

Peranan Penanda Klinis dan Nilai Tambah Prokalsitonin dalam Penentuan Masih Adanya Infeksi pada Ulkus Kaki Diabetik setelah Pengobatan

The Role of Clinical Sign and The Added Value of Procalcitonin in Determining The Existence of Infection in The Treated Diabetic Foot Ulcer

Andra Aswar¹, Em Yunir², Anis Karuniawati³, Kuntjoro Harimurti⁴

¹Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/RSUPN dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta

²Divisi Metabolik Endokrin Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/RSUPN dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta

³Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/RSUPN dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta

⁴Unit Epidemiologi Klinik, Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/RSUPN dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta

Korespondensi:

Em Yunir. Divisi Metabolik Endokrin, Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/RS dr. Cipto Mangunkusumo. Jln. Pangeran Diponegoro 71, Jakarta 10430, Indonesia. email: dr_yunir@yahoo.com

ABSTRAK

Pendahuluan. Modifikasi dari kriteria klinis infeksi menurut *International Disease Society of America* dan *International Working Group on Diabetic Foot (IDSA-IWGDF)* diperlukan untuk mengevaluasi infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan. Prokalsitonin (PCT), penanda infeksi yang spesifik untuk infeksi bakteri diketahui bermanfaat dalam menegakkan diagnosis infeksi pada ulkus kaki diabetik. Namun, peranannya dalam menentukan ada tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan belum diketahui, begitu juga nilai tambahnya terhadap penanda klinis infeksi. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan kemampuan penanda klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF yang dimodifikasi dan PCT dalam mengevaluasi masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan.

Metode. Dilakukan studi potong lintang berbasis riset diagnostik pada penyandang diabetes dengan ulkus kaki terinfeksi yang sedang mendapatkan pengobatan dan perawatan di Rumah Sakit dr. Cipto Mangunkusumo (RSCM) Jakarta pada kurun waktu Oktober 2011-April 2012. Pasien yang sudah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian dilakukan penilaian infeksi pada ulkus menggunakan kriteria klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF yang dimodifikasi (eritema, edema, nyeri, dan panas) dan pemeriksaan PCT. Kemudian dinilai kemampuannya dalam mengevaluasi masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan dengan membuat kurva ROC dan menghitung AUC. Lalu ditentukan titik potong dengan sensitivitas dan spesifisitas terbaik pada penelitian ini yang dibandingkan dengan baku emas berupa pemeriksaan bakteri secara kuantitatif dari kultur jaringan ulkus.

Hasil. Dari 47 subjek yang diteliti, terdapat 41 subjek dengan ulkus kaki diabetik yang masih terinfeksi berdasarkan pemeriksaan bakteri secara kuantitatif dari kultur jaringan ulkus. Penanda klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF yang dimodifikasi memiliki kemampuan prediksi yang baik dalam menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan dengan AUC: 0,744 (IK 95% 0,576-0,912) dengan titik potong bila ditemukan ≥ 2 tanda klinis infeksi (Sn: 41,46%; Sp: 100%; NPP: 100%, NPN: 20%). Sedangkan, untuk prokalsitonin didapatkan AUC: 0,642 (IK 95% 0,404-0,880).

Simpulan. Kriteria klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF yang dimodifikasi memiliki kemampuan yang baik untuk menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan. Belum didapatkan manfaat prokalsitonin dalam mengevaluasi masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan.

Kata Kunci: IDSA-IWGDF, Infeksi, Kriteria klinis, Modifikasi, Prokalsitonin, Ulkus kaki diabetik

ABSTRACT

Introduction. Roles of the IDSA-IWGDF clinical sign in determining the existence of infection in the treated diabetic foot ulcer is unknown, and it has to be modified. Procalcitonin, a marker that specific for bacterial infection, have benefit in diagnosing infection in the diabetic foot ulcer, but its roles and added value to the clinical sign of infection in determining the existence of infection in the treated diabetic foot ulcer is also unknown. This study aims to determine the ability of

modified IDSA-IWGDF clinical sign of infection and procalcitonin in determining the existence of infection in the treated diabetic foot ulcer.

Methods. Cross-sectional study based on diagnostic research was done in the diabetic patient with infected foot ulcer that had been treated and hospitalized in RSCM between October 2011-April 2012. The modified IDSA-IWGDF clinical sign of infection (pain, erythema, edema, warm sensation) was applied to the patient, and blood serum was taken for procalcitonin. The predictive value of this two marker was then assigned using ROC. AUC and cut off point with the best sensitivity and specificity was determined compared to the gold standard.

Results. Among total of 47 subjects enrolled for the trial, 41 subjects with sustained infection of the diabetic foot ulcer were diagnosed based on quantitative measurement of bacteria (bacterial load) from the ulcer tissue (gold standard). Modified IDSA-IWGDF clinical sign of infection has good prediction of infection for treated diabetic foot ulcer, AUC: 0,744 (95% CI 0,576-0,912) with cut off point ≥ 2 clinical sign of infection (Sn: 41,46%; Sp: 100%; PPV: 100%, NPV: 20%). AUC: 0,642 (95% CI 0,404-0,880) was determined for procalcitonin.

Conclusions. Modified IDSA-IWGDF clinical sign of infection has good ability in determining the existence of infection in the treated diabetic foot ulcer. Procalcitonin has no benefit yet in determining the existence of infection in the treated diabetic foot ulcer.

Keywords: Bacterial load, Clinical sign, Infected diabetic foot ulcer, Modified IDSA-IWGDF, Procalcitonin

PENDAHULUAN

Peningkatan jumlah penderita diabetes beberapa tahun terakhir akan meningkatkan jumlah penderita yang mengalami komplikasi baik akut maupun kronik, salah satunya komplikasi kaki diabetik.¹⁻³ Data menunjukkan bahwa insiden ulkus kaki pada penyandang diabetes berkisar antara 2-4% dengan prevalensi 6-8% setahun.²⁻⁴ Sebanyak 15% dari jumlah ini akan berlanjut mengalami osteomielitis dan pada akhirnya 15-25% dari penderita ulkus ini akan menjalani amputasi.^{5,6} Sementara itu, infeksi pada ulkus kaki diabetik merupakan kasus infeksi yang paling sering ditemui pada penyandang diabetes.⁷⁻¹⁰

Salah satu pilar dalam penatalaksanaan infeksi pada ulkus kaki diabetik adalah penggunaan antibiotik, baik peroral maupun intravena. Namun demikian, pada praktiknya seringkali klinisi ragu dalam memutuskan apakah proses infeksi masih berlangsung atau tidak. Selain itu, respon pasien yang berbeda-beda terhadap terapi menyulitkan klinisi untuk menentukan kapan untuk menghentikan pemberian antibiotik. Akibatnya, terjadi penggunaan antibiotik yang berkepanjangan yang dapat meningkatkan resistensi bakteri terhadap berbagai antibiotik, meningkatkan biaya pengobatan, dan munculnya efek samping akibat penggunaan antibiotik.¹¹

Salah satu cara untuk menilai masih ada atau tidaknya infeksi yaitu dengan menggunakan respon klinis (*clinical respon*).^{12,13} Secara umum, respon klinis yang dinilai mengacu pada kriteria infeksi menurut *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) tahun 2004 dan *International Working Group on Diabetic Foot* (IWGDF) tahun 2007.¹² Kriteria klinis infeksi berdasarkan IDSA-IWGDF sebenarnya sudah lazim digunakan untuk diagnosis infeksi pada pasien dengan ulkus kaki diabetik di RS dr. Cipto Mangunkusumo (RSCM). Namun, belum pernah ada penelitian yang secara langsung menilai sensitivitas dan spesifisitas penggunaan

kriteria ini untuk menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada pasien dengan ulkus kaki diabetik yang sudah menjalani pengobatan.

Saat ini prokalsitonin (PCT), yaitu suatu peptida prekursor kalsitonin yang terdiri dari 116 asam amino, sering digunakan sebagai penanda yang spesifik terhadap infeksi bakteri.^{14,15} Kadar PCT telah banyak diteliti pada berbagai penyakit infeksi pada dewasa maupun anak-anak, baik untuk diagnostik maupun prognostik.¹⁶⁻²⁰ Namun demikian, belum ada penelitian yang mencoba menggunakan PCT untuk mengevaluasi masih ada atau tidaknya infeksi pada kaki diabetik setelah pengobatan.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui peranan penanda klinis IDSA-IWGDF yang sudah dimodifikasi dan peranan PCT sebagai nilai tambah terhadap penanda klinis dalam menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan.

METODE

Penelitian ini merupakan studi potong lintang berbasis riset diagnostik. Penelitian dilakukan untuk menentukan kemampuan penanda klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF yang dimodifikasi dan PCT, baik secara sendiri-sendiri maupun bersama-sama dalam menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada pasien dengan ulkus kaki diabetik yang sudah menjalani pengobatan. Penelitian dilaksanakan di Departemen Ilmu Penyakit Dalam Rumah Sakit dr. Cipto Mangunkusumo (RSCM) Jakarta, selama bulan Oktober 2011 sampai April 2012. Subjek adalah pasien diabetes dengan ulkus kaki terinfeksi yang sedang mendapatkan perawatan dan pengobatan di ruang rawat inap RSCM. Subjek dipilih dengan menggunakan metode *consecutive sampling*, yaitu semua pasien diabetes dengan ulkus kaki terinfeksi yang sedang menjalani perawatan dan mendapatkan pengobatan di ruang rawat inap di RSCM,

diobservasi dan dievaluasi perjalanan penyakitnya sejak awal perawatan. Kriteria inklusi subjek yaitu penderita diabetes dengan ulkus kaki terinfeksi yang telah menjalani pengobatan dan dinyatakan oleh seorang ahli kaki diabetik bahwa ulkus sudah tidak terinfeksi dan disetujui untuk dilakukan pengambilan sampel, serta pasien bersedia berpartisipasi dalam penelitian. Kriteria eksklusi subjek yaitu: 1) pada saat dimulai penelitian, pada pasien didapatkan adanya demam (pemeriksaan suhu pada aksila $>37,2^{\circ}\text{C}$), takikardia (frekuensi nadi >100 kali/menit), takipneu (frekuensi napas >20 kali/menit), syok (TDS <90 mmHg), penurunan kesadaran, leukositosis (kadar leukosit dalam darah $>10.000/\mu\text{L}$), dan pus atau eksudat purulen pada ulkus kaki; 2) pasien menderita infeksi bakteri lainnya, seperti pneumonia, infeksi saluran kemih, infeksi abdomen (gastroenteritis, pankreatitis, appendisitis, peritonitis, kolesistitis); 3) menderita tumor neuroendokrin (tumor yang berasal dari sel yang menghasilkan hormon sebagai respon terhadap rangsangan oleh sistem saraf pusat di antaranya *carcinoid tumors*, *islet cell tumors*, *medullary thyroid carcinomas*, *pheochromocytomas*, dan *Merkel cell cancer*); dan 4) menderita luka bakar, *heat stroke*, atau trauma inhalasi.

Pada subjek dilakukan anamnesis, pemeriksaan fisik, pemeriksaan kaki, pemeriksaan laboratorium, rontgen dada, pemeriksaan mikrobiologi, dan evaluasi rekam medis untuk memperoleh data tambahan yang kemudian ditentukan *outcome* nya berupa masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan. Selanjutnya, data yang terkumpul diolah secara elektronik menggunakan perangkat SPSS versi 16.0. Perhitungan nilai rerata hitung dan sebaran baku dilakukan untuk data yang bersifat kuantitatif, sekaligus dihitung rentangan nilainya menurut batas kepercayaan (*confidence interval*) 95%. Pengujian kemaknaan statistik dilakukan dengan uji "t" dan uji Chi-square berdasarkan batas kemaknaan (α) sebesar 5% dalam pengambilan kesimpulan kemaknaan statistik. Kurva *receiver operating characteristic* (ROC) dan *area under the curve* (AUC), dihitung masing-masing untuk data klinis, PCT, dan secara bersama-sama untuk kedua paramater diagnostik tersebut.

HASIL

Jumlah pasien diabetes melitus dengan ulkus kaki diabetik terinfeksi yang dirawat selama periode ini sebanyak 73 orang. Namun, pasien yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dan bisa dilakukan *sampling* hanya sebanyak 47 orang. Kriteria subjek penelitian ditampilkan pada Tabel 1.

Sebagian besar pasien dengan ulkus kaki diabetik

yang terinfeksi datang ke RSCM dalam kondisi infeksi yang berat menurut kriteria IDSA-IWGDF. Pasien biasanya datang setelah 14 hari (rentang 1-40 hari) mengalami luka, setelah mencoba merawat luka sendiri ataupun dirawat oleh dokter umum. Semua pasien dengan ulkus sudah mengalami deformitas pada kaki. Deformitas yang dimaksud adalah ditemukannya kelainan pada kulit, antara lain kulit kering dan bersisik, tumit pecah-pecah, bulu rambut menipis, kalus, kelainan kuku, kelainan bentuk kaki dan jari (*hallux valgus*, *pes cavus*, *charcoat foot*, *hammer toe*, *claw toe*, hiperekstensi, maserasi di antara jari). Karakteristik ulkus pada subjek disajikan pada Tabel 2.

Penelitian ini mencoba menilai kemampuan penanda klinis infeksi berdasarkan kriteria IDSA-IWGDF yang dimodifikasi dalam menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan. Penanda klinis yang dievaluasi antara lain eritema, edema, panas, dan nyeri. Satu penanda klinis yaitu adanya eksudat purulen tidak dimasukkan karena sudah dijadikan salah satu kriteria eksklusi dalam pemilihan pasien yang akan diikutsertakan pada penelitian. Jika dilihat dari *kurva receiver operating characteristic* (ROC) pada Gambar 1, terlihat bahwa kriteria klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF yang dimodifikasi memiliki kemampuan prediksi infeksi yang cukup baik dengan *area under curve* (AUC): 0,744 (interval kepercayaan [IK] 95% 0,576-0,912).

Tabel 3 menyajikan hasil analisis kadar PCT pada berbagai interval hari *sampling*. Lamanya hari *sampling* dihitung sejak hari pertama pasien dirawat di rumah sakit sampai hari saat dilakukan pengambilan sampel pada pasien. Pada penelitian ini dilakukan analisis peranan PCT untuk menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan melalui penghitungan kurva ROC dan nilai AUC (Gambar 2). Namun demikian, nilai tambah PCT terhadap penanda klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF yang dimodifikasi untuk menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan belum dapat ditentukan. Hal ini disebabkan karena didapatkan hasil PCT yang tidak bermakna pada analisis statistik sebelumnya, sehingga tidak dilakukan analisis lebih lanjut untuk menentukan nilai tambah PCT.

DISKUSI

Karakteristik Luka Subjek Penelitian

Pada penelitian ini didapatkan median luas luka pasien $39,6 \text{ cm}^2$ (rentang $2-399 \text{ cm}^2$) (Tabel 2). Pada awalnya, semua pasien datang dengan infeksi yang berat

Tabel 1. Karakteristik subjek penelitian

Karakteristik	
Jenis Kelamin Perempuan, n (%)	26 (55,3)
Usia, rerata (Simpang Baku [SB])	56,43 tahun (8,85)
Lama rawat inap (hari), median (rentang)	22 (6-80)
Interval <i>sampling</i> (hari)*, median (rentang)	14 (6-42)
Lama diabetes (tahun), median (rentang)	5 (0-28)
Riwayat pengobatan	
OHO	33 (70,2)
Insulin	10 (21,3)
Kombinasi OHO dan insulin	9 (19,1)
Belum pernah berobat	13 (27,7)
Retinopati diabetik	33 (70,2)
Nefropati diabetik	43 (91,5)
Laboratorium	
Hemoglobin (g/dL), rerata (SB)	10,45 (1,4)
Gula darah sewaktu (g/dL), rerata (SB)	244,68 (91,97)
Albumin (g/dL), rerata (SB)	3,00 (0,48)
HbA1c (%), rerata (SB)	8,82(2,09)
Prokalsitonin (ng/mL), median (rentang)	0,1(0,01-22,6)
Rontgen: Osteomielitis	21 (44,7)

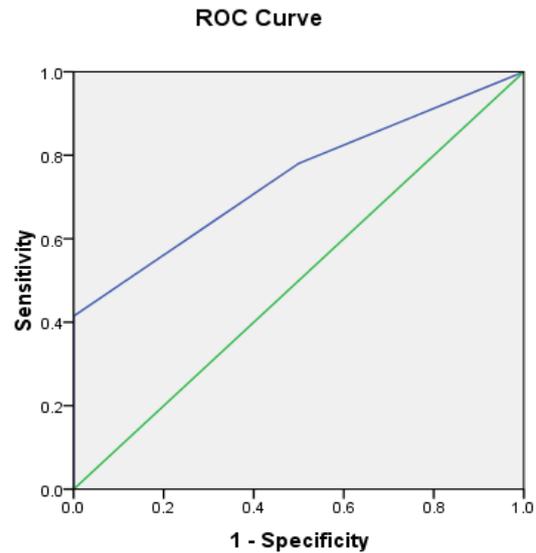
OHO=obat hipoglikemik oral; *=hari mulai pasien dirawat sampai diambil sampel untuk penelitian

Tabel 2. Karakteristik ulkus kaki pada subjek penelitian

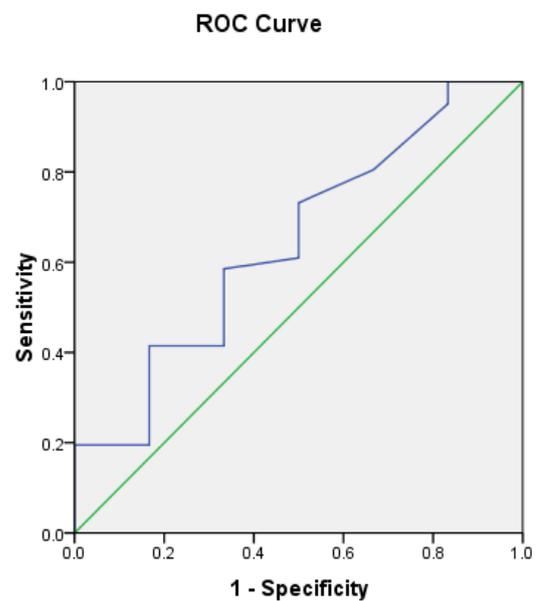
Karakteristik	
Luas ulkus (cm ²), median (rentang)	39,6 (2-399)
Dasar ulkus, n (%)	
Subdermis	9 (19,1)
Fascia	6 (12,8)
Otot	11 (23,4)
Tendon	9 (19,1)
Tulang	12 (25,5)
Jaringan granulasi 75-100%	40 (85,1)
Jaringan nekrosis positif, n (%)	38 (80,9)
Ankle brachial index, n (%)	
Kaki kanan (n= 45), rerata (SB)	1,01 (0,13)
Kaki kiri (n= 46), rerata (SB)	1,007 (0,21)
Peripheral arterial disease (n=46), n (%)	
Poorly compressible (>1,3)	1 (2,1)
Normal (0,91-1,3)	31 (66)
Mild (0,7-0,9)	13 (27,7)
Moderate (0,4-0,69)	1 (2,1)
Neuropati, n (%)	42 (89,4)
Jenis bakteri penyebab infeksi, n (%)	
Bakteri Gram positif	18 (36,7)
Bakteri Gram negatif	31 (63,3)

Tabel 3. Kadar prokalsitonin pada berbagai interval hari sampling

Interval hari sampling	Median PCT (rentang) [ng/mL]
0-7	0,04 (0,02-0,07)
8-14	0,07 (0,01-0,82)
15-21	0,12 (0,30-0,71)
22-28	0,48 (0,38-0,49)
>28	0,60 (0,10-22,6)



Gambar 1. Kurva ROC penanda klinis infeksi IDSA-IWGDF yang dimodifikasi



Gambar 2. Kurva ROC PCT

pada ulkus dan biasanya luka sudah ada lebih dari 14 hari sebelum pasien berobat ke rumah sakit. Sebagian besar pasien mempunyai riwayat luka yang sama sebelumnya yaitu sebanyak 23,4% pasien telah menjalani amputasi. Jenis amputasi bervariasi mulai dari amputasi jari hingga amputasi kaki. Ulkus lebih sering dijumpai pada daerah dorsal dan lateral kaki serta pada daerah plantar dan lateral. Ulkus juga sering terdapat pada regio kaki tengah (*mid foot*).

Semua pasien dengan ulkus sudah mengalami deformitas pada kaki. Kondisi ini menunjukkan bahwa walaupun pasien belum lama terdiagnosis diabetes, sebenarnya proses terjadinya komplikasi sudah dimulai sejak lama. Keterlambatan penegakkan diagnosis diabetes kemungkinan berkaitan dengan tingkat pendidikan pasien yang rendah, tingkat penghasilan yang rendah, ataupun jangkauan pelayanan kesehatan yang belum memadai.

Iskemia ditemukan pada 30% pasien. Sebagian besar adalah penyakit arteri perifer derajat ringan. Neuropati ditemukan pada 89,4% kasus (Tabel 2). Beberapa literatur melaporkan bahwa sebagian besar ulkus kaki diabetik adalah ulkus neuropatik diikuti dengan ulkus iskemik dan kombinasi keduanya. Namun, terdapat ketidaksesuaian lokasi ulkus neuropatik yang menurut literatur tersebut lebih sering ditemukan pada kaki depan (*fore foot*), sedangkan pada penelitian ini ulkus banyak ditemukan pada *mid foot*.²¹

Soewondo²² pada penelitiannya juga melaporkan bahwa dasar ulkus yang paling banyak adalah otot dan tulang, yaitu masing-masing didapatkan pada 35% pasien dengan riwayat luka sebelumnya didapatkan pada 57% pasien. Angka ini tidak berbeda dengan hasil yang ditemukan pada penelitian ini. Namun, riwayat amputasi sebelumnya lebih kecil yaitu sebesar 8%. Lama luka sebelum pasien berobat juga sama yaitu 14 hari (rentang 7-21 hari), sedangkan median luas luka adalah 47,3 cm² (rentang 21,88-71,63 cm²).²²

Data yang tidak jauh berbeda didapatkan pada penelitian Lavery, dkk.²¹ pada pasien dengan ulkus kaki terinfeksi, yang mana 53,3% pasien memiliki riwayat luka sebelumnya. Oyibo, dkk.²³ pada penelitiannya mendapatkan bahwa 67% dari ulkus kaki diabetik adalah ulkus neuropatik dan lebih sering terjadi di kaki bagian depan (*fore foot*) yaitu kurang lebih pada 77,8% kasus. Rerata luas luka pada penelitian Oyibo, dkk.²³ yaitu 1,5 cm² (0,6-4 cm²). Penelitian tersebut melaporkan bahwa luas luka pada saat awal berkorelasi dengan waktu penyembuhan luka ($r=0,27$ $p<0,0001$) dan prediksi penyembuhan ($p<0,04$).

Pada penelitian ini didapatkan bahwa sebagian

besar bakteri adalah batang gram negatif dengan *P. aeruginosa* merupakan penyebab infeksi terbanyak (Tabel 2). Pada penelitian ini tidak didapatkan adanya bakteri anaerob walaupun sudah dilakukan teknik isolasi bakteri yang baik dan benar. Kondisi ini bisa disebabkan karena pasien sudah pernah mendapatkan antibiotik spektrum luas sebelumnya yang juga dikombinasi dengan antibiotik untuk membunuh bakteri anaerob. Selain itu, pasien juga sudah rutin menjalani debrideman yang menyebabkan seluruh permukaan luka terpapar dengan udara.

Penelitian oleh Ertugul, dkk.²⁴ melaporkan bahwa infeksi kaki diabetik paling sering disebabkan oleh *P. aeruginosa* (18,3%), *Streptococcus spp.* (14,8%), dan *Staphylococcus aureus* (13,9%). Pada penelitian tersebut *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) ditemukan pada tiga pasien, sedangkan bakteri gram negatif penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamase* (ESBL) ditemukan pada tujuh pasien. Hasil ini berbeda dengan temuan pada penelitian ini, yang mana MRSA ditemukan pada tujuh isolat, sedangkan bakteri gram negatif penghasil ESBL ditemukan pada dua isolat.

Pada penelitian ini, peneliti mendapatkan pola infeksi bakteri monomikrobial sebanyak 72,3% dan 19,1% polimikrobial. Hasil yang berbeda didapatkan oleh Al-Benwan, dkk.²⁵ yang melaporkan bahwa 75% infeksi bersifat polimikrobial, sedangkan 25% lainnya monomikrobial. Perbedaan hasil ini kemungkinan juga dipengaruhi oleh pengambilan sampel pada penelitian ini yang dilakukan setelah pasien mendapatkan terapi antibiotik dan debrideman, sehingga banyak bakteri yang sudah mati.

Penggunaan jumlah bakteri pergram jaringan (*bacterial load*) sebagai baku emas penentuan infeksi pada penelitian ini didasarkan pada pengertian infeksi itu sendiri yang akan terjadi pada saat multiplikasi bakteri dan kemampuan invasinya melebihi respon sistem imun dalam mengatasinya, sehingga terjadi kerusakan jaringan. Jumlah bakteri >10⁵ pergram jaringan merupakan nilai kritis untuk peralihan dari kolonisasi ke infeksi.^{13,26-30} Pada pasien diabetes, manifestasi inflamasi akibat infeksi bakteri sering tidak khas ataupun tidak sejalan dengan *bacterial load*. Kondisi ini seringkali dipengaruhi usia, gangguan perfusi jaringan, dan oksigenisasi serta efek hiperglikemia. Pada saat gambaran klinis infeksi tidak jelas, *bacterial load* merupakan indikator terbaik untuk menyatakan infeksi atau tidak infeksi pada ulkus kaki diabetik. Spesimen harus berasal dari jaringan ulkus, sehingga dipilih jaringan sebagai bahan pemeriksaan untuk kultur. Hal tersebut disebabkan bakteri pada jaringan paling sesuai untuk menggambarkan bakteri penyebab infeksi, bukan bakteri

kontaminan.^{13,26,30}

Jaringan yang dipilih umumnya diambil dari sisa jaringan nekrotik yang masih ada setelah dilakukan debrideman. Jaringan nekrotik ini berisi jaringan-jaringan kaki yang mati dan bakteri. Pada penelitian ini juga dilakukan hal yang serupa. Namun, belakangan muncul pertanyaan apabila kita akan mengevaluasi ada tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah terapi, apakah spesimen jaringan yang diambil dari sisa-sisa jaringan nekrotik yang ada bisa mencerminkan ada tidaknya infeksi pada jaringan ulkus secara keseluruhan. Sebab, pada penelitian ini ditemukan bahwa sebagian besar ulkus sudah memiliki jaringan granulasi antara 75-100% dengan gambaran infeksi secara klinis sudah membaik. Namun, pada pemeriksaan *bacterial load*, 87,23% masih terinfeksi.

Gardner dan Frantz³⁰ pada tahun 2008 mengajukan usulan agar pengambilan spesimen jaringan untuk *bacterial load* berasal dari jaringan ulkus yang viable (yang sudah mulai perbaikan) dan bukan dari jaringan yang nekrotik. Peneliti lebih setuju dengan apa yang diusulkan oleh Gardner dan Frantz ini. Sehingga, selanjutnya dapat dilakukan penelitian dengan menggunakan cara tersebut sebagai standar tindakan.

Peranan Penanda Klinis Infeksi Menurut Kriteria IDSA-IWGDF yang Dimodifikasi dalam Menentukan Masih Ada atau Tidaknya Infeksi pada Ulkus Kaki Diabetik setelah Pengobatan

Penelitian ini menggunakan kriteria IDSA-IWGDF yang dimodifikasi dengan tidak memasukkan eksudat purulen atau pus sebagai salah satu parameter yang dinilai. Sebab, pada praktiknya klinisi seringkali menjadikan pus sebagai salah satu patokan dalam pemberian antibiotik yaitu apabila masih ada pus, ulkus dianggap masih terinfeksi jadi antibiotik akan tetap diberikan. Sementara itu, pada saat pus tidak ditemukan lagi dengan kondisi luka yang mulai perbaikan namun masih terbuka, klinisi menjadi ragu apakah proses infeksi masih ada atau tidak dan apakah antibiotik akan tetap diberikan atau tidak. Oleh karena itu, tidak adanya pus dijadikan salah satu kriteria eksklusi pasien.

Eksudat purulen atau pus terbentuk setelah terjadi eksudasi dari cairan plasma ke daerah infeksi. Cairan ini bercampur dengan neutrofil dan makrofag yang bermigrasi ke daerah luka akibat rangsangan dari sitokin-sitokin proinflamasi, kemudian memfagositosis bakteri yang ada pada luka. Jadi, pus biasanya terdiri dari cairan plasma yang terkadang bercampur darah, neutrofil, makrofag, dan debris-debris bakteri yang mati. Tidak adanya pus bisa menjadi indikator perbaikan infeksi pada luka sekaligus

penyembuhan luka itu sendiri.³¹

Pada penelitian ini, peneliti mendapatkan bahwa kriteria klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF yang dimodifikasi mempunyai kemampuan prediksi infeksi yang cukup baik untuk menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan. Pada kurva ROC didapatkan nilai AUC= 0,744 (IK 95% 0,576-0,912) dan titik potong bila ditemukan ≥ 2 tanda klinis infeksi pada pemeriksaan kaki (Gambar 1). Titik potong yang didapatkan pada penelitian ini sama dengan titik potong yang selama ini digunakan pada kriteria klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF dalam menegakkan diagnosis infeksi pada ulkus kaki diabetik. Dengan demikian, kriteria ini setelah dimodifikasi dapat digunakan untuk menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan.

Pada penelitian ini juga didapatkan hasil spesifisitas kriteria klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF yang dimodifikasi sangat baik, yaitu mencapai 100%. Hal tersebut dapat diartikan bahwa apabila masih ditemukan tanda-tanda klinis infeksi, maka apabila dievaluasi dengan menggunakan kriteria IDSA-IWGDF yang dimodifikasi hasilnya akan menunjukkan bahwa ulkus kaki pasien masih terinfeksi. Konsekuensinya yaitu antibiotik akan tetap diberikan.

Hasil tersebut didukung dengan didapatkannya nilai prediksi positif yang tinggi mencapai 100%. Artinya, apabila dengan kriteria IDSA-IWGDF ditemukan hasil yang positif, maka bisa dipastikan bahwa ulkus kaki pasien masih terinfeksi. Untuk kepentingan klinis, nilai prediksi ini sangat penting karena pada praktiknya seringkali ditemukan pasien yang datang dengan kondisi klinis tertentu disertai berbagai pemeriksaan penunjang yang mengharuskan klinisi mengambil kesimpulan dengan data-data yang ada. Oleh karena itu, dengan mengetahui nilai prediksi dari berbagai pemeriksaan yang ada, akan membantu klinisi dalam mengambil keputusan dan menyimpulkan diagnosis yang tepat.

Membandingkan hasil penelitian ini dengan penelitian sebelumnya agak sulit dilakukan karena latar belakang penelitian yang berbeda dengan kriteria yang digunakan dan tujuan yang berbeda pula. Dua penelitian sebelumnya dilakukan pada saat awal pasien datang mencari pengobatan dan bertujuan untuk menegakkan diagnosis infeksi pada ulkus kaki diabetik sebelum dimulai pengobatan. Pada saat tersebut, umumnya tanda-tanda klinis infeksi lebih jelas ditemukan. Oleh karena itu, tes dengan sensitivitas yang tinggi mungkin lebih dibutuhkan untuk menyingkirkan pasien-pasien yang tidak terinfeksi (*rules out*) sehingga tidak terjadi kesalahan diagnosis yang

menyebabkan kesalahan terapi.^{13,26} Sedangkan, penelitian ini dilakukan pada saat pasien sudah mendapatkan terapi yang umumnya tanda-tanda klinis infeksi sudah tidak jelas lagi ditemukan.

Penelitian ini mencoba untuk menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan yang nantinya bisa membantu pengambilan keputusan pemberian antibiotik. Oleh karena itu, tes dengan spesifisitas yang tinggi lebih dibutuhkan sehingga pasien-pasien yang secara klinis masih terinfeksi akan dapat terdiagnosis (rules in) dan tidak terjadi kesalahan diagnosis yang menyebabkan pengobatan berlebihan. Nilai prediksi positif yang tinggi juga sangat membantu dalam menentukan pasien-pasien yang secara klinis masih terinfeksi.

Peranan Prokalsitonin dalam Menentukan Masih Ada atau Tidaknya Infeksi pada Ulkus Kaki Diabetik setelah Pengobatan

Pada Tabel 3 terlihat bahwa semakin lama waktu *sampling* maka kadar PCT pada subjek semakin tinggi. Sebab, semakin lama subjek diambil untuk sampel menunjukkan proses penyembuhan ulkus yang semakin lama yang juga menunjukkan kondisi infeksi pada ulkus yang lebih berat pada awalnya. Pada penelitian ini dari kurva ROC didapatkan nilai AUC untuk PCT adalah 0,647 (IK 95% 0,404-0,880) (Gambar 2). Berdasarkan nilai IK 95% yang melewati 0,5, maka secara statistik penilaian kadar PCT tidak bermanfaat dalam menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik yang telah menjalani pengobatan.

Hal yang berbeda diperoleh pada beberapa penelitian lain yang menggunakan PCT untuk menegakkan diagnosis serta evaluasi infeksi pada ulkus kaki diabetik. Uzun, dkk.³² mendapatkan kesimpulan bahwa PCT mempunyai kemampuan lebih baik dibandingkan leukosit, LED, dan *C-reactive protein* (CRP) dalam membedakan kondisi infeksi dan tidak infeksi pada ulkus kaki diabetik dengan nilai potong 0,08 ng/mL, sensitivitas= 77%, spesifisitas= 100%, dan AUC= 0,859 ($p < 0,001$). Sementara itu, Jeandrot, dkk.³³ menyimpulkan bahwa kombinasi CRP dan PCT dengan AUC= 0,947 mempunyai kemampuan lebih baik dalam membedakan infeksi dan tidak infeksi pada ulkus kaki diabetik. Althay, dkk.³⁴ mendapatkan penurunan kadar PCT setelah terapi pada infeksi kaki diabetik yaitu dari 0,6 (SB 2,1) menjadi 0,05 (SB 0,02) dengan nilai $p = 0,007$.

Sulit untuk membandingkan hasil penelitian ini dengan penelitian-penelitian sebelumnya karena perbedaan latar belakang penelitian dan baku emas yang

digunakan. Pada penelitian Uzun, dkk.³² dan Jeandrot, dkk.³³, pemeriksaan PCT dilakukan pada saat pasien pertama kali datang untuk berobat dan dilakukan sebelum antibiotik diberikan. Tujuannya untuk melihat peranan PCT dalam penegakkan diagnosis infeksi pada ulkus kaki diabetik di awal pengobatan yang nantinya akan sangat membantu untuk memulai pengobatan antibiotik. Selain itu, kedua penelitian ini menggunakan kriteria klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF sebagai baku emas.

Sementara itu, pada penelitian ini tujuan yang ingin dicapai yaitu untuk mengevaluasi masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik. Pemeriksaan PCT dilakukan setelah pasien mendapatkan pengobatan yang nantinya dapat membantu dalam pengambilan keputusan apakah terapi antibiotik akan diteruskan atau tidak. Selain itu, baku emas yang digunakan yaitu berdasarkan pemeriksaan bakteri secara kuantitatif.

Untuk mengevaluasi hasil yang tidak bermakna yang diperoleh pada pemeriksaan PCT, pertama dilakukan analisis dari segi desain penelitian. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan peranan penanda klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF yang dimodifikasi serta peranan PCT dalam menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan. Dengan demikian, suatu riset diagnostik dengan desain potong lintang dengan pengambilan sampel yang dilakukan secara konsekutif merupakan pilihan yang tepat. Parameter yang dinilai yaitu antara lain kriteria klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF yang dimodifikasi juga sudah sesuai karena kriteria yang sering digunakan oleh klinisi untuk mendiagnosis infeksi pada ulkus kaki diabetik. Modifikasi yang dilakukan menyesuaikan dengan latar belakang penelitian seperti yang sudah dijelaskan sebelumnya. Pemilihan PCT sebagai salah satu parameter yang dinilai dan pemilihan baku emas berupa penghitungan jumlah bakteri secara kuantitatif juga berdasarkan studi literatur dan penelitian-penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya. Pada fase penyembuhan ulkus kaki diabetik, tanda-tanda klinis infeksi tidak terlalu jelas, sehingga *bacterial load* bisa digunakan untuk membedakan antara infeksi dan kolonisasi. Jadi, secara desain dan parameter yang dinilai pada penelitian ini sudah tepat.

Namun demikian, secara statistik dalam penghitungan jumlah sampel ada asumsi awal yang salah. Dimana pada saat awal penelitian ditentukan laju penyembuhan infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan berdasarkan literatur adalah 50%. Sementara itu, dari hasil penelitian ini didapatkan angka 12%, sehingga pada penelitian ini jumlah sampel yang dikumpulkan kurang jika dibandingkan dengan yang

seharusnya. Akibatnya, kekuatan (*power*) penelitiannya menjadi kurang dan hal ini dapat berpengaruh terhadap kemaknaan hasil penelitian.

Penyebab lain yang mungkin adalah pemeriksaan PCT dilakukan setelah pasien mengalami perbaikan luka. Mungkin saja pada saat awal infeksi ulkus kaki diabetik menyebabkan infeksi secara sistemik, sehingga kadar PCT akan meningkat secara bermakna. Sedangkan pada fase penyembuhan, infeksi yang ada bersifat lokal sehingga tidak dapat memacu respon imun yang adekuat untuk menyebabkan peningkatan produksi PCT. Hal ini didukung oleh penelitian Altay, dkk.³⁴ yang melaporkan bahwa terdapat penurunan kadar PCT setelah pengobatan.

Kondisi lain yang bisa dipertimbangkan adalah terjadinya disfungsi sistem imun pada penderita diabetes. Geerlings dan Hoepelman³⁵ dalam studinya secara *in vitro* mendapati pada pasien diabetes terjadi penurunan aktivitas makrofag, baik untuk kemotaksis maupun fagositosis. Sehingga, pada saat terjadi infeksi bakteri, makrofag tidak terangsang. Akibatnya, tidak terjadi pelepasan TNF α dan IL 1β yang menyebabkan tidak terangsangnya sintesis PCT.

Pada penelitian ini, tidak dilakukan analisa lebih lanjut mengenai nilai tambah PCT terhadap kriteria klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF yang dimodifikasi dalam menentukan masih ada atau tidaknya infeksi ulkus kaki diabetik setelah pengobatan. Sebab, analisis sebelumnya menunjukkan hasil yang tidak bermakna. Berdasarkan hal ini terlihat bahwa tidak ada peranan PCT dalam menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan. Pemeriksaan PCT tidak terbukti memberikan nilai tambah terhadap kriteria klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF yang dimodifikasi dalam prediksi masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan.

Pada penelitian ini memang belum ditemukan manfaat PCT dalam mengevaluasi masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan. Namun, dari panduan terakhir tahun 2012 yang dikeluarkan, IDSA mulai mempertimbangkan pemeriksaan PCT serta kombinasinya dengan CRP dalam penegakkan diagnosis infeksi pada ulkus kaki diabetik.³⁶ Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai PCT dan infeksi ulkus kaki diabetik.

Kelebihan dan Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian diagnostik pertama di Indonesia yang menggunakan kriteria klinis infeksi berdasarkan IDSA-IWGDF yang dimodifikasi dan PCT untuk menilai masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus

kaki diabetik setelah pengobatan. Dengan demikian, hasil penelitian ini dapat memberikan tambahan pengetahuan dan landasan untuk penelitian-penelitian selanjutnya mengenai peranan prokalsitonin pada infeksi ulkus kaki diabetik. Demikian pula baku emas yang digunakan pada penelitian ini, yaitu penghitungan jumlah bakteri pergram jaringan ulkus juga baru pertama kali dilakukan di Indonesia.

Namun demikian, kekurangan penelitian ini adalah tidak adanya patokan yang baku dalam menentukan kapan waktu yang tepat untuk pengambilan sampel pada subjek. Sebab, pada penelitian ini keputusan waktu pengambilan sampel didasarkan pada pendapat ahli. Kedepannya perlu ditetapkan satuan yang baku untuk memutuskan kapan pengambilan sampel dilakukan untuk lebih memudahkan evaluasi. Selain itu, pada penelitian ini terdapat kesalahan asumsi awal pada saat penghitungan jumlah sampel, sehingga sampel yang dikumpulkan kurang yang menyebabkan *power* penelitian juga kurang. Hal ini terlihat dari rentang IK 95% untuk AUC PCT yang luas. Dengan menambah jumlah sampel seperti yang seharusnya dibutuhkan dapat mempersempit rentang ini, sehingga hasil yang diperoleh bisa lebih bermakna. Namun, rentang IK 95% yang menyempit ini tidak akan mengubah nilai AUC PCT dan kemampuan prediksinya.

Pada penelitian ini, kemampuan prediksi PCT untuk menentukan ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik yang telah menjalani pengobatan adalah 64%. Suatu alat ataupun pemeriksaan tertentu, untuk bermanfaat secara klinis dalam pengambilan keputusan apakah itu untuk diagnostik, pengobatan, ataupun evaluasi pengobatan, sebaiknya kemampuan prediksinya lebih dari 80%. Jadi, hasil yang bermakna secara statistik belum tentu bermakna secara klinis.

SIMPULAN

Penanda klinis infeksi menurut IDSA-IWGDF yang dimodifikasi memiliki kemampuan yang cukup baik dalam menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan. Sementara itu, belum didapatkan manfaat prokalsitonin dalam menentukan masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan. Nilai tambah prokalsitonin terhadap penanda klinis infeksi menurut kriteria IDSA-IWGDF yang dimodifikasi dalam memprediksi masih ada atau tidaknya infeksi pada ulkus kaki diabetik setelah pengobatan tidak dapat ditentukan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Boulton A. *Grand overview, pathogenesis and epidemiology*

- of diabetic foot. In: Bakker K, Van Erven NC, Van Houtum WH, editors. The diabetic foot. Programme and abstract book of The 5th International Symposium on The Diabetic Foot; 2007 May 9-12; Noordwijkerhout; Netherlands. Amsterdam: Audiovisual Centre, VU University Medical Center; 2007. p. 24.
2. Ulbrecht JS, Cavanagh PR, Caputo GM. Foot problems in diabetes: an overview. *Clin Infect Dis*. 2004;39(suppl 1):S73-82.
 3. Boulton AJM, Vileikyte L, Ragnason-Tennvall G, Aplqvist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet*. 2005;366(9498):1719-24.
 4. Ramsey DS, Newton K, Blough D, McCullough DK, Sandhu N, Reiber GE, et al. Incidence, outcomes and cost of foot ulcers in patients with diabetes. *Diabetes Care*. 1999; 22(3):382-7.
 5. Sheehan P. *The role of systemic diseases in diabetic foot complications*. In: Armstrong DG, Lavery LA, editors. Clinical care of the diabetic foot. Canada: American Diabetes Association; 2005. p.1-11.
 6. Nather A, Aziz Z, Tambyah PA, Chan YH. *Diabetic foot infection: epidemiology and predictive factors for limb loss*. In: Nather A, editor. Diabetic foot problems. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd; 2008. p.205-20.
 7. Apelqvist J, Ragnarson-Tennvall G, Persson U, Larsson J. Diabetic foot ulcers in multidisciplinary setting: an economic analysis of primary healing and healing with amputation. *J Intern Med*. 1994;235(5):463-71.
 8. Ragnarson TG, Apelqvist J. Health and economic consequences of diabetic foot lesions. *Clin Infect Dis*. 2004;39(Suppl 2):S132-9.
 9. Van Baal JG, Harding KG, Lipsky BA. Foot infections in diabetic patients: an overview of the problem. *Clin Infect Dis*. 2004;39(Suppl 2):S71-2.
 10. Lipsky BA. *Infectious problems of the foot in diabetic patients*. In: Bowker JH, Pfeifer MA, editors. Levin and O'Neal's the diabetic foot. 7th Ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2008. p.305-18.
 11. Puhaindran ME. *Principles of wound healing*. In: Nather A, editor. Diabetic foot problems. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd; 2008. p.395-402.
 12. Lipsky BA, Berendt AR, Deery HG, Embil JM, Joseph WS, Karchmer AW, et al. IDSA guidelines: diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis*. 2004;39(1):885-910.
 13. Nelson EA, O'Meara S, Craig D, Iglesias C, Golder S, Dalton J, et al. A series of systematic reviews to inform a decision analysis for sampling and treating infected diabetic foot ulcers. *Health Technol Assess*. 2006;10(12):1-4.
 14. Maruna P, Nedelnikova K, Gurlich R. Physiology and genetics of procalcitonin. *Physiol Res*. 2000;49(Suppl 1):S41-57.
 15. Muller B, Becker KL. Procalcitonin: how a hormone became a marker and mediator of sepsis. *Swiss Med Wkly*. 2001;131(41-42):595-602.
 16. Delevaux I, Andre M, Colombier M, Albuisson E, Meylheuc F, Begue RJ, et al. Can procalcitonin measurement help differentiating between bacterial infection and other kinds of inflammatory processes? *Ann Rheum Dis*. 2003;62(4):337-40.
 17. Hatherill M, Tibby SM, Sykes K. Diagnostic markers of infection: comparison of procalcitonin with C-reactive protein and leucocyte count. *Arch Dis Child*. 1999;81(5):417-21.
 18. Shehabi Y, Seppelt I. Review: pro/con debate: is procalcitonin useful for guiding antibiotic decision making in critically ill patients? *Crit Care*. 2008;12(3):211-5.
 19. Ulbrecht JS, Cavanagh PR, Caputo GM. Foot problems in diabetes: an overview. *Clin Infect Dis*. 2004;39(Suppl 2): S73-82.
 20. Becker KL, Snider R, Nylan ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection and sepsis: clinical utility and limitations. *Crit Care Med*. 2008;36(3):941-52.
 21. Lavery LA, Armstrong DG, Wunderlich RP, Mohler MJ, Wendel CS, Lipsky BA. Risk factors for foot infection in individuals with diabetes. *Diab Care*. 2006; 29(6): 1288-93.
 22. Soewondo P. *Prediksi penyembuhan luka ulkus kaki diabetik akut: peran faktor Risiko klinis dan penanda fungsi vasodilatasi, kalsifikasi vaskular serta angiogenesis [Disertasi]*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2011.
 23. Oyibo SO, Jude EB, Tarawneh I, Nguyent HC, Armstrong DG, Harkless LB, et al. The effects of ulcer size and site, patient's age, sex and type and duration of diabetes on the outcome of diabetic foot ulcers. *Diabet Med*. 2001;18(2):133-8.
 24. Ertugul BM, Oncul O, Tulek N, Wilke A, Sacar S, Tuncean OG, et al. A prospective, multicenter study: factors related to the management of diabetic foot infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(9):2345-52.
 25. Al Benwan K, Al Mulia A, Rotimi VO. A study of the microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Kuwait. *J Infect Public Health*. 2012;5(1):1-8.
 26. Gardner SE, Hillis LE, Frantz RA. Clinical sign of infection in diabetic foot ulcer with high microbial load. *Biol Res Nurs*. 2009;11(2):119-28.
 27. Xu L, McLennan SV, Lo L, Natfah A, Bolton T, Liu Y. Bacterial load predicts healing rate in neuropathic diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*. 2007;30(2):378-80.
 28. William DT, Hilton JR, Harding KG. Diagnosing foot infection in diabetes. *Clin Infect Dis*. 2004;39(Suppl 2):S83-6.
 29. Lavery LA, Armstrong DG, Murdoch DP, Peters EJG, Lipsky BA. Validation of the Infectious Diseases Society of America's diabetic foot infection classification system. *Clin Infect Dis*. 2007;44(4):562-5.
 30. Gardner SE, Frantz RA. Wound bioburden and infection-related complications in diabetic foot ulcers. *Biol Res Nurs*. 2008;10(1):44-53.
 31. Bates-Jensen BM, Ovington LG. *Management of exudate and infection*. In: Sussman C, Bates-Jensen BM, editors. Wound care: a collaborative practice manual for health professionals. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p.215-32.
 32. Uzun G, Solmazgul E, Curuksulu H, Turhan V, Ardic N, Top C, et al. Procalcitonin as a diagnostic aid in diabetic foot infections. *Tohoku J Exp Med*. 2007;213(4):305-12.
 33. Jeandrot A, Richard JL, Combesure C, Jourdan N, Finge S, Rodier M, et al. Serum procalcitonin and C-reactive protein concentrations to distinguish mildly infected from non-infected diabetic foot ulcers: a pilot study. *Diabetologia*. 2008;51(2):347-52.
 34. Altay FA, Sencan I, Senturk GC, Altay M, Guvenman S, Unverdi S, et al. Does treatment affect the levels of serum interleukin-6, interleukin-8 and procalcitonin in diabetic foot infection? A pilot study. *J Diabetes Complications*. 2012;26(3):214-8.
 35. Geerlings SE, Hoepelman AIM. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999;26(3-4):259-65.
 36. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJG, Armstrong DG, et al. 2012 infectious diseases society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis*. 2012;54(12):132-73.