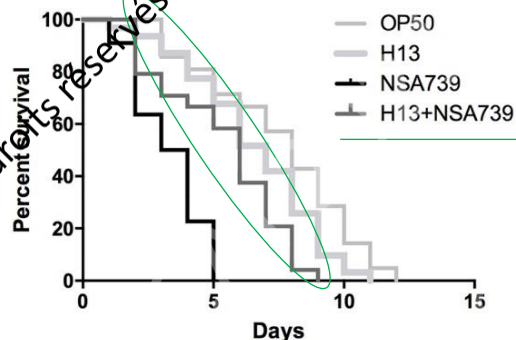
Vergne A. et al., JCM 2015

- ⇒ Diminution potentiel de virulence de *S. aureus*

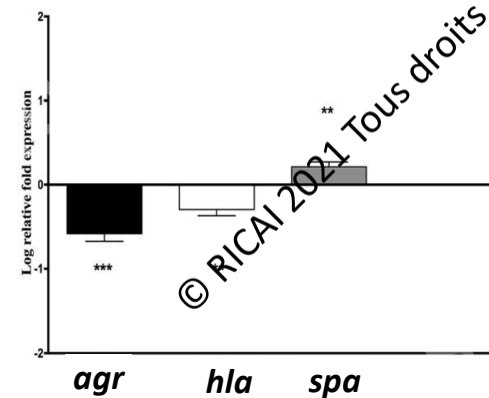
## Decrease of *Staphylococcus aureus* virulence by *Helicobacter kunzii* in a *Caenorhabditis elegans* Model

Christelle Ngba Essebe<sup>1</sup>, Orane Visvikis<sup>2</sup>, Marguerite Fines-Guyon<sup>3,4</sup>, Anne Vergne<sup>5</sup>, Vincent Cattoir<sup>3,4,6</sup>, Alain Lecoustumier<sup>5</sup>, Emmanuel Lemichez<sup>2</sup>, Albert Sotto<sup>1,7</sup>, Jean-Philippe Lavigne<sup>1,8\*</sup> and Catherine Dunyach-Remy<sup>1,9</sup>

Front. Cell. Infect. Microbiol. 7:777  
doi: 10.3389/fcimb.2017.00077



*In vivo* kinetics of killing of *C. elegans* infected by *S. aureus* NSA739, *H. kunzii* H13, and co-infected by the two strains.



Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

## Critères microbiologiques?

COLONISATION



INFECTION

Isolément et identification  
des bactéries réellement infectantes  
→ EFFECTUER un PRELEVEMENT de QUALITE



© RICAI 2021 Tous droits réservés.

© RICAI 2021 Tous droits réservés.

41<sup>e</sup>

RÉUNION INTERDISCIPLINAIRE DE  
CHIMIOTHÉRAPIE ANTI-INFECTIEUSE

LUNDI 13 & MARDI 14  
DÉCEMBRE 2021

PALAIS DES CONGRÈS • PARIS



*En pratique ...*

## 1 - Les prélèvements bactériologiques ne sont indiqués qu'en cas d'infection établie cliniquement

**PLAIE ≠ PRELEVEMENT**



© RICA I 2021 Tous droits réservés.

© RICA I 2021 Tous droits réservés.

41<sup>e</sup>

RÉUNION INTERDISCIPLINAIRE DE  
CHIRIOTHÉRAPIE ANTI-INFECTIEUSE

LUNDI 13 & MARDI 14  
DÉCEMBRE 2021

PALAIS DES CONGRÈS • PARIS



## En pratique ...

1 - Les prélèvements bactériologiques ne sont indiqués qu'en cas d'infection établie cliniquement

2 - Avant de prélever : **Débridement obligatoire ++++** chirurgical ou mécanique



Remerciements: Dr S. Schuldin

© RICA I 2021 Tous droits réservés



41<sup>e</sup>

RÉUNION INTERDISCIPLINAIRE DE  
CHIRIOTHÉRAPIE ANTI-INFECTIEUSE

LUNDI 13 & MARDI 14  
DÉCEMBRE 2021

PALAIS DES CONGRÈS • PARIS



## En pratique ...

1 - Les prélèvements bactériologiques ne sont indiqués qu'en cas d'infection établie cliniquement

2 - Avant de prélever : **Débridement obligatoire ++++ chirurgical ou mécanique**

- **Action diagnostique:** Exploration des différents compartiments de la plaie, visualisation complète, extension
- **Action pronostique:** Réalisation de prélèvements fiables
- **Action préventive:** Correction de déformations
- **Action thérapeutique:** Exérèse des tissus dévitalisés, nécrosés, fibreux. Evacuation des exsudats, Réduction de l'inoculum bactérien

## En pratique ...

- **Débridement des pieds diabétiques et prise en charge adaptée de la plaie (pansement, décharge...) ⇒ modification significative du microbiote cutané avec évolution favorable (même sur des plaies chroniques anciennes)**

*Gardiner M et al., PeerJ 2017. Kalan LR et al., Cell Host Microbe 2019*

- **Différence d'évolution notable uniquement si débridements longs (>5-10 min) et répétés**

*Verbanic S et al., Npj Biofilms Microbiomes 2020*



41<sup>e</sup>

RÉUNION INTERDISCIPLINAIRE DE  
CHIRURGIOTHÉRAPIE ANTI-INFECTIEUSE

LUNDI 13 & MARDI 14  
DÉCEMBRE 2021

PALAIS DES CONGRÈS • PARIS



## En pratique ...

- 1 - Les prélèvements bactériologiques ne sont indiqués qu'en cas d'infection établie cliniquement
- 2 - Avant de prélever : Débridement obligatoire ++++ chirurgical ou mécanique
- 3 - La **biopsie osseuse** est la méthode de référence pour le diagnostic d'ostéite

© RICA I 2021 Tous droits réservés.

© RICA I 2021 Tous droits réservés.

41<sup>e</sup>

RÉUNION INTERDISCIPLINAIRE DE  
CHIMIOTHÉRAPIE ANTI-INFECTIEUSE

LUNDI 13 & MARDI 14  
DÉCEMBRE 2021

PALAIS DES CONGRÈS • PARIS



## Biopsie osseuse

# Reliability and Safety of Bedside Blind Bone Biopsy Performed by a Diabetologist for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Osteomyelitis

*Diabetes Care* 2021;44:2480–2486 | <https://doi.org/10.2337/dc20-3170>

updates

Florine Féron,<sup>1</sup>  
Gauthier Péan de Ponfilly,<sup>2</sup> Louis Potier,<sup>3,4</sup>  
Diane-Cécile Gauthier,<sup>1</sup> Laurence Salle,<sup>1</sup>  
Marie Laloi-Michelin,<sup>1</sup> Anne-Lise Munier,<sup>5</sup>  
Hervé Jacquier,<sup>2</sup> Tiphaine Vidal-Trécan,<sup>1</sup>  
Jean-Baptiste Julla,<sup>1,4</sup> Aurélie Carlier,<sup>3</sup>  
Yawa Abouleka,<sup>3</sup> Nicolas Venteclef,<sup>4</sup>  
Nathalie Grall,<sup>6</sup> Frédéric Mercier,<sup>7</sup>  
Jean-Pierre Riveline,<sup>1,4</sup> Éric Senneville,<sup>8</sup>  
Jean-François Gautier,<sup>1,4</sup>  
Ronan Roussel,<sup>3,4</sup> and  
Jean-Philippe Kevorkian<sup>1</sup>

© RICAI 2021 Tous droits réservés



## Biopsie osseuse

**Nombreuses discordances observées entre les prélèvements réalisés par biopsie osseuse et ceux réalisés par prélèvements superficiels**

Références	N° pts	Méthodes	% équivalence
Lavery, 1996	36	tissus profonds / biopsie osseuse	36
Slater, 2004	60	écouvillons / tissus profonds	62
Kessler, 2006	21	écouvillons / tissus profonds	19
Senneville, 2006	76	écouvillons / biopsie osseuse	97
Senneville, 2009	31	aspiration aiguille/ biopsie osseuse	24
Elamurugan, 2010	144	écouvillons / biopsie osseuse	38

41<sup>e</sup>

RÉUNION INTERDISCIPLINAIRE DE  
CHIMIOTHÉRAPIE ANTI-INFECTIEUSE

LUNDI 13 & MARDI 14  
DÉCEMBRE 2021

PALAIS DES CONGRÈS • PARIS



## En pratique ...

- 1 - Les prélèvements bactériologiques ne sont indiqués qu'en cas d'infection établie cliniquement
- 2 - Avant de prélever : Débridement obligatoire ++++ chirurgical ou mécanique
- 3 - La biopsie osseuse est la méthode de référence pour le diagnostic d'ostéite
- 4 - Ce prélèvement doit être réalisé après une **fenêtre thérapeutique de 15 j**

41<sup>e</sup>

RÉUNION INTERDISCIPLINAIRE DE  
CHIRIOTHÉRAPIE ANTI-INFECTIEUSE

LUNDI 13 & MARDI 14  
DÉCEMBRE 2021

PALAIS DES CONGRÈS • PARIS



## En pratique ...

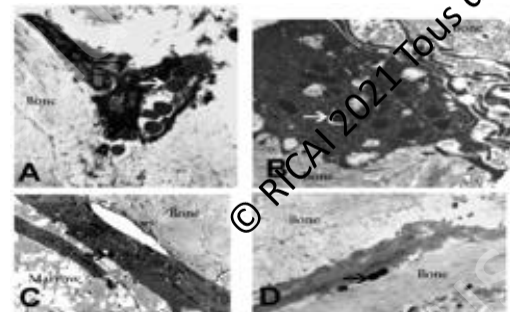
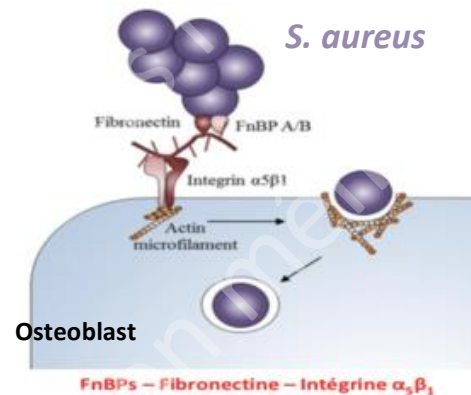
- 1 - Les prélèvements bactériologiques ne sont indiqués qu'en cas d'infection établie cliniquement
- 2 - Avant de prélever : Débridement obligatoire ++++ chirurgical ou mécanique
- 3 - La biopsie osseuse est la méthode de référence pour le diagnostic d'ostéite
- 4 - Ce prélèvement doit être réalisé après une fenêtre thérapeutique de 5 j
- 5 - Il est important d'**extraire** les bactéries de l'os

## La vie intracellulaire de *S. aureus*

- Inefficacité de certaines classes d'ATB
- ⇒ Echec thérapeutique
- ↘ Réponse immunitaire
- ⇒ Chronicité
- ⇒ Récurrence

Hoffmann et al., Eur J Cell Biol 2011

Trouillet-Assant S et al., Infect Dis 2015





## Extraction des bactéries de l'os

### ■ Ex de solution: Ultra-Turrax (vs scalpel/mortier)

⇒ 116 patients (57 femmes)

⇒ Age médian 69.5 (20-93)

⇒ Ultra-Turrax® permet:

- **17% de prélèvements positifs en +**
- **Gain de temps important: 1 à 15j**
- **↗ quantité de bactéries identifiées : 51% des cas**
- **Performances supérieures:**
  - Se: 87.1% UT vs 75.0% scalpel**
  - Sp: 100%**



41<sup>e</sup>

RÉUNION INTERDISCIPLINAIRE DE  
CHIRIOTHÉRAPIE ANTI-INFECTIEUSE

LUNDI 13 & MARDI 14  
DÉCEMBRE 2021

PALAIS DES CONGRÈS • PARIS



## En pratique ...

- 1 - Les prélèvements bactériologiques ne sont indiqués qu'en cas d'infection établie cliniquement
- 2 - Avant de prélever : Débridement obligatoire ++++ chirurgical ou mécanique
- 3 - La biopsie osseuse est la méthode de référence pour le diagnostic d'ostéite
- 4 - Ce prélèvement doit être réalisé après une fenêtre thérapeutique de 5 j
- 5 - Il est important d'extraire les bactéries de l'os
- 6 - Il est nécessaire d'**incuber** les cultures **longtemps** : 5 (tissus) à 14 (os) jours

# Small Colony Variants

Phénotype

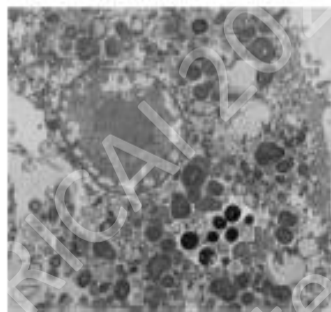
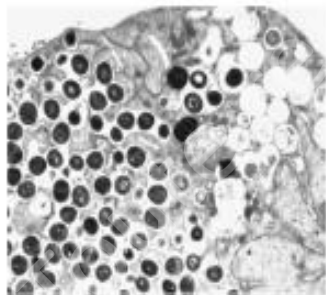


Stratégies d'adaptation bactérienne  
pour résister à la dégradation cellulaire



Réversion du phénotype en quittant le  
compartiment intracellulaire

Phénotype SCV



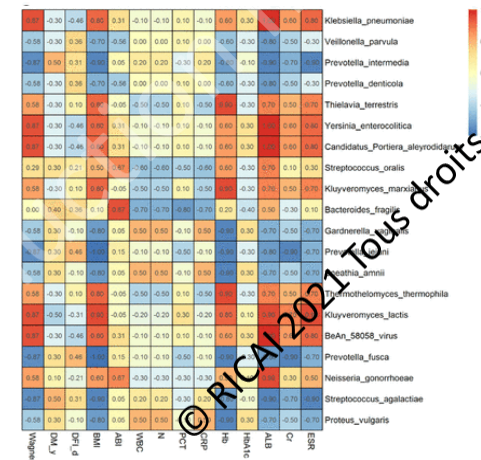
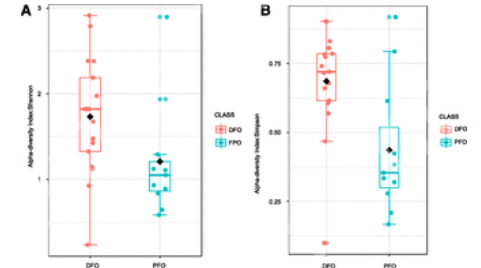
**Adaptation phénotypique de  
*S. aureus* lors d'infections  
chroniques:**

- ⇒ **Persistance dans biofilm et os**
- ⇒ **Echappement aux défenses  
de l'hôte**

Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

## Importance des anaérobies

- La diversité microbienne est significativement plus importante dans les OPD par rapport à des ospeites sur matériel
- Anaérobies sont parmi les bactéries les plus fréquemment identifiées dans les OPD
- P. denticola*, *P. jejuni* et *P. fusca* sont corrélées positivement avec la durée de l'infection



Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



41<sup>e</sup>

RÉUNION INTERDISCIPLINAIRE DE  
CHIMIOTHÉRAPIE ANTI-INFECTIEUSE

LUNDI 13 & MARDI 14  
DÉCEMBRE 2021

PALAIS DES CONGRÈS • PARIS



## TAKE HOME MESSAGES

- ⇒ **Prise en charge multidisciplinaire +++**
- ⇒ **Pas de signes cliniques = Pas de prélèvement, Pas d'ATB**
- ⇒ **Biofilm + Pathogroupes = Débridement ++++ avant prélèvement**
- ⇒ **Pré-analytique ++++ : Bon prélèvement, milieu de transport adapté, transport rapide...**
- ⇒ **Vie intra-osseuse ! Ostéite du pied diabétique = Biopsie osseuse**
- ⇒ **Anaérobies + SCVs = incubation prolongée**

© RICA 2021 Tous droits réservés

© RICA 2021 Tous droits réservés

41<sup>e</sup>

RÉUNION INTERDISCIPLINAIRE DE  
CHIMIOTHÉRAPIE ANTI-INFECTIEUSE

LUNDI 13 & MARDI 14  
DÉCEMBRE 2021

PALAIS DES CONGRÈS • PARIS



Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICA I 2021 Tous droits réservés.

## QCM 1 - Parmi ces affirmations, la(es)quelle(s) est(sont) vraie(s) ?

- 1) Les analyses de biologie moléculaire ont un intérêt dans les prélèvements osseux d'OPD
- 2) La durée de la culture des biopsies osseuses est de 2 semaines
- 3) Les colonies non hémolytiques et  $\beta$ -hémolytiques de *S. aureus* obtenues sur une gélose au sang appartiennent majoritairement aux mêmes clones
- 4) Des cultures répétées peuvent s'avérer utiles chez un patient qui ne répond pas à une antibiothérapie en apparence adéquate
- 5) La concordance entre l'histopathologie et la culture de prélèvements osseux du pied est médiocre

## QCM 1 - Parmi ces affirmations, la(es)quelle(s) est(sont) vraie(s) ?

- 1) Les analyses de biologie moléculaire ont un intérêt dans les prélèvements osseux d'OPD ⇒ **Non, cf consensus IWGD 2019**
- 2) La durée de la culture des biopsies osseuses est de 2 semaines ⇒ **Oui**
- 3) Les colonies non hémolytiques et β-hémolytiques de *S. aureus* obtenues sur une gélose au sang appartiennent majoritairement aux mêmes clones ⇒ **Oui, cf Pouget C. et al. Toxins 2021**
- 4) Des cultures répétées peuvent s'avérer utiles chez un patient qui ne répond pas à une antibiothérapie en apparence adéquate ⇒ **Oui**
- 5) La concordance entre l'histopathologie et la culture de prélèvements osseux du pied est médiocre ⇒ **Oui, env. 40% Elmarsafi T et al., J Foot Ankle Surg 2018**



## QCM 2 - Parmi ces affirmations, la(es)quelle(s) est(sont) vraie(s) ?

- 1) Lors d'une OPD, il est nécessaire de faire plusieurs prélèvements sur le site d'infection
- 2) L'isolement de *Staphylococcus pettenkoferi* doit être considéré comme une contamination
- 3) La biopsie osseuse doit être réalisée en passant par la plaie pour être au contact de l'os
- 4) Les hémocultures sont contributives lors d'OPD
- 5) Une biopsie osseuse de l'os résiduel lors d'une amputation n'a pas d'intérêt diagnostique

## QCM 2 - Parmi ces affirmations, la(es)quelle(s) est(sont) vraie(s) ?

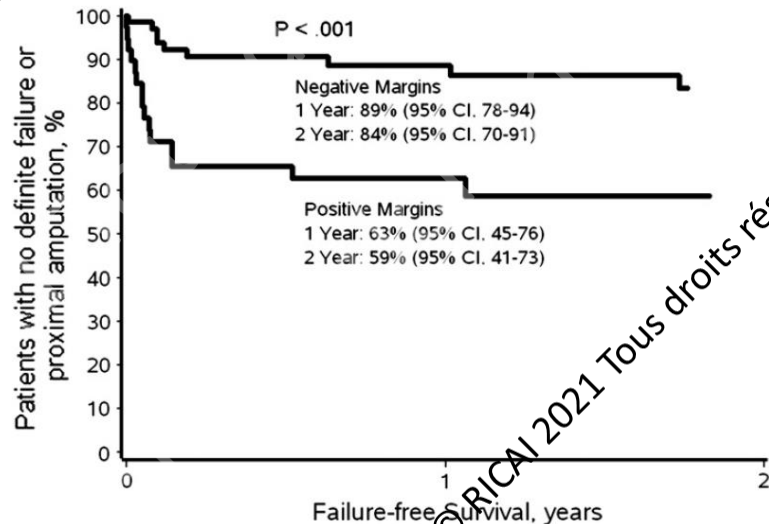
- 1) Lors d'une OPD, il est nécessaire de faire plusieurs prélèvements sur le site d'infection ⇒ **Oui si possible (hors orteil)**
- 2) L'isolement de *Staphylococcus pettenkoferi* doit être considéré comme une contamination ⇒ **Non, bactérie au pouvoir pathogène avérée!**
- 3) La biopsie osseuse doit être réalisée en passant par la plaie pour être au contact de l'os ⇒ **Non, il faut passer en zone saine pour éviter les contaminations**
- 4) Les hémocultures sont contributives lors d'OPD ⇒ **Non, dans 17% des cas (Lesens O *et al.* CMI 2012). Et les flacons ne sont pas des milieux de transport !**
- 5) Une biopsie osseuse de l'os résiduel lors d'une amputation n'a pas d'intérêt diagnostique ⇒ **Si, cf consensus IWGDF 2019**

## Culture de l'os marginal

*Kowalski TJ et al., J Foot Ank Surg 2011*

### Étude rétrospective USA

- 111 patients entre 1990 et 2007
- 39 (35,14%) : histologie et/ou culture positive
- Durée (médiane) de l'antibiothérapie post-amputation:
  - 19 jours (10–134) ostéite
  - 14 jours (2–63) pas d'ostéite (P =0,01)



⇒ Devenir significativement moins bon si culture +