



HAL
open science

Évaluation du système Unyvero® ITI dans le cadre de la prise en charge des ostéites du pied chez le diabétique

Charlotte Carrère

► To cite this version:

Charlotte Carrère. Évaluation du système Unyvero® ITI dans le cadre de la prise en charge des ostéites du pied chez le diabétique. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01761592

HAL Id: dumas-01761592

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01761592>

Submitted on 9 Apr 2018

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.

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le Vendredi 6 Avril 2018

Par M^{elle} Charlotte CARRERE
Née le 25 décembre 1988 à Perpignan

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

**Evaluation du système Unyvero[®] ITI dans le cadre de la prise en
charge des ostéites du pied chez le diabétique**

----oOo----

JURY :

Président : Pr. Jean-Marc ROLAIN
Membres : Pr. Jean-Philippe LAVIGNE (Directeur de thèse)
Pr Hélène MARCHANDIN
Pr Albert SOTTO
Dr Catherine DUNYACH-REMY

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le Vendredi 6 Avril 2018

Par M^{elle} Charlotte CARRERE
Née le 25 décembre 1988 à Perpignan

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

**Evaluation du système Unyvero[®] ITI dans le cadre de la prise en
charge des ostéites du pied chez le diabétique**

----oOo----

JURY :

Président : Pr. Jean-Marc ROLAIN

Membres : Pr. Jean-Philippe LAVIGNE (Directeur de thèse)

Pr Hélène MARCHANDIN

Pr Albert SOTTO

Dr Catherine DUNYACH-REMY

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen : Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens : M. Jean-Paul BORG, M. Philippe CHARPIOT, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission : M. David BERGE-LEFRANC, M. François DEVRED, Mme Caroline DUCROS, Mme Pascale BARBIER
Conseiller du Doyen : M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires : M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
Professeurs émérites : M. José SAMPOL, M. Jean-Pierre REYNIER
Professeurs honoraires : M. Guy BALANSARD, M. Jacques BARBE, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI,
Chef des Services Administratifs : Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet : Mme Sandrine NOURIAN
Responsable de la Scolarité : Mme Myriam TORRE

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Caroline MONTET

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN
Mme Florence SABATIER-MALATERRE

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI
M. Thierry AUGIER
M. Edouard LAMY
Mme Alexandrine BERTAUD
Mme Claire CERINI
Mme Edwige TELLIER
M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Nathalie BARDIN
Mme Dominique ARNOUX
Mme Aurélie LEROYER
M. Romaric LACROIX

MICROBIOLOGIE

Mme Michèle LAGET
M. Michel DE MEO
Mme Anne DAVIN-REGLI
Mme Véronique ROUX
M. Fadi BITTAR
Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Sylvie COINTE

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

M. Henri PORTUGAL
Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Philippe GALLICE

CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE –
CHIMIE THERAPEUTIQUE

M. Pascal RATHELOT
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE
M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

Mme Evelyne OLLIVIER

PROFESSEURS ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (P.A.S.T.)

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE

M. Jean-Pierre CALISSI

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL
Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Elisabeth SCHREIBER-DETURMENY
Mme Catherine DEFOORT
M. Alain NICOLAY
Mme Estelle WOLFF
Mme Elise LOMBARD

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC
M. Pierre REBOUILLON

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Catherine DIANA
Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT
Mme Caroline DUCROS
M. Marc MONTANA

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE
HYDROLOGIE

M. Armand GELLIS
M. Christophe CURTI
Mme Julie BROGGI
M. Nicolas PRIMAS
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

M. Riad ELIAS
Mme Valérie MAHIOU-LEDDER
Mme Sok Siya BUN
Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Thierry ATHUYT

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE

M. Marc LAMBERT

DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE
ET GESTION DE LA PHARMAFAC

M. Philippe BESSON

AHU

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

Mme Manon ROCHE

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE

Mme Camille DESGROUAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Athanassios ILIADIS
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	Mme Suzanne MOUTERDE-MONJANEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Hot BUN M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD M. Stéphane HONORÉ Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACODYNAMIE	M. Philippe GARRIGUE
-----------------	----------------------

ATER

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlel BOUHLEL
-----------------	---

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Nathalie AUSIAS, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Gérard CARLES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Christine PENOT-RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Alain RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

Mise à jour le 1^{er} décembre 2015

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-Marc ROLAIN,

Merci de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse.

A Monsieur le Professeur Jean-Philippe LAVIGNE,

Merci de m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse.

Un grand Merci pour votre aide et votre disponibilité.

Veillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Madame le Professeur Hélène MARCHANDIN,

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur Albert SOTTO,

Merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer au jury de soutenance de ma thèse.

A Madame le Docteur Catherine DUNYACH-REMY,

Un grand merci Catherine pour ta gentillesse et ton dynamisme, pour m'avoir encadrée tout au long de ce travail. Merci pour ton aide, tes précieux conseils et tes nombreuses corrections.

Peut-être à bientôt sur les pistes enneigées de notre beau pays catalan.

A Madame le Docteur Alix PANTEL,

Merci pour tout ce que tu m'as enseignée, pour ta gentillesse et ta douceur.

A ma maman Hélène et à mon frère Louis, merci pour vos encouragements, votre amour et votre soutien sans faille.

A **Alexi**, un grand merci pour ton soutien et ton aide tout au long de la réalisation de cette thèse, sans toi je n'y serai pas arrivée.

A ma famille,

Mamie Arlette et Papi Albert

Ma marraine Dany

Mon oncle Michel, ma tante Coco, mes cousins Luc et Vincent

A la famille Gipulo, mon parrain Henri, ma tante Claire, mes cousins Sébastien et Marie

A ma tante Maryse et mes cousins Mathilde, Audrey et Gaétan

Pour tous ces bons moments passés ensemble. Merci d'être présents aujourd'hui.

A Christiane Lhéraud, merci d'avoir été présente au moment où nous en avons le plus besoin. Merci d'être venue me soutenir aujourd'hui.

A mes Amis,

A Marine et Pauline, mes amies de toujours, tellement de bon souvenirs avec vous et surtout tellement de fous rires ! J'en ai encore mal aux abdos ! J'ai beaucoup de chance de vous avoir.

A Marilou, une amie formidable, plus de 10 ans maintenant qu'on se connaît, nous en aurons passé des heures au téléphone ! Merci d'avoir été là quand il le fallait ! Et merci pour tes petits conseils concernant la gestion du stress !

A William, eh oui sans toi je ne serai pas là aujourd'hui ! Merci pour ton soutien et ta bonne humeur durant cette année de préparation au concours de l'internat ! C'est bientôt ton tour !

A Alice et Caro, une belle amitié qui a commencé en bactério à Marseille dans la joie, la bonne humeur et le stress !! Merci d'avoir été des supers co-internes, je suis ravie de vous avoir rencontrées et suis très heureuse que la soutenance de ma thèse soit l'occasion de nos retrouvailles.

A Béatrice, tu sais aussi tout le bien que je pense de toi ! Merci pour tous ces bons moments passés ensemble à Marseille! Merci de m'avoir conseillée et rassurée ces derniers mois. Et surtout merci d'avoir été une super partenaire sportive, grâce à toi je me suis dépassée au squash ;)!

A Amélie, quelle belle aventure corse nous avons partagée, j'ai adoré être ta co-interne, tellement adoré que j'ai fait 6 mois de plus avec toi en te suivant à Nîmes ! J'ai passé une super année à tes côtés, dont je garde de merveilleux souvenirs !

A tous mes co-internes pour tous ces bons moments passés avec vous durant cet internat
Julien et Thibault, pour toutes ses rigolades, merci pour votre bonne humeur et votre soutien !

Alexia, Laurine, Cécile, Marjorie, Marie, Jad, Marion, Estelle <3, Anne Sophie, Xavier, Maxime, Anaïs, Florence, Simon, Quentin, Jérémy...

A mes belles rencontres corses, Célia, Mélanie, Floriane, Mathieu, Remy, John, Marine...

A mes supers colocs nîmois, Danitza, Delphine, Didier et Marjorie ça a été un plaisir de vivre avec vous dans la maison du bonheur ! Quelle belle expérience !

A toute l'équipe du laboratoire de Microbiologie du CHU de Nîmes.

***« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation
aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être
considérées comme propres à leurs auteurs. »***

Table des matières

Liste des tableaux.....	3
Liste des figures.....	4
Table des abréviations.....	5
Introduction.....	6
Partie I: Revue de la littérature	8
1. Le diabète sucré.....	9
1.1 Définition	9
1.2 Classification.....	9
1.3 Critères diagnostiques du diabète sucré	10
1.4 Complications du diabète sucré.....	11
2. Le pied diabétique.....	13
2.1 Définition	13
2.2 Physiopathologie	14
2.3 Diagnostic d'infection d'une plaie du pied chez le patient diabétique	15
2.3.1 Classifications cliniques.....	15
2.3.2 Examens microbiologiques d'intérêt.....	17
2.3.3 Impact de l'amélioration de la qualité du prélèvement sur les résultats microbiologiques.....	19
2.4 Ecologie du pied diabétique	20
2.4.1 Ecologie des plaies du pied chez le patient diabétique	20
2.4.2 Biofilm et ulcères du pied chez le patient diabétique.....	23
2.4.3 Ecologie des bactéries multirésistantes	23
2.4.4 Cas particulier des ostéites du pied de diabétique.....	24
2.4.5 Interprétation des résultats	25
3. Difficultés de prise en charge des patients	26
3.1 Distinction colonisation /infection	26
3.1.1. Définitions.....	26
3.1.2 Données cliniques	26
3.1.3 Marqueurs microbiologiques et biologiques de distinction colonisation/infection	27
3.2 Limite de la bactériologie classique	29

4. Apport d'outils innovants dans le diagnostic des infections du pied chez le diabétique.....	30
4.1 Approches en spectrométrie de masse	30
4.2 Approches en biologie moléculaire.....	31
4.2.1 Techniques basées sur l'amplification de l'ARNr 16S	31
4.2.3 PCR multiplex	32
4.2.3.1 GenXpert®	33
4.2.3.2 Approches syndromiques	34

Partie II : Evaluation de l'Unyvero® ITI technology comme outil d'identification bactérienne et de détection des marqueurs de résistance aux antibiotiques associés à partir d'échantillons cliniques..... 48

1. Objectif de notre étude	49
2. Performance of Unyvero® ITI technology in the management of Diabetic foot infection	50

Conclusion	73
-------------------------	-----------

Bibliographie	75
----------------------------	-----------

Liste des tableaux

TABLEAU 1.	PREVALENCE DES COMPLICATIONS DU DIABETE DE TYPE 2 ET NOMBRE DE PERSONNES DIABETIQUES ATTEINTES PAR CES COMPLICATIONS EN FRANCE METROPOLITAINE D'APRES L'ETUDE ENTRED 2007 (N = 3894) (7)...	12
TABLEAU 2.	CLASSIFICATION DES PLAIES DE PIED CHEZ LE PATIENT DIABETIQUE : CLASSIFICATION UT (UNIVERSITY OF TEXAS) COMBINANT UN GRADE ET UN STADE (26, 27).	16
TABLEAU 3.	CLASSIFICATION DE L'INFECTION DES PLAIES DU PIED SELON LE CONSENSUS INTERNATIONAL SUR LE PIED DIABETIQUE (28).....	17
TABLEAU 4.	BACTERIES ISOLEES DANS LES PLAIES DE PIED CHEZ LE PATIENT DIABETIQUE DANS LES 38 CENTRES HOSPITALIERS FRANÇAIS PARTICIPANT A L'ETUDE OPIDIA (32).....	22
TABLEAU 5.	ECOLOGIE DES OSTEITES DES PLAIES DU PIED CHEZ LE DIABETIQUE (21).....	25
TABLEAU 6.	COMPARAISON DES POURCENTAGES DES DIFFERENTES BACTERIES RETROUVEES DANS LES ULCERES DE PIED CHEZ LE PATIENT DIABETIQUE : CULTURE CONVENTIONNELLE VERSUS SEQUENÇAGE D'ARNR 16S (90).	32
TABLEAU 7.	PRESENTATION DE DIFFERENTES ETUDES MENEES POUR EVALUER LES PERFORMANCES DU KIT (MRSA/SA STTI)	34
TABLEAU 8.	EXEMPLE DE SYSTEMES COMMERCIALISES	36
TABLEAU 9.	PANEL DE COCCI A GRAM POSITIF TESTE PAR L'UNYVERO® ITI TECHNOLOGY (CURETIS).....	43
TABLEAU 10.	PANEL DE BACILLE A GRAM NEGATIF TESTE PAR L'UNYVERO® ITI TECHNOLOGY(CURETIS).....	43
TABLEAU 11.	PANEL DES MARQUEURS DE RESISTANCE TESTE PAR L'UNYVERO® ITI TECHNOLOGY (CURETIS).....	44
TABLEAU 12.	DISTRIBUTION DES MARQUEURS GENETIQUES PAR CHAMBRE DE PCR DANS LA CARTOUCHE ITI (CURETIS).....	45

Liste des figures

FIGURE 1. DIFFERENTES CAUSES D'ULCERATION DU PIED DIABETIQUE (22)	15
FIGURE 2. SCHEMATISATION DES PRELEVEMENTS A PRATIQUER EN FONCTION DU TYPE DE PLAIE CHEZ UN SUJET DIABETIQUE (14).	18
FIGURE 3. ECOLOGIE DE L'ULCERE DU PIED CHEZ LE PATIENT DIABETIQUE (22).....	23
FIGURE 4. AUTOMATE GENXPERT® (CEPHEID).....	33
FIGURE 5. SYSTEME PROVE IT BONE AND JOINT® (MOBIDIAG).....	37
FIGURE 6. SYSTEME FILMARRAY® BONE AND JOINT (BIOMERIEUX)	38
FIGURE 7. PRESENTATION DE L'UNYVERO SYSTEM: L'UNYVERO L4 LYSATOR, L'UNYVERO C8 COCKPIT, L'UNYVERO A50 ANALYZER DE GAUCHE A DROITE (CURETIS)	39
FIGURE 8. PRESENTATION DE L'UNYVERO CARTRIDGE (CURETIS).....	42
FIGURE 9. MODE OPERATOIRE DU SYSTEME L'UNYVERO® ITI TECHNOLOGY	46

Table des abréviations

OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
UPD :	Ulcère du Pied chez le patient Diabétique
IPD :	Infection du Pied chez le patient Diabétique
ADA:	American Diabetes Association
ITI :	Implant and Tissue Infection
GAD:	Anti-Glutamate décarboxylase
IA:	Anti tyrosine phosphatase
HMJ:	Hyperglycémie Modérée à Jeun
ITG:	Intolérance au Glucose
UT:	University of Texas
IWGDF:	International Working Group on the Diabetic foot
IDSA:	Infectious Diseases Society of America
SARM:	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
UFC:	Unités formant colonie
ADN:	Acide DésoxyriboNucléique
BPA :	Activité Protéasique Bactérienne
EPA:	Activité Protéasique Humaine
CRP:	C-Reactive Protein
PCT:	Procalcitonine
TS :	Trypticase Soja
PSM :	Poste de Sécurité Microbiologique
MALDI-TOF:	Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization-Time Of Flat
PCR:	Polymerase Chain Reaction
ARNr:	Acide RiboNucléique ribosomal
DGGE:	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
MS :	Mass Spectrometry
SAMS :	<i>Staphylococcus aureus</i> Sensible à la Méticilline
LCR:	Liquide Céphalo-Rachidien

Introduction

Le diabète constitue un problème de santé publique majeur. C'est un problème à la fois médical et social qui représente la troisième cause de mortalité et de morbidité dans le monde. Au cours des dernières décennies, le nombre de cas de diabète à l'échelle mondiale a augmenté de façon constante. La prévalence mondiale du diabète a presque doublé depuis 1980, passant de 4,7% à 8,5 % chez la population adulte.

D'après le rapport d'Avril 2016 de l'OMS, on estime que 422 millions d'adultes vivaient avec le diabète en 2014, comparé à 108 millions en 1980.

Les complications au niveau des membres inférieurs figurent parmi les plus fréquentes et les plus redoutées chez les patients diabétiques. En effet les ulcères du pied de diabétique (UDP) sont la principale cause d'hospitalisation des patients diabétiques et représentent une des principales causes d'amputation. Les risques d'hospitalisation et d'amputation sont 56 et 155 fois plus élevés chez les diabétiques qui ont une plaie par rapport à ceux qui n'en ont pas (1).

Une prise en charge multidisciplinaire des lésions du pied chez le patient diabétique est indispensable. En effet, une bonne coordination entre les différents intervenants impliqués (diabétologues, infectiologues, microbiologistes, radiologues, chirurgiens vasculaires et orthopédistes, rééducateurs, podo-orthopédistes et infirmiers) est primordiale (2). L'utilisation de critères cliniques permettant de mettre en évidence la sévérité des infections des plaies du pied, l'optimisation des protocoles de prélèvement et la mise en place de nouvelles techniques rapides de biologie moléculaire détectant les microorganismes impliqués ainsi que leurs gènes de résistance (et de virulence) ont pour but d'établir un diagnostic précoce permettant la mise en place d'un traitement efficace.

L'UNYVERO[®] ITI technology (Curetis) est un système totalement automatisé et intégré permettant l'identification bactérienne et la détection des principaux marqueurs de résistance en moins de 5 heures directement à partir de l'échantillon biologique. Ce système innovant a été testé au CHU de Nîmes dans le cadre du diagnostic d'infections du pied chez le patient diabétique (IPD) en particulier dans le diagnostic des ostéites.

L'objectif de ce travail était d'évaluer la faisabilité, les performances de cet outil innovant ainsi que la concordance des résultats obtenus par cette technique de biologie moléculaire et les cultures bactériennes classiques, dans le diagnostic des IPD.

Après quelques rappels sur le diabète et ses complications, les différentes techniques développées afin de faciliter le diagnostic des infections au niveau des UDP seront détaillées. La deuxième partie de ce travail présentera les résultats obtenus par le système Unyvero[®] ITI

technology en comparaison aux résultats des cultures bactériennes classiques dans le diagnostic des IPD.

Partie I: Revue de la littérature

1. Le diabète sucré

1.1 Définition

Le diabète sucré est défini comme un groupe d'affections métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique liée soit à une déficience de la sécrétion d'insuline soit à une insulino-résistance ou à ces deux anomalies associées (3). L'insuline est une hormone sécrétée par le pancréas indispensable à la pénétration du glucose sanguin dans les cellules. L'hyperglycémie chronique conduit avec le temps à des atteintes graves de nombreux systèmes organiques et plus particulièrement des nerfs et des vaisseaux sanguins (4).

Les critères diagnostiques du diabète ont été modifiés à plusieurs reprises par les groupes d'expert. La dernière révision a été présentée par un groupe international d'experts à l'initiative de l'« *American Diabetes Association* » (ADA) en 1997, celle-ci a été reprise en 1999 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). A l'heure actuelle, un consensus international permet de définir uniformément les anomalies de la tolérance glucidique.

1.2 Classification

Les différentes classes étiologiques de diabètes sucrés proposés par l'ADA et l'OMS comprennent le diabète de type 1, le diabète de type 2, le diabète gestationnel et les autres types de diabètes sucrés (4).

Le diabète de type 1 touche environ 6% des cas de diabète traités. Il est caractérisé par une destruction des îlots bêta de Langerhans du pancréas aboutissant à une carence absolue en insuline. Il est divisé en deux sous types :

(i) Le diabète de type 1 auto-immun : il apparaît généralement de manière brutale chez l'enfant ou le jeune adulte. La destruction des cellules β par un processus auto-immun est authentifiée par la présence d'anticorps anti-cellules d'îlots, anti-insuline, anti-glutamate décarboxylase (GAD), anti-tyrosine phosphatase IA-2 et IA-2b. Cette destruction des cellules bêta peut être rapide (enfants et adolescents) ou plus lente (adultes). D'autres affections auto-immunes peuvent être associées.

(ii) le diabète de type 1 idiopathique : c'est une forme à forte composante héréditaire. Il concerne une minorité de personnes ; il est plus fréquent chez les sujets d'origine africaine ou asiatique.

Le diabète de type 2 représente 90% des diabètes rencontrés dans le monde. Sa symptomatologie est souvent moins bruyante que dans le diabète de type 1. Il est en grande partie le résultat d'une surcharge pondérale et de la sédentarité et se caractérise par la

découverte fortuite d'une hyperglycémie chez l'adulte en surpoids. Il se présente sous forme d'une insulino-résistance hépatique et périphérique, associée à une insulino-pénie relative et progressive. La persistance d'une insulino-sécrétion endogène a conduit à l'appeler diabète «non insulino-dépendant » car l'insulino-thérapie n'est pas indispensable à la survie du patient, du moins au début de la maladie.

Le **diabète gestationnel** correspond aux troubles de la tolérance glucidique, de sévérité variable, débutant ou diagnostiqué pendant la grossesse quel que soit le traitement et l'évolution dans le post-partum.

D'autres formes de diabètes existent et sont souvent liées soit à des défauts génétiques de la fonction de la cellule bêta, soit à des défauts génétiques de l'action de l'insuline.

1.3 Critères diagnostiques du diabète sucré

Une glycorégulation normale se définit par :

1. une glycémie à jeun < 1,10 g/l
- et**
2. une glycémie 2 h après une charge de 75 g de glucose lors d'une hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) < 1,40 g/l

Selon les critères proposés en 2006 par l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le diagnostic de diabète est retenu devant :

3. des symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement inexpliqué, somnolence voire coma) et une glycémie $\geq 2,00$ g/L (11,1 mmol/L) à n'importe quel moment de la journée
- ou**
4. une glycémie à jeun $\geq 1,26$ g/L (7,00 mmol/L) vérifiée à deux reprises
- ou**
5. une glycémie 2 h après une charge en glucose (HGPO 75 g) $\geq 2,00$ g/L (11,1 mmol/L)

En cas de discordance des deux mesures préconisées pour le diagnostic positif de diabète, une surveillance est généralement conseillée avec contrôles glycémiques périodiques, *a fortiori* en présence de facteurs favorisants (histoire familiale de diabète, âge, obésité, maladies associées).

Ces critères diagnostiques permettent non seulement de définir le diabète sucré mais aussi le prédiabète ou intolérance au glucose. L'hyperglycémie est modérée, n'atteignant pas le seuil diagnostique de diabète, elle est cependant associée à une augmentation du risque de progression vers le diabète de type 2. Il est défini par :

6. une hyperglycémie modérée à jeun (HMJ) entre 1,10 g/l (6,1mmol/l) et 1,25g/l (6,9 mmol/l) après un jeûne de 8 heures et vérifiée à deux reprises.
et /ou
7. une intolérance au glucose (ITG) : glycémie comprise entre 1,4g/l (7,8mmol/l) et 1,99 g/l (11,0mmol/l) 2 heures après une charge orale de 75g de glucose.

Les sujets présentant une ITG ou une HMJ sont considérés comme ayant une augmentation du risque de progression vers le diabète. Ces deux catégories de patients ont une glycorégulation qualifiée de « glycorégulation anormale » (5).

Différents biomarqueurs sont utilisés pour définir le diabète incluant la glycémie à jeun, le test de tolérance au glucose et plus récemment, l'HbA1c (3)(6).

1.4 Complications du diabète sucré

Les complications du diabète de type 2 touchent environ 70% des patients et sont la conséquence directe de l'hyperglycémie chronique. Les complications chroniques du diabète sont nombreuses, elles sont classiquement divisées en deux catégories : les complications microangiopathiques et les complications macroangiopathiques (Figure1)(7). L'hyperglycémie chronique est responsable de perturbations précoces de la circulation avec sur le plan fonctionnel : une augmentation du débit, de la pression et de la perméabilité capillaire, une perte de l'autorégulation hémodynamique avec vasoplégie artériolaire d'amont, une tendance thrombogène avec notamment une augmentation du facteur de Willebrand synthétisé par les cellules endothéliales et une augmentation de la viscosité sanguine. Par conséquent, le risque d'obstruction de micro-vaisseaux (localisés au niveau de l'œil, du rein...) et de macro-vaisseaux sanguins (localisés au niveau du cœur, du cerveau, des membres inférieurs...) est augmenté.

Complications	Prévalence 2007	Intervalle de confiance à 95%	Effectif estimé sur 2,2 millions*
Cardiovasculaires			
Angor ou infarctus du myocarde**	16,7	[15,5 - 18,0]	367 000
Revascularisation coronaire**	13,9	[12,8 - 15,0]	306 000
Insuffisance cardiaque***	6,3	[5,2 - 7,4]	139 000
Accident vasculaire cérébral***	5,0	[4,0 - 5,9]	110 000
Ophthalmologiques			
Perte de la vue d'un œil**	3,9	[3,3 - 4,6]	86 000
Traitement ophtalmologique par laser**	16,6	[15,4 - 17,9]	365 000
Podologiques			
Mal perforant plantaire**	9,9	[8,9 - 10,9]	218 000
Amputation**	1,5	[1,1 - 1,8]	33 000
Rénales			
Dialyse ou greffe**	0,3	[0,1 - 0,4]	9 000

* Sur la base de 2,4 millions de personnes diabétiques traitées en métropole (1), il a été estimé que 91,9%, soit 2,2 millions avaient un diabète de type 2 selon les données d'Entred 2007.
** Données pondérées issues de l'auto-questionnaire postal.
*** Données pondérées issues du questionnaire médecin-soignant.

Tableau 1. Prévalence des complications du diabète de type 2 et nombre de personnes diabétiques atteintes par ces complications en France métropolitaine d'après l'étude Entred 2007 (n = 3894) (7)

La microangiopathie regroupe l'ensemble des complications responsables de l'atteinte des petits vaisseaux (capillaires artérioles). Elles comprennent :

- la rétinopathie diabétique : Elle se caractérise par une atteinte privilégiée des vaisseaux capillaires rétiens, par épaissement de la membrane basale entraînant une fragilisation et une dilatation capillaire avec augmentation du débit sanguin. Des micro-anévrysmes et micro-occlusions vont ainsi apparaître et entraîner une hypoxie. La rétinopathie se développe de façon lente et insidieuse sans symptôme apparent. Elle est la première cause de cécité dans les pays développés.
- la néphropathie diabétique : Elle est due à l'atteinte des petits vaisseaux des glomérules du rein. L'hyperglycémie provoque des anomalies hémodynamiques telles qu'une élévation du flux sanguin rénal et de la pression intra-glomérulaire aboutissant à des anomalies structurales caractéristiques comme l'hypertrophie glomérulaire, et l'épaississement de la membrane basale. Elle se manifeste par divers troubles allant d'une majoration de la micro albuminurie à l'insuffisance rénale terminale. La néphropathie diabétique est très souvent associée à une rétinopathie diabétique.
- la neuropathie diabétique : Elle correspond à l'atteinte du système nerveux périphérique et du système nerveux végétatif. L'hyperglycémie chronique entraîne un œdème neuronal et une dégénérescence axonale avec démyélinisation secondaire. La

gravité de cette complication est surtout liée aux conséquences cliniques qu'elle entraîne (troubles trophiques, douleurs neuropathiques, atteintes dysautonomiques sévères). La forme la plus fréquente est la polyneuropathie diabétique, elle doit systématiquement être recherchée car elle joue un rôle majeur dans l'apparition des lésions des pieds. En perturbant considérablement la sensibilité à la douleur, elle peut rendre indolore une blessure au pied.

La macroangiopathie est à l'origine des complications les plus graves du diabète, elle est définie comme l'atteinte des artères de moyen et gros calibre. La formation d'athérome au niveau des artères entraîne des lésions dont les localisations sont multiples touchant essentiellement les artères cérébrales, les artères périphériques et les coronaires. Elles peuvent conduire à une insuffisance cardiaque, une insuffisance coronaire susceptible d'entraîner un infarctus du myocarde, des accidents vasculaires cérébraux et une artériopathie oblitérante des membres inférieurs (3).

Les principaux facteurs de risques associés sont l'âge, le sexe, l'obésité, le tabagisme, l'hyperglycémie, l'hypertension artérielle, la dyslipidémie ou encore la présence d'un syndrome inflammatoire sous-jacent.

2. Le pied diabétique

2.1 Définition

La notion de « pied diabétique » regroupe l'ensemble des affections atteignant le pied, situées sous les malléoles, directement liées aux conséquences du diabète. Trois complications du diabète sont principalement mises en cause dans la formation du « pied diabétique » : la neuropathie, l'artériopathie et l'ischémie (8)(9)(10). Elles constituent la triade pathogénique du « pied diabétique » et favorisent le retard de cicatrisation de l'ulcère du pied et secondairement la progression de la plaie vers l'infection. Les ulcérations du pied sont fréquentes chez les patients diabétiques avec une prévalence qui s'élève à 25% (1)(11). Secondairement ces plaies s'infectent dans 40 à 80 % des cas (12).

L'infection du « pied diabétique » est définie par une invasion tissulaire avec multiplication de micro-organismes entraînant des dégâts tissulaires avec ou sans réponse inflammatoire de l'organisme. Elle fait suite à une plaie cutanée locale le plus souvent négligée. Elle peut être plus ou moins grave en fonction des structures anatomiques qu'elle touche (parties molles, os, articulations) (13).

Les infections superficielles concernent les couches tissulaires situées au dessus de l'aponévrose superficielle et se manifestent par des tableaux de dermohypodermite bactérienne aigue. Les infections profondes touchent l'aponévrose superficielle (fasciite nécrosante), les tissus mous (abcès) ou les structures ostéo-articulaires (ostéites)(14).

2.2 Physiopathologie

Les patients diabétiques sont plus exposés que la population générale aux infections et en particulier à celles localisées au niveau du pied. Plusieurs mécanismes rentrent en jeu. (Figure 2)

Le principal mécanisme contribuant à favoriser l'IPD est la neuropathie (8)(9)(10). Latente et insidieuse elle doit être recherchée systématiquement. La neuropathie est une complication précoce et fréquente du diabète, avec ses atteintes sensitives, motrices et végétatives. L'atteinte sensitive entraîne une insensibilité du pied et une diminution des signes de l'inflammation, retardant considérablement le diagnostic et la prise en charge de la plaie. La disparition du signal douloureux protecteur rend le pied vulnérable aux microtraumatismes répétitifs dans les zones d'appui. L'atteinte motrice est responsable d'une atrophie des muscles du pied engendrant des déformations. Les conséquences de l'atteinte végétative sont une diminution de la sudation avec une sécheresse du pied exagérée favorisant l'apparition de fissures et crevasse (14).

L'artériopathie est le second mécanisme contribuant à l'IPD. L'atteinte artérielle diminuant l'afflux de sang au site de la plaie va provoquer une hypoxie tissulaire. La mort cellulaire et la nécrose tissulaire liées à l'hypoxie créent des conditions optimales à la prolifération microbienne (15)(16)(17).

La fréquence des infections s'explique également par un déficit des mécanismes cellulaires de défense majoré par l'hyperglycémie telle que l'altération des polynucléaires neutrophiles (phagocytose, adhérence, bactéricidie, chimiotactisme) (18)(19)(20).

Enfin l'anatomie particulière du pied cloisonné en plusieurs loges favorisent la dissémination bactérienne (21)(22)(23)(Figure 2).

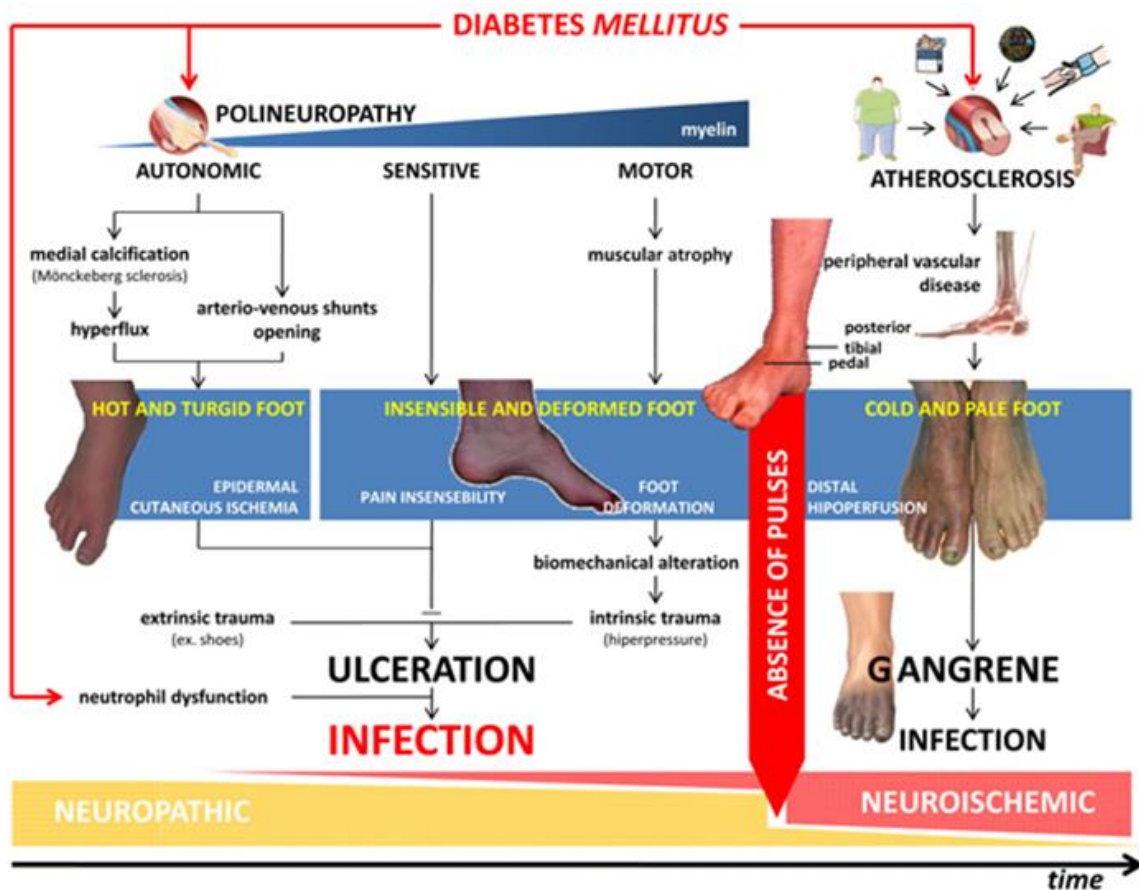


Figure 1. Différentes causes d'ulcération du pied diabétique (22)

2.3 Diagnostic d'infection d'une plaie du pied chez le patient diabétique

2.3.1 Classifications cliniques

Le diagnostic d'une IPD est tout d'abord un diagnostic clinique. En effet la plaie d'un pied de diabétique est constamment colonisée par des bactéries appartenant au microbiote cutané. La présence de bactéries sur une plaie n'est en aucun cas synonyme d'infection.

Le diagnostic d'infection repose sur l'observation clinique et en particulier sur la présence d'au moins deux signes parmi les suivants (24) :

- augmentation de volume
- induration
- érythème périlésionnel
- sensibilité locale ou douleur
- chaleur locale ou présence de pus.

Plusieurs classifications cliniques ont été proposées afin d'aider le clinicien à juger de la sévérité de l'infection (25).

De nombreuses classifications des plaies ont été proposées.

La classification de l'Université du Texas (Classification UT), est utilisée comme classification de référence des plaies (26)(27).

Elle comprend quatre grades en fonction de la profondeur et quatre stades selon la présence ou non d'une infection et/ou d'une artériopathie (Tableau 2). Cependant dans cette classification, l'infection n'est caractérisée que par sa présence (ou son absence) et par la profondeur de son atteinte.

	Grade 0 lésion épithérialiste (%)	Grade 1 plaie superficielle (%)	Grade 2 Atteinte du tendon ou de la capsule (%)	Grade 3 Atteinte de l'os ou de l'articulation (%)
Stade A Pas d'infection Pas d'ischémie	0A (0)	1A (0)	2A (0)	3A (0)
Stade B Infection Pas d'ischémie	0B (12,5)	1B (8,5)	2B (28,6)	3B (92)
Stade C Pas d'infection Ischémie	0C (25)	1C (20)	2C (25)	3C (100)
Stade D Infection et ischémie	0D (50)	1D (50)	2D (100)	3D (100)

Tableau 2. Classification des plaies de pied chez le patient diabétique : classification UT (University of Texas) combinant un grade et un stade (26, 27).

Une classification complémentaire de l'infection de la plaie regroupant un certain nombre de critères cliniques a donc été proposée par le groupe de travail international sur le pied diabétique (International Working Group on the Diabetic foot-IWGDF) et l'IDSA (Infectious Diseases Society of America). Cette classification comporte 4 grades, du grade 1 (absence d'infection) au grade 4 (sepsis sévère). Cette classification a récemment été validée au cours d'une étude prospective (Tableau 3) (28).

Cependant les manifestations cliniques retenues dans cette classification peuvent être réduites chez un diabétique en raison de la neuropathie et de l'artériopathie sous jacente. D'autres paramètres sont donc nécessaires pour aider au diagnostic d'infection lorsque les signes cliniques classiques sont absents.

Classification clinique de l'infection (IDSA) et définitions	IWGDF grade [4,81] (IDSA classification) [16]
Non infecté: Absence de symptômes ou de signes généraux ou locaux d'infection	1 (Non infecté)
Infecté <ul style="list-style-type: none"> • Au moins 2 des constatations suivantes sont présentes: <ul style="list-style-type: none"> ○ Gonflement local ou induration ○ Erythème > 0.5 cm* autour de l'ulcère ○ Sensibilité locale ou douleur ○ Chaleur locale ○ Emission de pus • Les autres causes d'inflammation de la peau doivent être éliminées (traumatisme, goutte, neuro-ostéoarthropathie de Charcot en phase aiguë, fracture, thrombose, stase veineuse) • Infection touchant seulement la peau et/ou le tissu sous-cutané (sans atteinte des tissus plus profonds et sans signes généraux [voir ci-dessous]. En cas d'érythème, il doit s'étendre à moins de 2 cm* autour de la plaie • Pas de signes ou de symptômes généraux d'infection (voir ci-dessous) 	2 (Infection légère)
<ul style="list-style-type: none"> • Infection touchant les structures plus profondes que la peau et les tissus sous-cutanés (os, articulation, tendon) ou érythème s'étendant à plus de 2 cm* des bords de la plaie. • Pas de signes ou de symptômes généraux d'infection (voir ci-dessous) 	3 (Infection modérée)
<ul style="list-style-type: none"> • Toute infection du pied avec signes du syndrome systémique inflammatoire. Ce syndrome se manifeste par 2 ou plus des constatations suivantes : <ul style="list-style-type: none"> ○ Température > 38° ou < 36°C ○ Fréquence cardiaque > 90 battements/minute ○ Fréquence respiratoire > 20 cycles/min ou PaCO₂ < 32 mmHg ○ Leucocytose > 12 000 or < 4 000 GB/mm³ ou présence de 10% de formes immatures 	4 (Infection sévère)

*Dans n'importe quelle direction

Tableau 3. Classification de l'infection des plaies du pied selon le consensus international sur le pied diabétique (28).

2.3.2 Examens microbiologiques d'intérêt

Une prise en charge multidisciplinaire est indispensable chez ces patients. Les protocoles de prélèvements sont conçus conjointement par les cliniciens et les microbiologistes en fonction des recommandations nationales et internationales (29)(30)(31).

Le diagnostic des IPD se base sur des critères cliniques. En effet, les UPD sont le plus souvent colonisés superficiellement par la flore bactérienne. Les prélèvements microbiologiques ne sont pas faits en systématique. Ils ne sont pratiqués que si l'infection de la plaie est confirmée cliniquement (grade 2-4 du consensus international) et uniquement après débridement de la plaie afin d'éliminer les sources de contamination.

La figure 2 résume le choix des prélèvements à effectuer en fonction du type de prélèvements.

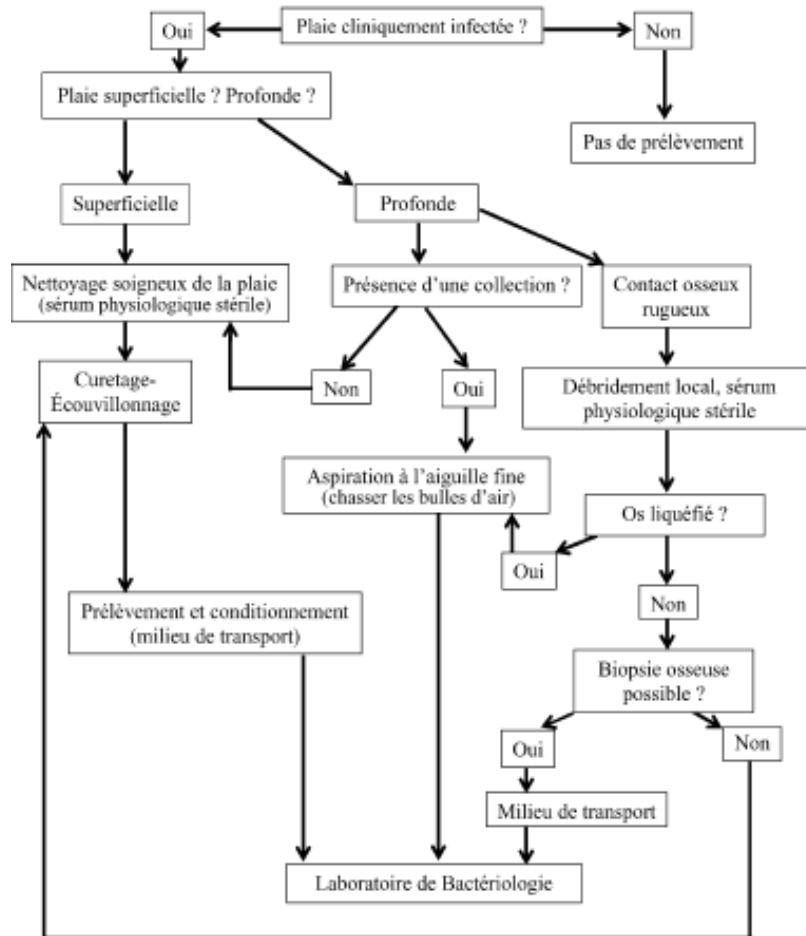


Figure 2. Schématisation des prélèvements à pratiquer en fonction du type de plaie chez un sujet diabétique (14).

Il n'existe aucun consensus concernant la meilleure technique à utiliser pour le prélèvement microbiologique (32)(33)(34).

-Les prélèvements superficiels (l'écouvillonnage superficiel de la plaie, le curetage écouvillonnage profond de l'ulcère) sont les méthodes les plus fréquemment utilisées mais elles sont aussi les moins fiables. En effet, ces prélèvements de surface recueillent un grand nombre de bactéries appartenant à la flore commensale colonisant superficiellement la plaie et ne sont donc pas adaptés à la mise en évidence de bactéries réellement pathogènes. (29)(35)(36). L'écouvillon doit être placé dans un milieu de transport. La recherche d'anaérobie stricte ne pourra pas être réalisée sur ce type de prélèvement. Il est fortement déconseillé d'effectuer un écouvillonnage sans faire un débridement de la plaie au préalable.

-Les prélèvements profonds (biopsie tissulaire, aspiration à l'aiguille fine) sont des méthodes à privilégier en cas d'infection des parties molles (29)(37)(38). Ces prélèvements permettent

de mettre en évidence les bactéries pathogènes. Il est conseillé pour la biopsie tissulaire de prélever deux à quatre fragments de tissu à partir de zones différentes.

Ces prélèvements doivent être réalisés sur une plaie débridée et avant toute antibiothérapie.

-La biopsie osseuse est la méthode de référence pour le diagnostic bactériologique d'ostéite (39). Elle est rapide simple sans effet secondaire mais doit être cependant réalisée dans des centres spécialisés. La réalisation de la biopsie osseuse est encore plus justifiée en cas d'échec thérapeutique. Une fenêtre thérapeutique de 15 jours minimum est nécessaire pour limiter le risque de faux négatifs.

Elle peut être effectuée soit par geste chirurgical, soit par ponction percutanée au lit du malade au moyen d'un trocart. Du fait de la neuropathie sensitive présente, la plupart du temps chez les patients diabétiques, elle est souvent pratiquée sans anesthésie préalable au travers d'une peau saine après une désinfection qui doit être la plus complète possible et un rinçage au sérum physiologique.

Après le prélèvement, il est convenu d'attendre les résultats microbiologiques pour mettre en place le traitement antibiotique le plus adapté possible.

-Les hémocultures aérobies et anaérobies peuvent être très utiles dans le cadre de sepsis (grade 4 de l'IWGDF) (40)(41). Des prélèvements répétés sont conseillés en cas d'évolution défavorable ou si l'état septique du patient est inquiétant.

Le transport des prélèvements constitue une étape clé. Les prélèvements doivent être acheminés dans les meilleurs délais au laboratoire de bactériologie dans des conditions optimales et l'utilisation de milieux de transport est fortement conseillée permettant d'augmenter la durée de vie des microorganismes et éviter la dessiccation du prélèvement (42)(43). Les prélèvements doivent être conservés à température ambiante jusqu'à l'ensemencement.

Des prélèvements de qualité et une diminution du temps de transport vont permettre l'amélioration de la qualité des résultats rendus au clinicien.

2.3.3 Impact de l'amélioration de la qualité du prélèvement sur les résultats microbiologiques

Depuis 2003, l'équipe pluridisciplinaire de l'hôpital de Nîmes a progressivement opéré un changement dans la prise en charge des plaies du pied chez les diabétiques en privilégiant la

réalisation de prélèvements profonds tels que la biopsie ou le curetage par rapport aux prélèvements superficiels par écouvillonnage simple. Le nombre de bactéries isolées par prélèvement a ainsi diminué de 4,1 à 1,9 de 2003 à 2007, le taux de bacilles à Gram négatif a diminué régulièrement durant cette période alors que le taux de cocci à Gram positif a augmenté. Il a été observé durant cette période une diminution significative de la prévalence des bactéries multirésistantes (taux de SARM divisé par 3) et une diminution du nombre de bactéries de la flore commensale ou à faible potentiel de virulence isolé (taux divisé par 2 passant de 40,1% à 16,1 % de 2003 à 2007) (44).

2.4 Ecologie du pied diabétique

2.4.1 Ecologie des plaies du pied chez le patient diabétique

Les données microbiologiques montrent que les IPD sont le plus souvent polymicrobiennes (33)(45)(46)(47). L'étude OPIDIA a été menée en France en 2010 et nous révèle la façon dont ces plaies sont prises en charge dans les services spécialisés à l'hôpital. Cette étude a été menée dans 38 centres hospitaliers et 291 patients ont été inclus dans l'étude (32). Des prélèvements microbiologiques ont été réalisés chez 86 % des patients (Tableau 3). Les cocci à Gram positif ont été de loin les bactéries les plus fréquemment isolées. Parmi ces bactéries *Staphylococcus aureus* a été isolé chez 112 patients, ce qui représente 32% de l'ensemble des micro-organismes tout micro-organisme confondu et représente 54% des bactéries à Gram positif isolées. C'est la bactérie la plus souvent isolée dans les IDP. Les *streptocoques β-hémolytiques* sont les bactéries les plus fréquemment isolées après le *S. aureus* représentant 14% de l'ensemble des souches isolées, le plus souvent dans le cadre d'infections polymicrobiennes. Les entérocoques sont isolés dans 8% des cas, son rôle pathogène reste cependant à discuter (48).

Les bacilles à Gram négatif sont moins fréquemment isolés dans les IPD. Généralement, le rapport cocci Gram à positif / bacille à Gram négatif est de 3 pour 1 (39).

D'après les résultats obtenus grâce à l'étude OPIDIA, les entérobactéries (*Proteus spp*, *Enterobacter spp*, *Escherichia coli*), et le bacille à Gram négatif non fermentaire *Pseudomonas aeruginosa* représentent respectivement 27% et 7% des souches isolées. Tout comme l'entérocoque le rôle pathogène de *P. aeruginosa* reste encore à discuter.

Les bactéries anaérobies n'ont été isolées que dans 2% des cas. Elles sont souvent associées à des bactéries aéro-anaérobie mais leur isolement est difficile. En effet les bactéries anaérobies sont des bactéries qui nécessitent un transport et des milieux de cultures appropriés. La

prévalence des anaérobies va dépendre de la méthode d'échantillonnage, du type de transport et des méthodes de culture réalisées au laboratoire (49). *Fingoldia magna* et *Bacteroides fragilis* sont les bactéries anaérobies les plus fréquemment isolées, ce sont aussi les plus pathogènes (50)(51). Les bactéries anaérobies strictes à Gram positif sont généralement retrouvées dans les plaies profondes alors que les bactéries anaérobies strictes à Gram négatif sont associées à une nécrose ischémique ou à une atteinte profonde (49).

Les bactéries du microbiote cutané sont également isolées dans IPD. Les corynébactéries et les staphylocoques à coagulase négative sont les plus fréquemment retrouvés. Ce sont des bactéries à faible pouvoir pathogène et le plus souvent considérées comme des contaminants. Leur isolement est très dépendant de la qualité des prélèvements (29)(52)(53).

Différentes études montrent à travers leurs données microbiologiques que l'écologie du pied du diabétique est semblable en Amérique du nord, en Europe et en Afrique du nord (53)(54)(55).

Des études menées récemment dans les pays en voie de développement comme l'Inde ou le Moyen Orient, montrent que *S. aureus* est moins prévalent (56). En revanche les infections à entérobactéries et à *P. aeruginosa* sont plus fréquentes (46)(57). *Pseudomonas aeruginosa* est la bactérie la plus isolée dans les pays en voie de développement notamment en Asie du sud est. En Inde, le nombre de *P. aeruginosa* multirésistants isolés est préoccupant, il représente 44% des isolats (57). Les raisons de cette disparité entre pays pourraient être liées au climat chaud provoquant une transpiration des pieds, au port de chaussures de mauvaise qualité, à la mauvaise hygiène et à la forte automédication par les antibiotiques (58).

Microorganisms	n ^a (%)	MDROs ^b
Gram-positive aerobic cocci	210 (59.8)	29
<i>Staphylococcus aureus</i>	114 (32.5)	28
<i>Streptococcus</i> spp.	48 (13.7)	–
<i>Enterococcus</i> spp.	28 (8.0)	1
Coagulase-negative staphylococci	16 (4.6)	–
Other gram-positive aerobic cocci	4 (1.1)	–
Gram-negative aerobic bacilli	126 (35.9)	12
Enterobacteriaceae spp.	95 (27.1)	6
<i>Escherichia coli</i>	17 (4.8)	1
<i>Proteus</i> spp.	30 (8.5)	1
<i>Enterobacter</i> spp.	17 (4.8)	2
<i>Klebsiella</i> spp.	4 (1.1)	–
<i>Morganella morganii</i>	15 (4.3)	1
<i>Citrobacter</i> spp.	4 (1.1)	1
<i>Hafnia alvei</i>	1 (0.3)	–
<i>Serratia marcescens</i>	5 (1.4)	–
Other Enterobacteriaceae	2 (0.6)	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23 (6.6)	6
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3 (0.9%)	–
Other gram-negative aerobic bacilli	5 (1.4)	–
Anaerobes	7 (2.0)	–
Gram-positive aerobic bacilli	8 (2.3)	–
<i>Corynebacterium</i> spp.	8 (2.3)	–
Total	351	41

^a Isolated bacteria out of all isolates ($n = 351$).

^b Multidrug-resistant organisms, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, glycopeptide-resistant enterococci, Enterobacteriaceae resistant to third-generation cephalosporins (extended-spectrum β -lactamases and derepressed cephalosporinase), ceftazidime-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* resistant to at least two of the following antibiotics: ticarcillin, ciprofloxacin, ceftazidime and imipenem

Tableau 4. Bactéries isolées dans les plaies de pied chez le patient diabétique dans les 38 centres hospitaliers français participant à l'étude OPIDIA (32)

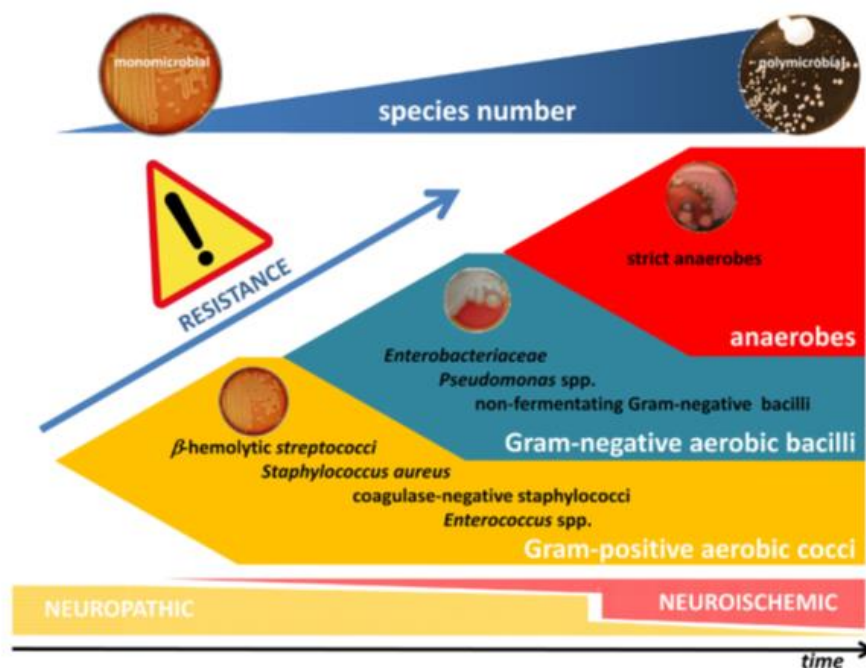


Figure 3. Ecologie de l'ulcère du pied chez le patient diabétique (22).

2.4.2 Biofilm et ulcères du pied chez le patient diabétique

Un élément important dans l'écologie de ces plaies chroniques est la présence de biofilm. Il a été rapporté que 60 % des plaies chroniques (dont 77% d'UPD) présentent des biofilms (59). Le biofilm est une communauté sessile (polymicrobienne) caractérisée par des bactéries qui s'attachent irréversiblement à une surface ou une interface. Ces bactéries sont entourées par une matrice d'EPS (extracellular polymeric substances) qu'elles produisent (60). Les bactéries présentes dans les biofilms manifestent une plus grande résistance aux antibiotiques et aux divers mécanismes immunitaires de l'hôte. Les bactéries sessiles ont également une plus grande virulence que les bactéries planctoniques qui sont principalement identifiées par des techniques standard comme la culture.

2.4.3 Ecologie des bactéries multirésistantes

La probabilité d'isoler une bactérie multirésistante (BMR) nécessitant des mesures d'hygiène adaptées a augmenté au cours des dernières années (61). Les souches de *S. aureus* isolées dans les plaies de pied chez le patient diabétique et résistantes à la méticilline constituent un problème de première importance (62)(63)(64). Cependant, depuis quelques années nous observons une diminution de l'isolement de SARM (*S. aureus* résistant à la méticilline).

D'après l'étude OPIDIA et une étude réalisée au laboratoire de Nîmes en 2008, les SARM représentaient respectivement 25% et 20% des *S. aureus*, des prévalences relativement faibles en comparaison avec d'autres études menées auparavant (32)(65). Cela pourrait être dû à la diminution de la prévalence globale du SARM en France, comme en témoigne l'Observatoire national français de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antimicrobiens et le Système européen de surveillance de la résistance aux antimicrobiens. Cependant d'après Richard *et al.*, la présence de SARM n'est pas un facteur influençant le temps de cicatrisation des plaies sous réserve qu'une antibiothérapie précoce et adaptée soit mise en place (65)(66)

Bien qu'en nette diminution depuis quelques années le SARM constitue encore un véritable problème de santé publique.

D'autres cocci à Gram positif sont à surveiller tels que les entérocoques résistants à la vancomycine (VRE) et les *S. aureus* de sensibilité diminuée aux glycopeptides (67).

Les infections impliquant des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération (Béta lactamase à spectre étendu ou céphalosporinase déréprimée) ou productrices de carbapénémases sont également en pleine expansion et constituent un problème émergent préoccupant (68).

Pseudomonas aeruginosa, et d'autres bactéries de l'environnement naturellement multirésistantes telles que *Acinetobacter baumannii* et le *Stenotrophomonas maltophilia* peuvent être isolées dans les plaies de pied chez le patient diabétique.

En outre, 26 % des *P. aeruginosa* isolés dans le cadre de l'étude OPIDIA étaient multirésistants.

2.4.4 Cas particulier des ostéites du pied de diabétique

L'ostéite du pied chez le patient diabétique survient de façon caractéristique par contiguïté, à partir d'une plaie ouverte et infectée du pied. L'origine hématogène d'une ostéite au niveau du pied chez le patient diabétique est exceptionnelle (29)(39). C'est pourquoi l'écologie des ostéites de pied chez le patient diabétique reflète celles des infections de la peau et des tissus mous, les bactéries isolées sont issues le plus souvent du microbiote des plaies situé en regard de la zone osseuse atteinte (69).

Les ostéites sont fréquemment polymicrobiennes, cependant le nombre de bactéries isolées est plus faible dans les prélèvements osseux par rapport aux prélèvements de la peau et des tissus mous (39). L'agent causal le plus fréquemment impliqué dans les ostéites reste le *S. aureus* seul ou comme bactérie prédominante dans les infections polymicrobiennes (11)(39). Bactérie

couramment isolée dans les ostéites, *S. epidermidis* présente même si elle est faible, une pathogénicité. Cependant, celle-ci ne peut être évoquée que quand les prélèvements sont de bonne qualité. Parmi les bacilles à Gram négatif, les entérobactéries *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus spp* sont les plus couramment isolées suivies par *P. aeruginosa* (69)(70)(71).

Si les entérobactéries se rencontrent généralement dans les infections chroniques ou déjà traitées, *P. aeruginosa* est plus souvent isolé après des hospitalisations de longues durées, en cas d'application de pansements humides ou de bains de pied.

Enfin les bactéries anaérobies sont le plus souvent associées à des bactéries aérobies (Tableau 4).

Des bactéries habituellement considérées comme commensales, notamment les staphylocoques à coagulase négative et les corynébactéries ont été incriminées dans l'infection osseuse de pied chez le patient diabétique (72)(73)(74).

Cocci à Gram +									
<i>S. aureus</i>	40 %	31 %	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 sp.</i>	30 %	8 %	28 %	8 %	1 %	-	18 %	12 %	-
Autre	10 %	-	-	2 %	-	-	-	4 %	2 %
Bacilles à Gram -									
Entérobactéries	55 %	20 %	14 %	18 %	29 %	36 %	11 %	18 %	32 %
<i>Pseudomonas sp.</i>	5 %	15 %	11 %	2 %	9 %	10 %	43 %	2 %	19 %
<i>Acinetobacter sp.</i>	-	-	-	-	-	3 %	-	-	13 %
Anaérobies	60 %	4 %	15 %	5 %	-	-	-	4 %	-
Polymicrobien	70 %	ND	83 %	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tableau 5. Ecologie des ostéites des plaies du pied chez le diabétique (21)

2.4.5 Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats doit tenir compte de plusieurs facteurs: conditions de recueil, échantillons, délai, conditions de transport du prélèvement, et type de bactéries isolées pour déterminer avec le plus de probabilité si ces bactéries sont responsables de l'infection.

Les bactéries comme les staphylocoques à coagulase négative, les corynébactéries, les entérocoques et *P. aeruginosa* sont considérées comme des bactéries commensales ou peu virulentes (29)(48). Ils peuvent cependant se révéler comme des bactéries opportunistes (52). Il est conseillé de ne pas en tenir compte lors du traitement de première intention.

Il n'existe à ce jour aucun moyen microbiologique permettant de faire la distinction entre pathogène et non pathogène. En cas de doutes, les prélèvements doivent être répétés et ces bactéries seront prises en considération si elles sont isolées à plusieurs reprises ou si l'état septique du patient devient inquiétant.

3. Difficultés de prise en charge des patients

3.1 Distinction colonisation /infection

3.1.1. Définitions

Plusieurs stades ont été définis afin de caractériser l'évolution d'une plaie chronique (15).

La Contamination : initialement une plaie peut être contaminée par des microorganismes, mais l'espèce ne persistera pas si les conditions nutritives et physiques ne lui sont pas favorables ou si elle est détruite par les défenses de l'hôte. Sa présence n'est que transitoire et elle ne perturbera pas la cicatrisation de la plaie.

La colonisation : processus physiologique développé sur toute la peau. Elle est liée à des espèces bactériennes provenant du microbiote cutané ou de l'environnement. Ce microbiote est composé de bactéries aérobies et anaérobies. La présence de ces bactéries sur le revêtement cutané ne provoque pas de dommage pour l'hôte.

L'infection : processus pathologique, défini par une invasion tissulaire avec une multiplication de micro-organismes entraînant des dégâts tissulaires avec ou sans réponse inflammatoire de l'organisme. Dans le cas du pied chez le patient diabétique cette infection est systématiquement secondaire à une plaie cutanée.

3.1.2 Données cliniques

Comme toutes plaies chroniques, l'UPD est colonisé par des micro-organismes du microbiote cutané. C'est pourquoi le diagnostic d'IPD ne peut pas être basé uniquement sur des examens microbiologiques mais doit aussi être confronté aux signes cliniques (30)(14). Comme il a été vu ci-dessus le Groupe de Travail International sur le Pied Diabétique (IWGDF) et la Société des Maladies Infectieuses d'Amérique (IDSA) ont développé des critères cliniques pour reconnaître et classifier la sévérité de l'IPD (29)(75). Néanmoins, les signes cliniques ou les symptômes d'IPD peuvent être atténués chez les patients diabétiques. Il est donc possible que des infections ne soient pas détectées lors de leur présentation initiale. Ceci ayant pour

conséquence une augmentation du délai dans la mise en route du traitement antibiotique pouvant conduire à l'extension de l'infection et même mettre en danger l'intégrité du membre. La progression de l'infection peut être rapide chez le patient diabétique car elle est associée à un terrain favorisant : ischémie locale, diminution des défenses de l'hôte et anatomie particulière du pied. A l'opposé la mise en route d'un traitement antibiotique chez tous les patients favoriserait l'émergence de bactéries multirésistantes, les surcoûts monétaires et pourrait entraîner des effets secondaires non négligeables (29). Il est donc fortement déconseillé d'utiliser des antibiotiques sur des ulcérations colonisées (14)(75)(76).

Plusieurs autres éléments peuvent aider au diagnostic d'infections quand les signes cliniques sont absents. L'identification d'un tissu granuleux friable, le retard de cicatrisation en dépit d'une prise en charge adéquate et l'apparition d'une hyperglycémie inexplicée doivent être pris en compte. Toutefois d'un point de vue pratique ces signes sont parfois difficilement visibles ou trop généraux pour être retenus systématiquement (36)(77)(78). Récemment Lipsky *et al.* ont développé un score des plaies du pied chez le diabétique à partir de 10 items incluant une gradation semi-quantitative de la taille de la plaie et des différents paramètres de l'infection. Ce score pourrait représenter un outil fiable et utile pour prédire le devenir clinique des plaies. Une validation de ce score doit être cependant réalisée (44)(79).

3.1.3 Marqueurs microbiologiques et biologiques de distinction colonisation/infection

La charge microbienne dans les plaies a longtemps été décrite comme un facteur déterminant pour prédire la cicatrisation ou au contraire l'évolution vers l'infection d'une plaie.

Les bactéries coloniseraient dans un premier temps le revêtement épidermique cutané puis en se multipliant envahiraient les tissus sous jacents. D'après les experts le seuil permettant la détection d'une colonisation clinique pour lequel l'hôte n'arriverait plus à empêcher la multiplication bactérienne serait supérieur ou égal à 10^5 unités formant colonies (UFC) par gramme ou mm^3 de tissu (15)(80). Cette « colonisation critique » pourrait entraîner un retard dans la cicatrisation de la plaie ou être un point de départ de l'extension de l'infection.

Cependant, l'utilisation de tels critères permettant de distinguer la colonisation de l'infection est totalement inadaptée. En effet, il est indispensable de tenir compte du potentiel de virulence de bactéries isolées dans les plaies, de l'immunocompétence de l'hôte et de l'action synergique des différentes espèces bactériennes présentes dans la plaie. Chaque espèce présente un potentiel de virulence qui lui est propre. D'après l'étude Sidestep, des patients présentent des plaies infectées par *P. aeruginosa* et *E. faecalis* ont été traités par ertapénème, une molécule inactive sur ces mêmes germes. Une évolution favorable des plaies chez ces

patients a été observée suggérant que *P. aeruginosa* et *E. faecalis* possèderaient un faible potentiel de virulence (48). Une autre étude menée par Down *et al*, a montré que la présence de streptocoques β -hémolytique à 10^2 UFC par gramme de tissus causait des dommages tissulaires importants alors des pathogènes commensaux comme *S. epidermidis* à 10^5 UFC par gramme de tissus n'avait aucune signification clinique (80).

De plus, la quantification bactérienne nécessiterait un prélèvement par biopsie tissulaire de chaque plaie, ce qui est irréalisable en pratique clinique compte tenu du coût que cela engendrerait, voire dangereux pour le patient (81).

Des marqueurs microbiologiques et biologiques ont donc été proposés afin de distinguer l'infection de la colonisation.

Des technologies comme les biopuces à ADN ont été utilisées afin de permettre l'évaluation du potentiel de virulence des bactéries, notamment de *S. aureus*. D'après les travaux de Sotto *et al*, effectués sur des souches de *S. aureus* isolées à partir de plaies infectées ou colonisées, une combinaison de 5 gènes de virulence (*sea*, *sei*, *luke*, *hglv* et *cap 8* permettrait de différencier des plaies de grade 1 (colonisation) de plaies de grade 2 à 4 (infection) avec une sensibilité de 98% et une spécificité de 87% (82)(83). Ces marqueurs ont cependant été développés dans le cadre de projets de recherche.

Récemment, des études ont montré l'intérêt d'évaluer l'activité protéasique humaine (EPA) dans la prise en charge des plaies chroniques. Une EPA élevée et durable serait un facteur clé dans le retard de cicatrisation. De plus la détection d'une activité protéasique bactérienne (BPA) dans les plaies chroniques serait indicative de la présence de bactéries pathogènes en l'absence de signes cliniques d'infection. La détection simultanée des activités protéasiques humaines et bactériennes lors de la prise en charge des plaies de pied chez le diabétique permettraient de distinguer une infection d'une colonisation et de prédire le devenir de cette plaie (84). Les tests Woundchek™ Bacterial Status et Woundchek™ Protease Status sont des tests chromatographiques *in vitro* innovant. Ils permettent respectivement l'évaluation qualitative de l'EPA ou de la BPA directement à partir d'un échantillon d'exsudat issu de la plaie, prélevé avec un écouvillon au lit du malade. Ce test a pour but d'aider le professionnel de santé à évaluer si la plaie est à risque de devenir non cicatrisante. Le résultat est visible en 15 minutes. L'évaluation simultanée de ces deux tests dans la prise en charge des lésions du pied chez les patients diabétiques est actuellement en cours au CHU de Nîmes.

Enfin, l'utilisation des marqueurs biologiques de l'inflammation pour différencier la colonisation de l'infection a été discutée. Les études menées n'ont pas permis de démontrer une corrélation entre l'augmentation de certains marqueurs biologiques de l'inflammation tels

que la C-reactive protein (CRP) et la procalcitonine (PCT), l'orosomucoïde, l'haptoglobine, ou l'albumine et l'infection des plaies chroniques. Cependant, l'utilisation couplée d'autres marqueurs comme la C-reactive protein (CRP) et la procalcitonine (PCT) s'est avérée intéressante. En effet, il a été démontré la bonne valeur prédictive du couple PCT-CRP pour différencier les infections des colonisations (85).

3.2 Limite de la bactériologie classique

Deux catégories de prélèvements sont à distinguer et sont traités suivant des protocoles différents. Les prélèvements du pied chez le patient diabétique effectués au lit du malade (écouvillonnages superficiels ou profonds de plaies, aspirations à l'aiguille fine, écoulements purulents, biopsies tissulaires, biopsies osseuses par ponction percutanée) et les prélèvements du pied chez les patients diabétiques réalisés au bloc opératoire généralement des biopsies osseuses. Tous les prélèvements tissulaires et osseux sont au préalable dilacérés stérilement au scalpel dans du bouillon TS sous PSM II.

Actuellement au laboratoire de microbiologie du CHU de Nîmes, le système Ultra turax® est testé sur les biopsies osseuses ou sur des prélèvements de tissus mous réalisés au bloc opératoire. Ce traitement permet d'assurer l'homogénéité de l'échantillon biologique grâce à un broyage mécanique des prélèvements à l'aide de billes en inox. Les homogénats obtenus sont ensuite ensemencés directement sur les milieux de culture.

Un examen microscopique (par coloration de Gram) est réalisé sur tous les prélèvements.

-Les prélèvements réalisés au bloc opératoire

Des milieux de cultures supplémentés au sang sont ensemencés à J0 et placés sous différentes atmosphères.

- une gélose au sang incubée en aérobiose : lecture à J1
- une gélose chocolat incubée sous CO₂ : lecture à J1
- une gélose au sang incubé en anaérobiose : lecture à J7

Les cultures seront gardées 14 jours. Une lecture quotidienne des boîtes sera effectuée. Le milieu anaérobie sera lu après 7 jours d'incubation, les bactéries anaérobies ayant une croissance lente et difficile.

De plus un milieu liquide de type bouillon Shaedler est systématiquement ensemencé pour les prélèvements de bloc opératoire, avec lecture régulière jusqu'à 14 jours.

-Les prélèvements réalisés au lit du malade

Outre l'ensemencement sur les mêmes milieux que ci-dessus, l'ensemencement d'un milieu sélectif pour les entérobactéries est effectué. Les boîtes sont gardées 7 jours.

Un milieu d'enrichissement de type bouillon Shaedler pour l'aspiration à l'aiguille fine et la biopsie osseuse augmente la sensibilité de l'examen.

Dans la plupart des cas l'identification des bactéries se fera à partir des cultures 18 à 24h plus tard à J1 par des méthodes classiquement utilisées au laboratoire comme la spectrométrie de masse (Vitek MS, biomérieux), ou par l'identification sur des critères biochimiques (Vitek 2, biomérieux). Le recours aux galeries API se fait de plus en plus rarement.

L'antibiogramme sera disponible à J2, il sera réalisé soit en milieu liquide soit en milieu solide.

L'une des principales limites de la bactériologie classique est le temps nécessaire pour obtenir des résultats définitifs, jusqu'à deux semaines pour les prélèvements osseux.

Le caractère polymicrobien de l'IPD, la formation de biofilms, l'internalisation des bactéries dans les cellules osseuses, les patients qui ont reçu une antibiothérapie avant la chirurgie sont autant de facteurs qui augmentent la difficulté du diagnostic basé sur la culture conventionnelle dans l'IPD.

4. Apport d'outils innovants dans le diagnostic des infections du pied chez le diabétique

4.1 Approches en spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse par Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation (MALDI)-Time Of Flat (TOF) est une technique d'analyse physico-chimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse moléculaire. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Les empreintes spectrales obtenues sont comparées à une banque de données de spectres obtenus à partir de souches de référence. Un score d'identification est déterminé et validé s'il est suffisant (86). Cette technique qui a révolutionné l'identification bactérienne, ne permet pas de répondre à la problématique « temps » inhérent au diagnostic des IPD. Même si pour certains échantillons il est possible de s'affranchir de la culture bactérienne et d'identifier directement les bactéries à partir de matériel biologique, ce n'est pas le cas à partir de prélèvements de tissu ou d'os. En revanche, d'autres approches allant plus loin que la simple identification et utilisant la spectrométrie de masse permettraient de

documenter les ostéites dans les IPD. Une étude menée par Valour *et al*, a permis de mettre en évidence par analyse spectrale qu'un déficit de production de delta toxine chez *S. aureus* pourrait être un marqueur diagnostique de chronicité de l'infection osseuse et articulaire (87).

4.2 Approches en biologie moléculaire

4.2.1 Techniques basées sur l'amplification de l'ARNr 16S

La PCR 16S est une technique basée sur l'amplification et le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S, un gène hautement conservé et présent dans le génome de tous les procaryotes. Ce gène contient des régions hypervariables qui peuvent être utilisées afin d'identifier des séquences bactériennes spécifiques. Cette technique est particulièrement intéressante lorsqu'elle est appliquée à des produits pathologiques normalement stériles. Cependant elle n'est pas adaptée aux infections polymicrobiennes. C'est un procédé qui reste extrêmement sensible et sujet à la contamination par de l'ADN étranger, le plus souvent par le biais de réactifs utilisés (88). D'autres approches basées sur l'amplification de l'ADNr16S telles que l'électrophorèse sur gradient de gel dénaturé (DGGE) ou le séquençage à haut débit ont été développées dans le diagnostic des IPD. La DGGE permet d'identifier différentes espèces bactériennes en séparant les différents amplicons d'ARNr 16S grâce à un agent dénaturant comme l'urée. Une fois la séparation des amplicons effectuée, l'identification des bactéries se fait grâce au séquençage des différentes bandes présentes sur le gel (89). Les résultats sont obtenus en 48 heures. D'après Dunyach-Remy *et al*, la DGGE a conduit à l'identification d'un nombre plus important de bactéries par rapport à la culture conventionnelle (2.35 vs 0.8 respectivement). Dans 60 % des cas (12 cas sur 20), il y a eu identification d'espèces pathogènes ou potentiellement pathogènes par la DGGE non isolées par la culture classique (89).

Le séquençage haut débit est une méthode performante et totalement automatisée, beaucoup plus rapide que la méthode Sanger mais qui ne permet de séquencer que des produits de taille limitée (entre 50 à 100 nucléotides maximum). Les travaux de Gardner *et al* ont montré que l'utilisation du séquençage à haut débit ciblant le gène codant pour l'ARNr 16 S a permis d'établir le profil des microbiomes d'UPD chez 52 individus. Comparativement, les méthodes traditionnelles comme la culture conventionnelle sous estiment la charge et la diversité microbienne et la présence de pathogènes potentiels (90).

Bacteria	Cultures	16S sequencing
<i>Staphylococcus</i>	40%	94%
Anaerobes	27%	100%
Proteobacteria	35%	100%
<i>Streptococcus</i>	37%	83%

Tableau 6. Comparaison des pourcentages des différentes bactéries retrouvées dans les ulcères de pied chez le patient diabétique : Culture conventionnelle versus séquençage d'ARNr 16S (90).

Cette technique a confirmé la présence d'une écologie bactérienne présente en profondeur plus diversifiée et plus complexe que le microbiote superficiel dans les plaies de pied de patients diabétiques. Cette diversité bactérienne est directement imputable au développement de biofilms dans les plaies (91). Néanmoins, ces techniques du fait d'un rendu des résultats trop tardifs et de la difficulté de les mettre en place en laboratoire ne permettent pas leur utilisation en tant que technique de routine.

Les méthodes de séquençage haut débit bien qu'étant précises imposent un temps technique considérable pour évaluer et comparer les séquences. Le coût de cette technologie est relativement élevé.

4.2.3 PCR multiplex

L'arrivée sur le marché de kits « prêts à l'emploi » de PCR multiplex spécifiques pourrait avoir un intérêt dans le diagnostic des IPD. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, le diagnostic microbiologique de ces infections repose sur la mise en culture d'écouvillons, de biopsies osseuses ou tissulaires. L'une des principales limites de cette technique est le temps nécessaire pour obtenir des résultats (jusqu'à deux semaines sont nécessaires pour obtenir des résultats définitifs). Ces nouvelles méthodes de diagnostic moléculaire ont été développées afin de pallier au manque de sensibilité de la culture, et permettre un diagnostic fiable en un minimum de temps. Cependant les performances de l'automate utilisé au laboratoire doivent être connues et/ou évaluées.

Actuellement les systèmes commercialisés sont totalement automatisés, l'extraction et la PCR sont intégrées. Les résultats sont obtenus en quelques heures ne nécessitant pas de compétences particulières en biologie moléculaire. Les tests « prêts à l'emploi », faciles d'utilisation envahissent le marché. Les avantages majeurs de ces tests sont la facilité

d'exécution et la rapidité de rendu du résultat permettant la mise en place d'une antibiothérapie ciblée précoce.

4.2.3.1 GenXpert®

La société Cepheid® (Sunnyvale, CA) a développé des kits de PCR en temps réel. L'automate est un système fermé, automatisé qui intègre la purification de l'échantillon, l'amplification de l'acide nucléique à partir de sondes spécifiques et la détection de la séquence cible par PCR en temps réel. La totalité des étapes se déroule dans les différentes chambres d'une cartouche à usage unique contenant tous les réactifs nécessaires à la détection bactérienne des cibles. Différents kits ont été développés pour identifier rapidement des micro-organismes et/ou détecter des gènes de résistance directement à partir des échantillons biologiques ou après subculture. Récemment la société Cepheid® a créé une cassette dédiée au diagnostic des infections ostéo-articulaires (MRSA/SA SSTI) permettant la détection de *S. aureus* et de sa résistance à la méticilline (92). Les sondes utilisées ciblent le gène *spa* (codant pour la protéine A du *S. aureus*), le gène de la résistance à la méticilline *mecA* et les gènes de la cassette *SCC mec*. Les résultats sont disponibles en 1h.



Figure 4. Automate GenXpert® (Cepheid)

Dubouix-Bourandy *et al* ont évalué le test GenXpert® MRSA/SA SSTI sur 135 échantillons osseux et articulaires et les résultats montrent que la sensibilité et la spécificité de détection de *S. aureus* méticillino-sensibles (SAMS), de *S. aureus* méticillino-résistant (MRSA) et des staphylocoques à coagulase négative méticillino-résistant étaient respectivement de 100% et 98,3%, 100% et 100% et 100% et 100% et 95,3%. Le temps médian d'exécution du test était de 72 minutes contre 79h pour la culture. Grâce à ces résultats, un traitement approprié pourrait être mis en route plus rapidement (92).

D'autres études ont permis d'évaluer les performances de cette technique et sont résumées dans le tableau ci-dessous (92)(93)(94)(95).

Études	n	Type	<i>S.aureus</i> (Se/Sp)	SASM (Se/Sp)	SARM (Se/Sp)	SCNRM (Se/Sp)
<i>Dubouix-Bourandy et al.</i> 2011 (92)	135 échantillons 105 patients	Prospective	100/97.8	100/98.3	100/100	100/95.3
<i>Titecat et al.</i> 2012 (93)	104 échantillons 30 patients	Prospective	100/91.2	-	-	-
<i>Lourtet-Hascoëtt et al.</i> 2014 (94)	72 échantillons 72 patients	Rétrospective	-	-	-	36/98
<i>Valour et al.</i> 2014 (95)	91 échantillons 76 patients	Rétrospective	94.4/100	94.4/100	100/100	

Tableau 7. Présentation de différentes études menées pour évaluer les performances du kit (MRSA/SA STTI)

4.2.3.2 Approches syndromiques

Le diagnostic syndromique représente un réel enjeu dans la prise en charge des maladies infectieuses. Le développement de nouvelles techniques moléculaires comme la PCR multiplex a pour objectif d'obtenir plus rapidement un grand nombre de résultats et d'optimiser la prise en charge du patient. Depuis quelques années, des outils de PCR syndromiques adaptés au diagnostic d'urgence (point of care) ont été développés. Ils permettent de détecter un nombre de plus en plus important de micro-organismes en un temps record et en une seule analyse. Plusieurs panels syndromiques sont actuellement disponibles sur le marché :

- respiratoire (cibles virales et bactéries intracellulaires)
- hémoculture (flacons positifs ou directement sur le sang, avant ou après orientation par coloration de gram)
- selles (cibles virales, bactériennes et parasitaires)
- LCR (ciblant les méningites communautaires)
- tissus mous (ciblant les principaux agents responsables d'infections ostéo-articulaires)

D'autres panels syndromiques sont actuellement testés comme le panel respiratoire voie basse, le panel vaginal, le panel fièvre du voyageur ou encore le panel fièvre chez l'immunodéprimé.

L'approche syndromique fait appel à une PCR multiplex fonctionnant sur le principe de l'utilisation de plusieurs couples d'amorces (au moins 3 différentes) dans la même réaction permettant la recherche de segments d'ADN différents. Cette approche permet l'amplification de plusieurs amplicons à la fois. Les segments d'ADN recherchés sont de tailles suffisamment différentes, permettant d'utiliser cette méthode comme outil d'identification bactérienne. De plus, cette approche permet également l'amplification de plusieurs gènes tels que les gènes de virulence, les gènes de résistance aux antibiotiques. La présence de plusieurs amorces dans un seul tube pour PCR peut poser de nombreux problèmes tels que la formation de dimères d'amorce et la discrimination d'amplification de fragments d'ADN plus longs. Pour ce type d'amplification, des amorces ayant des températures d'hybridation semblables ainsi qu'une longueur des produits amplifiés comparable doivent être utilisées. En revanche, les grandes différences de longueur d'ADN cible favoriseront l'amplification de la cible la plus courte par rapport à la cible la plus longue. Ce qui aboutit à des différences de rendement de produits amplifiés.

Système	Méthode	Panels commercialisés	cibles	Gènes de résistance	Délais de résultats
Techniques d'amplification					
Film array® (Biofire/Biomérieux) (96)	PCR multiplex	Respiratoire LCR Hémoculture Selle Infection ostéo-articulaire en développement	16 à 24 cibles (bactéries, levures, virus)	MecA Van A/B KPC	1h15
Unyvero® (Curetis) (97)	PCR multiplex	Respiratoire Hémoculture Infection intra-abdominale Infection ostéo-articulaire	21 à 52 cibles (bactéries, levures, virus, toxines)	16 à 22 gènes	4h30
Prove-it® (Mobidiag) (98)	PCR +hybridation sur sonde	Hémoculture Infection ostéo-articulaire	> 60 bactéries et levures	MecA Van/B	3h30
e-plex® (GenMark) (99)	PCR multiplex microfluide	Respiratoire Hémoculture	25 à 58 cibles (bactéries, virus, levures)	10 gènes	1h30
Verigene® (Nanosphere) (100)	Microarray	Respiratoire Hémoculture Selle	9 à 21 cibles (bactéries, virus, levures, toxines)	9 gènes	2h30

Tableau 8. Exemple de systèmes commercialisés

- **Prove-it Bone and joint®**

Le test Prove-it Bone and joint® (Mobidiag, Helsinki, Finlande) est le premier test de PCR multiplex permettant le diagnostic des infections ostéo-articulaires. Il est basé sur la technologie des puces à ADN. Il combine PCR multiplex et hybridation sur sonde. Cette technologie permet l'identification de plus de 60 bactéries et marqueurs de résistance tels que les gènes *mecA*, *vanA*, *vanB* directement à partir de l'échantillon clinique et sans culture bactérienne préalable. L'extraction de l'ADN se fait directement à partir d'un échantillon de biopsie osseuse, de tissu ou de liquide synovial. La détection simultanée de nombreuses cibles bactériennes et la détermination de leur profil de sensibilité aux antibiotiques permettraient la mise en place d'une antibiothérapie adaptée plus rapidement. Le test dure environ 3h30 excluant l'extraction de l'ADN (98).

La performance du test Prove-it Bone and joint® a été évaluée à travers différentes études. D'après Hinic *et al*, les résultats des prélèvements ostéo-articulaires testés ont été comparés avec ceux obtenus par la culture. La sensibilité était de 62,7% pour le test Prove-it Bone and joint® et de 57,7% pour la culture (101).

Metso *et al* ont quant à eux évalué Prove-it Bone and joint® sur 61 prélèvements ostéo-articulaires. La sensibilité et la spécificité du test étaient respectivement de 82% et 95%. Neuf patients avaient reçu une antibiothérapie préalable, le test Prove-it Bone and joint® avait détecté des micro-organismes dans 6 des 9 prélèvements contrairement à la culture qui n'avait été positive que dans 2 cas sur 9. (102).

Prove-it Bone and joint® est un outil intéressant, fournissant des résultats préliminaires rapides en attendant les résultats de la culture. De plus, l'utilisation de ce test chez des patients ayant déjà reçu un traitement antimicrobien au moment du prélèvement a donné de très bons résultats. Cependant, ce test qui nécessite un temps de manipulation assez long (3,5h) est peu adapté à la routine hospitalière. Le développement de ce kit est à l'arrêt à l'heure actuelle.

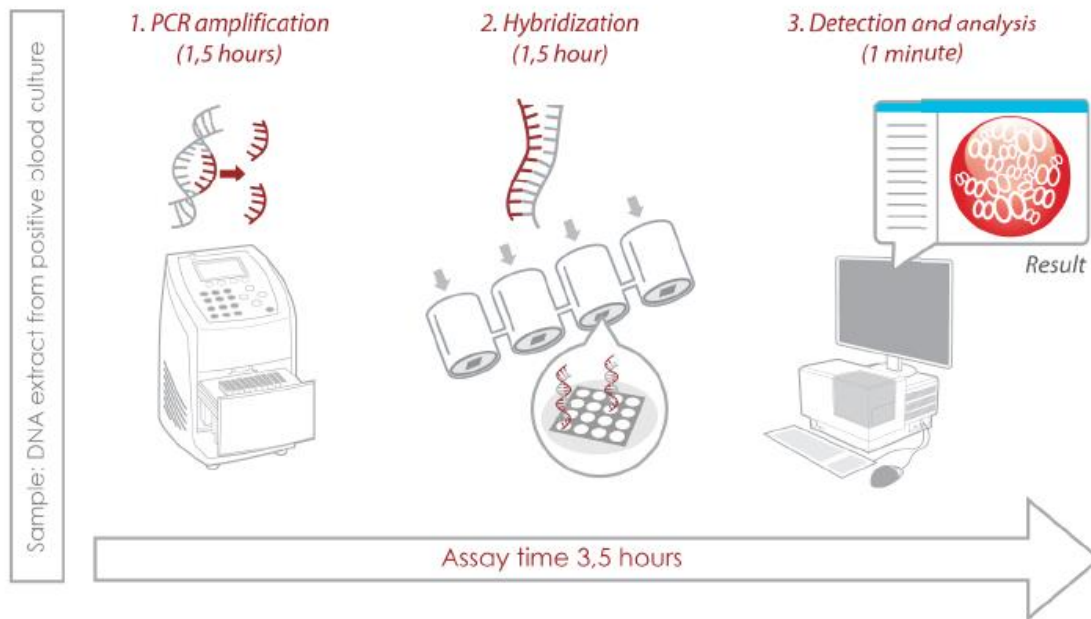


Figure 5. Système Prove it Bone and Joint® (Mobidiag)

- FilmArray® Bone and joint infection (BJIs)

FilmArray® est un système totalement automatisé effectuant une PCR multiplex « niché » en une heure et ne nécessitant que quelques minutes pour la préparation de l'échantillon. Il intègre la lyse de l'échantillon, l'extraction des acides nucléiques, l'amplification, la détection et l'analyse. L'amplification des acides nucléiques se fait par PCR « niché » ou nested-PCR en deux étapes successives. La première PCR multiplexée va amplifier toutes les cibles du panel, tandis que la deuxième PCR va amplifier chaque cible individuellement à l'aide de couples d'amorces internes au produit de la première PCR. Plusieurs panels syndromiques sont actuellement commercialisés, ils ciblent les infections respiratoires, les infections neuro-méningées, les hémocultures et les infections gastro-intestinales. Le Panel FilmArray® BJIs est en cours de développement, il permet la détection de bactéries à Gram positif, de bactéries

à Gram négatif, de levures ainsi que certains marqueurs de résistance aux antibiotiques (103)(104).

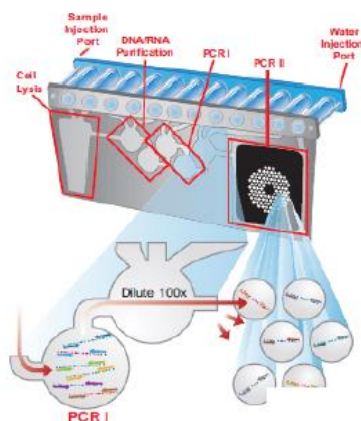


Figure 6. Système FilmArray® Bone and Joint (Biomérieux)

Monteix *et al* ont testé le FilmArray® BJI sur des échantillons osseux, des liquides synoviaux et des tissus mous. Les résultats préliminaires montrent une bonne corrélation entre FilmArray® BJI et la culture. Cependant le filmArray® présente une mauvaise sensibilité dans la détection des gènes *mec A/C* (105).

- Unyvero ITI® technology

L'ensemble de mon travail a consisté à évaluer cette nouvelle technologie.

- Présentation de l'automate Unyvero

L'automate Unyvero de la société Curetis® est un système entièrement automatisé et intégré permettant de transformer un processus de laboratoire complexe en une tâche facile à mettre en œuvre. Il est composé de 3 modules. Le module Unyvero L4 Lysator pour lyser les échantillons, le module Unyvero A50 Analyzer pour le traitement de l'Unyvero cartridge spécifique d'une application, et l'Unyvero Cockpit C8, unité centrale permettant l'interaction avec l'utilisateur à travers un écran tactile et un logiciel spécifique. Un Unyvero cockpit peut être connecté à deux Unyvero L4 lysator en même temps et à 4 Unyvero A50 analyzer permettant de traiter simultanément jusqu'à 8 échantillons.



Figure 7. Présentation de l'Unyvero System: l'Unyvero L4 Lysator, l'Unyvero C8 cockpit, l'Unyvero A50 Analyzer de gauche à droite (Curetis)

L'unyvero L4 Lysator effectue la lyse de l'échantillon natif, il peut traiter jusqu'à 4 échantillons maximum en parallèle. La technologie brevetée pour la préparation d'échantillon Unyvero, qui combine différents produits chimiques, un actionnement mécanique novateur et la lyse thermique, permet de traiter une large variété d'échantillons complexes comme les expectorations, les lavages broncho-alvéolaires, les selles, les tissus mous, les cathéters, l'urine et les hémocultures. Cette technologie qui garantit un haut rendement d'ADN après extraction n'est pas sans contrainte. En effet le temps nécessaire pour lyser l'échantillon est de 30 minutes. De plus cette étape n'est pas incluse dans le processus automatisé.

L'unyvero A50 Analyzer assure le traitement automatique de l'Unyvero cartridge. Il se compose d'éléments mécaniques, électroniques et optiques qui permettent de contrôler l'ensemble du traitement des échantillons et des étapes d'analyse à l'intérieur de la cassette scellée. Il peut traiter jusqu'à deux cassettes Unyvero Cartridges indépendamment l'une de l'autre et exécute automatiquement l'isolation et la purification de l'ADN ainsi que son amplification spécifique par PCR multiplex et sa détection par hybridation sur sonde. L'Unyvero Analyzer génère des informations diagnostiques complètes en 4 heures sans aucune intervention de l'opérateur.

L'Unyvero C8 cockpit contrôle l'Unyvero lysator et l'Unyvero Analyser. Il est équipé d'un écran tactile et d'un lecteur codes-barres qui permet une lecture automatique rapide du code barre d'identification de chaque échantillon évitant ainsi les erreurs d'identification patient. Il permet à l'utilisateur de visualiser et d'interpréter les résultats en fin de réaction grâce à un logiciel d'utilisation aisée, permettant une traçabilité complète via un système de code matriciel, indispensable dans un contexte d'accréditation et d'assurance qualité des laboratoires.

L'Unyvero System identifie un très grand nombre d'agents pathogènes à l'origine de maladies infectieuses et détecte les principaux gènes de résistance aux antibiotiques associés en 4 à 5 heures permettant un gain de temps non négligeable dans la prise en charge des infections. L'analyse est réalisée directement à partir de l'échantillon clinique.

Plusieurs applications spécifiques de syndromes sont actuellement disponibles :

- L'Unyvero cartridge Pneumonie permet le diagnostic syndromique des infections respiratoires
- L'Unyvero cartridge Blood Culture (BCU) permet la détection d'agents pathogènes impliqués dans les bactériémies
- L'Unyvero cartridge Intra-Abdominal Infection (IAI) permet la détection d'agents pathogènes impliqués dans les infections intra-abdominales.
- L'Unyvero cartridge Implant and Tissue Infection (ITI) permet la détection d'agents pathogènes impliqués dans l'infection des tissus mous. Elle a été testée dans le cadre de notre étude.

- Présentation de l'application Unyvero ITI®

L'application Unyvero ITI® (Curetis) est un test ADN semi-quantitatif basé sur l'exécution en parallèle de huit réactions PCR multiplex. C'est un test développé pour le diagnostic des infections ostéo-articulaires et les infections de tissus mous dont les IPD. La technique de multiplexage spécifique couplée à l'hybridation sur sonde fluorescente permet la détection d'un large panel de plus de 70 agents pathogènes couvrant à la fois les bacilles à Gram négatif, les cocci à Gram positif, les anaérobies, les levures et les principaux marqueurs de résistance aux antibiotiques. Les échantillons pouvant être analysés sont des biopsies

osseuses, des biopsies tissulaires ou des échantillons liquides (liquides d'aspirations à la seringue).

L'unyvero Cartridge ITI ® est une cassette jetable qui contient tous les réactifs nécessaires à l'analyse. Elle intègre les conteneurs de réactifs, une colonne de purification d'ADN, huit chambres de PCR indépendantes et le nombre correspondant de matrices, le tampon pour la purification de l'ADN, les réactifs et les primers associés à des marqueurs fluorescents pour l'amplification de la PCR, mais aussi des sondes pour l'hybridation de la matrice.

Toutes les étapes de l'analyse, hormis la préparation de l'échantillon, sont réalisées à l'intérieur de la cassette (Extraction, purification, amplification, et détection spécifique).

La cassette est un système physiquement fermé, évitant toute fuite potentielle du liquide d'échantillonnage ou des réactifs et réduit le risque de contamination. Cependant, un inconvénient est à prendre en compte : la taille des cassettes, qui nécessitera une place conséquente pour leur stockage dans un laboratoire. De plus il faut également prendre en considération le surplus de déchet généré par l'utilisation d'une telle cassette.

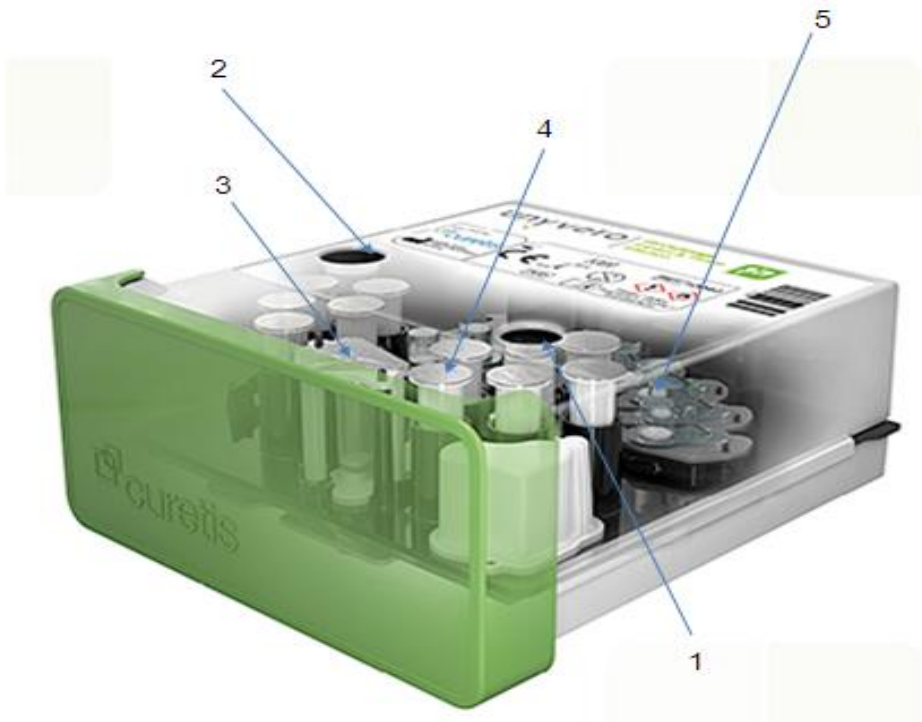


Figure 8. Présentation de l'Unyvero Cartridge (Curetis)

1. *Emplacement de l'Unyvero Sample Tube*
2. *Emplacement de l'Unyvero Master Mix*
3. *Colonne de purification de l'ADN*
4. *Chambres de PCR*
5. *Matrice à membrane*

Groupe	Agent pathogène
Universal Bacteria ²	
Bactéries Gram-positif	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Coagulase negative staphylococci ³
	<i>Streptococcus spp.</i> ⁴
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	<i>Streptococcus pyogenes / dysgalactiae</i>
	<i>Granulicatella adiacens</i>
	<i>Abiotrophia defectiva</i>
	<i>Enterococcus spp.</i> ⁵
<i>Enterococcus faecalis</i>	
Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium spp.</i> ⁶

² Le texte ci-dessous comporte de plus amples informations sur cet analyte.

³ incl. *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*

⁴ incl. *S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. sanguinis*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. gordonii*

⁵ incl. *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. raffinosus*

⁶ y compris *C. jeikeium*, *C. belfanti*, *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. aurimucosum*

Tableau 9. Panel de cocci à Gram positif testé par l'Unyvero® ITI Technology (Curetis)

Groupe	Agent pathogène
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex ⁷
	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Proteus spp.</i> ⁸
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ⁹
	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Klebsiella variicola</i> ¹⁰
Non-fermenting bacteria	<i>Citrobacter freundii / koseri</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Anaérobies	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex ¹¹
	<i>Propionibacterium acnes</i>
	<i>Finexgoldia magna</i>
Fungi	<i>Bacteroides fragilis</i> group ¹²
	<i>Candida spp.</i> ¹³
	<i>Candida albicans</i>
	<i>Candida tropicalis</i>
	<i>Candida glabrata</i>
	<i>Issatchenkia orientalis (C. krusei)</i>

⁷ incl. *E. cloacae*, *E. amnigenus*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*

⁸ incl. *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. penneri*, *P. hauseri*

⁹ incl. *Klebsiella pneumoniae* Cluster kp I + II, Alves et al., J Clin Microbiol, 44(10), 2006; incl. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*

¹⁰ *Klebsiella variicola* (Cluster kp III; identifiée auparavant *K. pneumoniae*, classifiée comme espèce séparée en 2004)

¹¹ incl. *A. baumannii*, *A. oleivorans*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii*

¹² incl. *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. uniformis*

¹³ Le texte ci-dessous comporte de plus amples informations sur cet analyte.

Tableau 10. Panel de Bacille à Gram négatif testé par l'Unyvero® ITI Technology (Curetis)

Marqueur	Possible résistance	Référence
<i>ermA</i>	Macrolides/Lincosamides	Roberts <i>et al.</i> , FEMS Microbiol Lett, 282(2), 2008
<i>ermC</i>	Macrolides/Lincosamides	Roberts <i>et al.</i> , FEMS Microbiol Lett, 282(2), 2008
<i>mecA</i>	Oxacilline/Méthicilline	Carvalho <i>et al.</i> , Braz J Infec Dis, 14(1), 2010
<i>mecC</i> (LGA251)	Oxacilline/Méthicilline	Katayama <i>et al.</i> , Antimicrob Agents Chemother, 44(6), 2000
<i>vanA</i>	Glycopeptides	Cetinkaya <i>et al.</i> , Clin Microbiol Rev. 13(4):686-707, 2000.
<i>vanB</i>	Glycopeptides	Cetinkaya <i>et al.</i> , Clin Microbiol Rev. 13(4):686-707, 2000.
<i>aac(6)/aph(2'')</i>	Aminoglycosides	Shaw <i>et al.</i> , Microbiol Rev, 57(1), 1993
<i>aacA4</i>	Aminoglycosides	Shaw <i>et al.</i> , Microbiol Rev, 57(1), 1993
<i>ctx-M</i> ¹⁹	Céphalosporines de 3e génération, classe A	Bonnet <i>et al.</i> , Antimicrob Agents Chemother, 45(8), 2001
<i>imp</i> ²⁰	Carbapénèmes, classe B	Kawa <i>et al.</i> , J Clin Microbiol., 34(12), 1996
<i>kpc</i> ²¹	Carbapénèmes, classe A	Queenan <i>et al.</i> , Clin Microbiol Rev, 20(3), 2007

¹⁸ Les résistances aux antibiotiques induites par les bêta-lactamases suivent la classification d'Ambler. Les couvertures ont été établies par méthode BLAST.

¹⁹ y compris les variantes cliniques pertinentes *ctx-M3*, *ctx-M10*, *ctx-M15*, *ctx-M55*

²⁰ Variantes cliniques pertinentes, dont *imp1* à *imp10*, *imp15*, *imp16*, *imp19* et *imp25*

²¹ *kpc1* à *kpc22*

Tableau 11. Panel des marqueurs de résistance testé par l'Unyvero® ITI Technology (Curetis)

- Mise en pratique de l'application Unyvero ITI®

Les échantillons solides ou liquides sont transférés dans l'**Unyvero Sample tube**. Les biopsies osseuses ou tissulaires sont au préalable dilacérées dans de l'eau stérile. La taille des fragments transférés dans l'Unyvero Sample tube ne doit pas dépasser 9 mm³. L'Unyvero sample tube permet un traitement optimisé de l'échantillon du patient. Il contient des perles de verre mais aussi un tampon pour la lyse des bactéries et la liquéfaction de l'échantillon. La lyse est à la fois mécanique, chimique et thermique. Dans le cas de fragments osseux ou tissulaires, les fragments sont déposés dans l'Unyvero Sample tube et 150 µL de l'**Unyvero Sample Pre-Treatment Tool** qui est un tampon permettant la préparation et le traitement des échantillons sont ajoutés aux fragments. Dans le cas d'un prélèvement liquide, 180 µL de prélèvement sont déposés directement dans l'Unyvero Sample tube. Ce tube est fermé hermétiquement et définitivement par l'**Unyvero Tube Cap**. Il contient de la protéinase K ainsi qu'un gène de contrôle synthétique qui fait office de contrôle interne et qui va subir toutes les étapes du processus intégré. L'Unyvero Sample tube ainsi fermé est ensuite inséré dans l'Unyvero Lysator. La lyse dure environ 30 minutes.

L'Unyvero Master Mix tube contient la Taq polymérase, les tampons de PCR et les nucléotides, réactifs nécessaires à l'amplification de l'ADN, il se conserve à -20°C. Une fois la lyse terminée, l'Unyvero sample Tube et L'Unyvero Master Mix sont insérés dans l'Unyvero cartridge elle-même chargée dans l'Unyvero Analyser et traitée de manière entièrement automatique. Cette étape dure environ 4h au cours de laquelle plusieurs processus vont se mettre en place :

- **l'extraction d'ADN** qui se fait grâce à une colonne de purification en silice. Cette technologie est largement utilisée plus simple et plus rapide que l'extraction organique. L'ADN est absorbé spécifiquement sur la membrane de silice en présence de certains sels et à un pH particulier. Les contaminants cellulaires sont éliminés par les différentes étapes de lavage. L'ADN est finalement élué dans un tampon faible en sel ou tampon d'éluion.
- **l'amplification de l'ADN** dans l'Unyvero Cartridge se fait par une technique de PCR multiplex point final. Chaque cycle de PCR est constitué de 3 étapes : une dénaturation par chauffage afin de séparer les deux brins qui le compose, une hybridation par les amorces spécifiques couplées à des marqueurs fluorescents aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation opérée grâce à l'ADN polymérase. L'Unyvero Cartridge où se déroulent les réactions de PCR multiplex destinées à identifier les microorganismes et leurs marqueurs de résistance est divisé en huit chambres de PCR indépendantes les unes des autres pour des raisons techniques notamment de température, d'hybridation des couples d'amorces, de proximité des séquences nucléotidiques.

Chambre 1	Chambre 2	Chambre 3	Chambre 4
<i>Bacteroides fragilis</i> group	<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>aac(6')/aph(2'')</i>	<i>aacA4</i>
<i>ermC</i>	Coagulase negative staphylococci (CNS)	<i>Candida albicans</i>	<i>ermA</i>
<i>Finegoldia magna</i>	<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Citrobacter freundii/koseri</i>	<i>ndm</i>
<i>Granulicatella adiacens</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>Streptococcus pyogenes/dysgalactiae</i>
Chambre 5	Chambre 6	Chambre 7	Chambre 8
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Universal Bacteria	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
<i>ctx-M</i>	<i>imp</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Candida</i> spp.	<i>kpc</i>
<i>Klebsiella varicola</i>	<i>mecA</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>mecC</i>
<i>oxa-23</i>	<i>Proteus</i> spp.	<i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>Candida krusei</i>)	<i>oxa-48</i>
<i>oxa-24/40</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>oxa-58</i>
			<i>vim</i>

Tableau 12. Distribution des marqueurs génétiques par chambre de PCR dans la cartouche ITI (Curetis)

- **l'hybridation de l'ADN** se fait sur microassays ou puce à ADN au niveau de l'Unyvero Cartridge. Cette cartouche contient 8 matrices à membrane indépendantes les unes des autres, chacune possédant 4 à 6 sondes. Ces matrices de faible densité permettent la détection finale de l'ADN grâce à une lecture optique des amplicons marqués par fluorescence. Les puces à ADN reposent sur le principe de complémentarité des brins de la double hélice d'ADN. Ce sont des supports en verre, en silicium ou en plastique de petite taille (de l'ordre de 25×75mm) sur lesquels sont fixés des milliers de séquences d'ADN. Ces séquences d'ADN fixées sur la puce sont appelées par convention les sondes. Elles sont soit synthétisées directement soit greffées après synthèse (plus économique) et sont caractéristiques d'autant de gènes. Les produits d'amplification marqués par un fluorochrome sont appelés les cibles. L'hybridation implique la mise en contact des cibles marquées par une molécule fluorescente avec les milliers de sondes présentes sur la puce. Les cibles reconnaissent parmi les sondes les séquences qui leur sont complémentaires et s'y appariant. Les hybrides sondes/ cibles sont ensuite imagés via un scanner, répétés et quantifiés grâce à leur fluorescence. Cette multitude de sondes présente sur ces puces permet de détecter et d'analyser un grand nombre de gènes. Une caméra optique permet ensuite de mesurer l'intensité de la fluorescence émise par les amplicons après hybridation sur les sondes nucléiques (106).

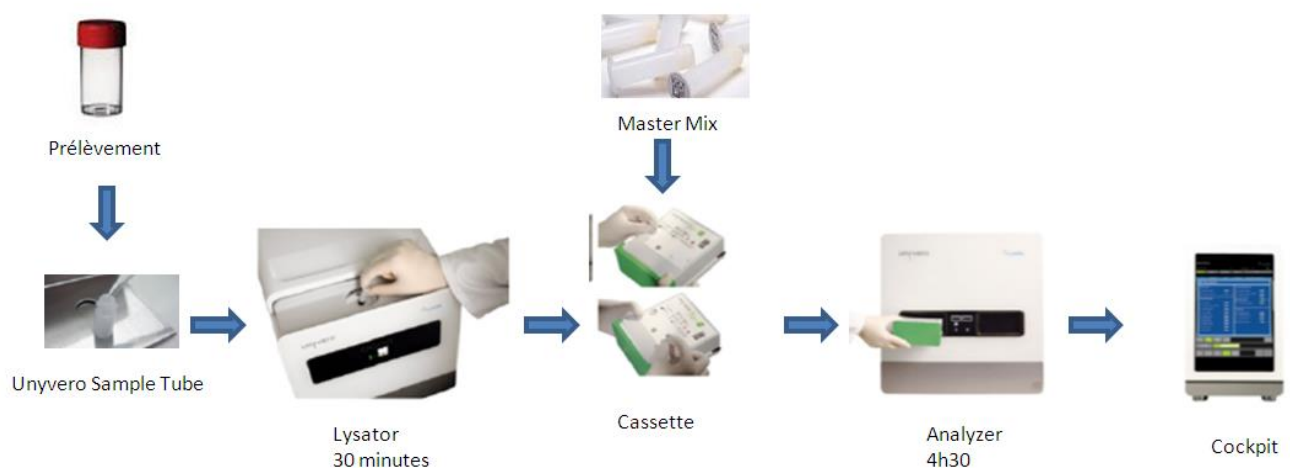


Figure 9. Mode opératoire du système l'Unyvero® ITI Technology

A l'heure actuelle quelques études ont été réalisées afin d'évaluer cette technique moléculaire innovante ayant mis au point un panel ciblant des pathogènes fréquemment impliqués dans les infections ostéo- articulaires ou les infections des tissus mous. Cependant aucune étude n'a été menée sur les UPD.

En 2017 Malandain *et al* ont testé les performances du test ITI et ont comparé les résultats avec la culture traditionnelle et la PCR universelle 16S. Quatre cent quatre-vingt quatre échantillons de différents types (biopsies osseuses, tissus autour de prothèse, liquide synovial) de patients souffrant d'infections ostéo-articulaires sur prothèse ont été testés. Le taux de concordance du test Unyvero avec la culture était de 58,1 % et avec la PCR ARNr 16S de 70,1%. L'étude a conclu à un manque de détection de la part du test moléculaire lorsque l'inoculum bactérien était faible, mais qu'il était intéressant de l'utiliser lorsque des patients avaient reçu une antibiothérapie au préalable (107).

En 2015 Borde *et al* ont mené une étude prospective chez 28 patients en comparant la PCR 16S et l'outil Unyvero® à la culture. Le taux de concordance de l'outil Unyvero avec la culture était de 82 % et avec la PCR 16S de 96 %. Le faible nombre de patients inclus dans l'étude peut expliquer la différence de résultats obtenus avec l'étude précédente. Les performances de la technique ne peuvent pas véritablement être évaluées avec un nombre de patients aussi faible (108).

En 2015 Rodriguez-Sevilla *et al* ont également évalué cette technique en menant une étude prospective sur 27 patients. Les résultats des cultures réalisées à partir des liquides de sonicats de prothèse ont été comparés avec les résultats obtenus avec l'outil Unyvero®. Les sensibilités et les spécificités par échantillon étaient respectivement de 73% et 90% pour la culture et de 83,3% et 94,7% pour l'outil Unyvero®. Les sensibilités et spécificités par patients étaient respectivement de 90% et 98,9% pour la culture et de 90 à 94% pour l'outil Unyvero®. Les performances de l'outil Unyvero® apparaissent meilleures que celles de la culture sur sonicat (109).

Partie II : Evaluation de l'Unyvero[®] ITI technology comme outil d'identification bactérienne et de détection des marqueurs de résistance aux antibiotiques associés à partir d'échantillons cliniques.

1. Objectif de notre étude

Le but de notre étude a été d'évaluer les performances de l'automate Unyvero[®] ITI technology commercialisé par la société Curetis dans le cadre de la prise en charge des IPD. Cette stratégie innovante de PCR multiplex permet une identification bactérienne et une détection des principaux marqueurs de résistances aux antibiotiques en 4h à 5h environ directement à partir des prélèvements. Dans le cadre de notre étude nous avons majoritairement étudié des biopsies osseuses mais aussi quelques biopsies tissulaires et écouvillonnages profonds.

2. Performance of Unyvero[®] ITI technology in the management of Diabetic foot infection

Cette étude a été menée au laboratoire de microbiologie du CHU de Nîmes entre le 1^{er} Décembre 2016 et le 31 Mai 2017. Cette étude est la première à évaluer l'Unyvero ITI technology chez des patients diabétiques atteints d'ulcère de pied. Un panel de 79 prélèvements a été étudié comprenant 33 biopsies osseuses transcutanées effectuées au lit du patient, 26 biopsies osseuses réalisées au bloc opératoire, 11 biopsies tissulaires et 9 écouvillonnages profonds.

Les prélèvements reçus au laboratoire ont été analysés à la fois par culture conventionnelle et par l'Unyvero[®] ITI technology. Pour chaque prélèvement, les résultats obtenus par l'Unyvero[®] ITI technology ont été comparés aux résultats obtenus par la culture conventionnelle considérée dans notre étude comme le « Gold Standard ». Toutes les discordances ont été confirmées par une troisième méthode basée sur l'amplification de séquences spécifiques par PCR ou sur l'amplification de l'ARN 16S. Les discordances ont été classées soit en faveur de la culture soit en faveur de la PCR multiplex.

Cette étude a permis d'évaluer cette nouvelle technique moléculaire innovante dont la rapidité de rendu des résultats constitue un réel atout permettant aux cliniciens d'adapter l'antibiothérapie dans les meilleurs délais. La place d'un automate tel que celui-ci reste à déterminer au sein du laboratoire, le coût élevé ne permettant pas de l'utiliser en systématique.

1 **Sensitivity and specificity of the automated multiplex-PCR Unyvero i60® ITI cartridge**
2 **system in the management of diabetic foot osteomyelitis**

3 Catherine Dunyach-Remy^{1,2,¥}, Charlotte Carrere^{1,2,¥}, Sophie Schuldiner³, Nathalie Jourdan⁴,
4 Nicolas Cellier⁵, Axelle Cadière⁶, Catherine Lechiche⁷, Albert Sotto^{1,7}, and Jean-Philippe
5 Lavigne^{1,2,*}

6 [¥]These two authors contributed equally to this work

7 ¹National Institute of Health and Medical Research, U1047, Montpellier University, Faculty
8 of Medicine, 30908 Nîmes cedex 02, France

9 ²Department of Microbiology, University Hospital Nimes, Univ Montpellier, 30029 Nîmes
10 Cedex 9, France

11 ³Department of Diabetology, University Hospital Nîmes, 30240 Le Grau du Roi, France

12 ⁴Department of Diabetology, University Hospital Nimes, Univ Montpellier 30029 Nîmes
13 Cedex 9, France

14 ⁵Department of Orthopedic Surgery, University Hospital Nimes, Univ Montpellier, 30029
15 Nîmes Cedex 9, France

16 ⁶Chrome Unit, EA7352, University of Nîmes, Nîmes, France

17 ⁷Departement of Infectious Diseases, University Hospital Nimes, Univ Montpellier, 30029
18 Nîmes Cedex 9, France

19
20 **Correspondence and reprint request** to Jean-Philippe Lavigne, Institut National de la Santé
21 et de la Recherche Médicale, U1047, Université de Montpellier 1, UFR de Médecine, 186
22 Chemin du Carreau de Lanes, 30908 Nîmes cedex 02, France. E-mail:
23 jean.philippe.lavigne@chu-nimes.fr

24 **Running title:** *Unyvero ITI technology in DFOM*
25

26

27 **ABSTRACT**

28 *Objectives:* Diagnosis of Diabetic Foot Infections/Osteomyelitis (DFOM) requires deep
29 sample (tissue or bone) biopsies resulting in a long incubation period (14 days) in
30 bacteriology labs. New molecular tools can decrease the identification time of pathogenic
31 bacteria involved in bacterial infections. The aim of this study was to evaluate the
32 performance of Unyvero ITI® technology (Curetis), a multiplex PCR method detecting
33 microorganisms in 5 hours.

34 *Methods:* We performed a prospective study in our Diabetic Foot reference center in Nîmes
35 University Hospital (France) from 1st December 2016 to 31st May 2017. We compared the
36 Unyvero ITI® PCR to conventional culture incubated for 14 days. The presence of bacteria
37 detected by PCR was confirmed by specific PCR and 16S rDNA PCR followed by
38 sequencing.

39 *Results:* In total, 79 patients with suspected DFOM were included and 177 bacteria were
40 isolated by culture (2.2 per patient). The concordance level between Unyvero® assay and
41 cultures was 66.7% (65.0-68.4). Among the discrepancies, 31 (52.5%) microorganisms were
42 not present in the ITI® panel and 20 of the bacteria in the panel (33.9%) concerned
43 pathogenic bacteria. Unyvero ITI® PCR allowed the detection of 28 microorganisms (15.8%)
44 not detected by cultures; 18 of which (64.3%) were pathogenic.

45 *Conclusion:* Although routine culture is essential in DFOM, the Unyvero ITI® PCR
46 represents an interesting additional solution and may enable clinicians to adjust antimicrobial
47 treatment earlier to facilitate patient management and outcomes as well as antimicrobial
48 stewardship.

49
50 **Keywords:** Diabetic foot osteomyelitis, Microbial diagnosis, Multiplex PCR, Unyvero i60
51 ITI® system

52
53

54 **Introduction**

55 Diabetic foot ulcers are one of the most serious health problems related to diabetes mellitus
56 [1]. About 15-20% of the 420 million diabetic patients develop skin wounds across their
57 lifespan [2]. Diabetic foot osteomyelitis (DFOM) is a consequence of the spread of the skin
58 tissue infection to the contiguous bone and joint structures underlying a foot ulcer, supported
59 by arteriopathy and neuropathy [3]. Many factors contribute to delay wound healing and may
60 increase the risk for developing DFOM. Depending on the setting and severity of infection,
61 prevalence of bone involvement ranges widely from 10% to 60% [4]. Thus this complication
62 is a major cause for lower-limb amputation in diabetic patients [1]. In France, DFMO is
63 responsible for 8,000 amputations per year, representing the leading cause of this surgery [5].
64 DFOMs are usually polymicrobial [6]. An exhaustive knowledge of the types of bacteria
65 responsible for the bone infection would help to determine the optimal treatment of the
66 infection in order to avoid amputation [7]. Failure to follow these recommendations results in
67 unnecessary antimicrobial treatment, leading to emergence of multidrug-resistant organisms,
68 which in turn increases therapeutic failures, healthcare costs and possibly causes drug-related
69 adverse events [8].

70 One of the main difficulties is the early diagnosis of DFOM. However, in contrast to diabetic
71 foot infection (DFI), DFOM diagnosis must be based on microbiological documentation, for
72 which it is recommended to obtain bone samples after 2 weeks of antibiotic therapy washout
73 [9]. Moreover, the majority of the bacteria involving DFOM have the capacity to form
74 biofilms [9]. The biofilm organization causes a lengthy delay between bone biopsy and the
75 results (\approx 14 days). Thus the diagnosis of DFOM takes approximately 1 month in total [9]. To
76 decrease this delay, future technologies, notably molecular tools, could help microbiologists
77 and clinicians [10]. The aim of this study was to assess a commercialized multiplex PCR test
78 dedicated to bone and joint infection diagnosis (the ITI® cartridge, Unyvero system, Curetis)
79 to diagnose DFOM. We compared the results with those of culture and 16S rDNA PCR

80 performed on bone biopsies collected in our Diabetic Foot reference center in Occitanie
81 Region (France).

82

83 **Materials and methods**

84 *Study design*

85 This study was approved by the institutional review board and carried out in accordance with
86 the Helsinki Declaration as revised in 2000. From 1st December 2016 to 31st May 2017, all
87 diabetic patients managed in the 2 diabetology Departments of the Nîmes University Hospital
88 with a documented DFI were included prospectively and consecutively in the study. The
89 following inclusion criteria were used: 18 years of age or older, clinical signs of infection and
90 without systemic antibiotic treatment in the previous 15 days. All wounds were assessed for
91 presence and severity of infection by a trained diabetologist using the IDSA-IWGDF
92 classification system [11,12]. Patients were suspected of having osteomyelitis of the foot if
93 they had at least 2 of the following clinical criteria: i) a wound whose duration was ≥ 2 weeks
94 located above an underlying bony prominence, with an area $> 2 \text{ cm}^2$ or a depth $> 3 \text{ mm}$, ii) a
95 positive probe-to-bone test and iii) abnormalities consistent with the diagnosis of
96 osteomyelitis either on plain X-rays, radionuclide procedures (3-phase bone scan and/or
97 labeled leukocyte imaging), or magnetic resonance imaging. A clinical follow-up at 1 month
98 was made. Epidemiological and clinical data were gathered for all patients.

99 After wound debridement, samples for bacterial culture were obtained by transcutaneous bone
100 or tissue biopsy performed by a trained orthopaedist using the procedure previously described
101 [13]. All the samples were immediately sent to the Department of microbiology. The samples
102 were crushed and divided in 2: 1 for conventional routine culture, and 1 for the Unyvero ITI[®]
103 PCR. The 2 analyses were performed by 2 independent biologists blinded to the results of the
104 method used (conventional culture vs PCR).

105 *Conventional microbiological method*

106 Tissue and bone samples were cultured following the European guidelines [14]. Additionally,
107 a Schaedler broth was inoculated by bone biopsy. All the media were incubated for 14 days.
108 Genus and species of all the isolates were determined using the Vitek® MS and Vitek® 2
109 systems (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Susceptibility of antimicrobial agents was
110 tested by the disk diffusion method (BioRad, Marnes La Coquette, France) on Mueller-Hinton
111 agar with or without horse blood according to the recommendations of the EUCAST-SFM
112 2017 (<http://www.sfm-microbiologie.org>). Susceptibility to methicillin was screened by agar
113 diffusion using cefoxitin disks (BioRad). In addition, MICs of carbapenems were determined
114 by the Etest method (BioMérieux). All the results were interpreted as specified by the
115 EUCAST-SFM criteria.

116 *Multiplex PCR cartridge system*

117 The study evaluated the Version 2 of Univero i60 implant and tissue ITI® mPCR system
118 (Curetis). This PCR cartridge offers a panel with 52 pathogens to genus level (15 bacteria and
119 yeasts to species level) and 19 antimicrobial resistance markers. The test can detect a panel of
120 the most frequently found bacteria in DFI/DFOM, along with the most common antibiotic
121 resistance markers. The test was used as recommended by the manufacturer. Briefly, 180 µl
122 of the dilacerated bone and tissue biopsies was transferred into a sample tube. Sample lysis
123 was performed with a 30-min protocol including mechanical, thermal, chemical and
124 enzymatic sample treatment. The pretreated sample tube was then inserted into a cartridge.
125 Finally, the cartridge was inserted into the analyzer module. Internal controls were performed
126 in every PCR run. Results were obtained after approximately 4 h 30, and quantified by image
127 processing with the manufacturer's software (Unyvero operation software OS 3.0).

128 *Additional molecular analyses*

129 To confirm the different results obtained, 16S rRNA gene PCR and/or Denatured-
130 Gradient Gel Electrophoresis were performed in parallel with cultures from the same

131 suspension as previously published [15].

132 Confirmation of the presence of *mecA* gene, ESBL-encoding genes and carbapenemase-
133 encoding genes was done by PCRs using specific primers and confirmed by sequencing the
134 PCR products as previously described [16-20].

135 *Statistical analysis*

136 The analyses were merely descriptive: data were given as numbers and percentages.
137 Concordance rates between the Unyvero ITI® results and culture or 16S rRNA gene PCR
138 results were done. The performances of the Unyvero ITI® PCR assay were determined by
139 calculating sensitivities, specificities, negative (NPV) and positive (PPV) predictive values
140 compared to long-term bacterial culture (gold standard). Statistical analyses were performed
141 using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA).

142

143 **Results**

144 *Clinical data*

145 Among the consecutive 142 eligible cases (patients with a DFI) during the study period, 94
146 were pre-included and 48 excluded because of the absence of deep infections. Among the 94
147 cases, 15 were secondly excluded because of wrong samples or error in diagnosis (Figure 1).
148 Finally 79 patients were definitively included. The demographic and clinical characteristics of
149 these patients are shown in Table 1. Most of the included patients were male (78.5%) with a
150 median age of 69.8 years (31-94). All the DFI were classified as grade 3 or 4. For 31 patients
151 (39.2%) the current wound was the first episode of ulceration. Sixty-five ulcers (82.3%) were
152 associated with osteomyelitis. Fifteen patients (19%) had a history of lower limb amputation.

153

154 *Culture results*

155 In total, 177 strains were isolated from 79 samples corresponding to a mean number of 2.24
156 isolates per sample. Eight samples (10.1%) remained sterile in culture, 21 (26.6%) were

157 monomicrobial and the remaining 50 (63.3%) were positive for several microorganisms
158 (Figure 1, Table 2). Aerobic Gram-positive cocci were the most commonly isolated
159 microorganisms (45.2% of all isolates). Among them, *S. aureus* was the most frequent
160 pathogen isolated: 34 isolates (19.2% of all the microorganisms) representing 42.5% of the
161 Gram-positive cocci. Aerobic Gram-negative bacilli represented 27.7% of all those isolated,
162 mostly enterobacteria (83.7% of Gram-negative bacilli). Finally, anaerobes and aerobic
163 Gram-positive bacilli represented 16.4% and 10.7% of all isolates, respectively.

164

165 *Concordance analysis between Unyvero ITI® and culture results for the samples*

166 The results obtained are shown in Figure 1.

167 In total, 34 out of 79 samples were concordant for the pathogen identification, leading to a
168 concordance rate of 43% (41.9%-47.2%). All the samples that were sterile in culture were
169 negative with the Unyvero ITI® PCR (n=8). For both monomicrobial and polymicrobial
170 positive-culture samples, 26 out of 71 samples (36.6%) were also positive for the same
171 bacteria with the Unyvero ITI® PCR. Of the 45 discordant results, 12 (26.7%) were negative
172 with the Unyvero ITI® system but positive in culture.

173

174 *Concordance analysis between Unyvero ITI® and culture results for the microorganisms*

175 The results obtained are shown in Table 2.

176 In total, 118 out of 177 microorganisms were concordant between culture and Unyvero ITI®
177 results, leading to a concordance rate of 66.7% (65.0-68.4). The overall performance of
178 Unyvero ITI® system was: sensitivity 66.7%, specificity 98.2%, PPV 80.8%, NPV 96.3%
179 and accuracy 95.0% (Table 3).

180 Among the 59 discordant pathogens (culture + and PCR -), 31 were not present in the ITI®
181 panel, generating a concordance rate of 80.8% (78.4-83.2). Twenty of the remaining 28 other

182 pathogens included in the ITI® panel belonged to “classical’ pathogens (not to commensal or
183 low-virulent flora) involved in DFI.

184 For the 12 samples with a negative ITI® PCR but a positive culture, 26 microorganisms were
185 identified of whom 15 were included in the panel (Table 4). Interestingly, nine of these 15
186 pathogens presented an inoculum effect because these bacteria had fewer than 5 colonies on
187 culture media and were obtained after 2.9 days (± 2). The majority of these patients (9/12)
188 received an antibiotic treatment, but five had an amputation.

189

190 *Concordance analysis between Unyvero ITI® and other molecular tools*

191 The 16S rDNA PCR and DGGE confirmed all the results found with the Unyvero ITI®,
192 leading to a concordance rate of 100%. Thus 28 microorganisms from 19 samples were
193 detected with ITI® Unyvero while they were absent in culture. No samples presented
194 negative culture. The ITI® Unyvero detected either 1 bacteria more (n= 13) or more than 2
195 (n=6). Eighteen belonged to classical pathogens. The Unyvero ITI® PCR increases the
196 sensitivity of the culture to 15.8%.

197

198 *Detection of antimicrobial resistance*

199 The Unyvero ITI® technology is capable of detecting 19 antibiotic resistance markers. We
200 therefore focused our analysis to Extended Spectrum β -Lactamases (ESBL), carbapenemases
201 and presumptive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), as these resistances
202 are clinically significant.

203 Although no strain presented ESBL or carbapenemases phenotypes in culture, the *bla*CTX-M
204 and the *bla*OXA-23 genes were detected by the ITI® Unyvero PCR. These results were
205 confirmed by specific PCR. The two isolates corresponded to *E. coli* and *A. baumannii*,
206 respectively. In each case, the follow-up of the DFOM at 1 month showed a poorer clinical
207 state.

208 Six samples were positive in culture: 2 MRSA and 4 meticillino-resistant coagulase negative
209 staphylococci strains. The *mecA* genes were detected by Unyvero ITI® PCR in 4 isolates
210 (66.7%). We noted that the 2 coagulase-negative staphylococci isolates not detected by ITI®
211 PCR corresponded to negative samples for this system (Table 4).

212

213 **Discussion**

214 Our present evaluation of the Unyvero ITI® PCR assessed for the first time to our knowledge
215 the potential of identification of bacterial species and some resistance genes of
216 microorganisms involved in DFI and DFOM. The diagnosis of these infections is based on the
217 conventional culture of specimens from bone biopsies performed either in the operating room
218 by a surgeon or by percutaneous puncture, or tissue biopsies performed at the patient's
219 bedside after complete debridement of the wound to limit the risk of contamination by skin
220 commensal microbiota [9]. The culture has limited sensitivity, particularly when the biofilm,
221 very common in this type of wound, is present or when patients have already received
222 antimicrobial treatment [13,21]. Classically in DFOM, this documentation needs 2 weeks of
223 antibiotic therapy washout and a 2 week period of culture, making the diagnosis of DFOM
224 particularly long. To decrease this delay, molecular microbiology techniques begin to emerge
225 mainly based on amplification and sequence analysis of 16S rRNA (e.g. pyrosequencing) or
226 on multitarget PCRs (e.g. technologies developed by Mobidiag™, Curetis™) [10]. These
227 tests provide identification and antibiotic resistance markers within hours, whereas results of
228 conventional microbiology culture are not available for at least 24 to 48 hours for
229 identification and 48 to 72 hours for antibiotic resistance testing, reducing the time to
230 initiation of appropriate antibiotic therapy. Here, we observed that the Unyvero ITI® PCR
231 presents a concordance rate of 66.7% compared to conventional culture even though the panel
232 of pathogens was not specific to all the pathogens identified in this clinical situation. This rate
233 reached 80.8% if we focused on microorganisms in the panel of the PCR. Interestingly, 18 out

234 of 31 microorganisms of the panel corresponded to commensal microflora with low virulence
235 potential (e.g. coagulase negative staphylococci, α -hemolytic *Streptococcus*, *Corynebacteria*).
236 Therefore, the Unyvero ITI® system accurately identified the main pathogens involved in
237 DFOM. Moreover, as the result is reported in approximately 5 hours (with a limited technical
238 time), it shows a clear advantage compared to routine laboratory procedures and it is the only
239 rapid solution available to date. Finally, Unyvero ITI® technology makes it possible to study
240 different types of samples such as tissues, liquids, and even bone samples, which is essential
241 given the diversity of DFI samples received in the laboratory.

242 If we excluded the microorganisms not included in the panel, the highest number of
243 discrepancies of the Unyvero ITI® occurred for *P. mirabilis* (4 out of 8 not detected),
244 *S. aureus* (7 out of 36), *E. faecalis* and *C. koseri* (2 out of 7) (Table 2). For *S. aureus*,
245 *E. faecalis* and *C. koseri*, all the isolates presented an inoculum effect because these bacteria
246 had less than 5 colonies on culture media. Moreover, using 16S rDNA PCR, the threshold
247 cycle (Ct) obtained for the detection of these bacteria were > 35 cycles, suggesting a low
248 amount of DNA material. Conversely this effect was not observed for *P. mirabilis* where all
249 the bacteria had more than 50 colonies on the media and a Ct between 20 and 30. The
250 difficulties to detect *P. mirabilis* could represent a gap in DFI and DFOM diagnosis.
251 However, its prevalence varied considerably between the regions of the world [22-25]. In our
252 study, in 3 cases of an absence of *P. mirabilis* detection, the PCR results were negative while
253 mono- or polymicrobial infections were detected (Table 4). In the last case, only *S. aureus*
254 was detected. However, in 3 out of 4 patients, the antibiotic treatment targeted the pathogen
255 and an improvement of the wound was observed at 1 month (Table 4). In the last case, an
256 amputation of the hallux was needed, but this amputation was performed at admission of the
257 patient initial and no antibiotic was done.

258 Finally, we noted that the Unyvero ITI® PCR allows the detection of 15% of microorganisms
259 not detected by conventional culture. The interest of 16S rDNA in bone infections has been

260 previously noted [26]. Our work shows the advantage of this approach even if no bacteria
261 were detected by PCR on culture negative samples.

262

263 The second interesting point raised by this study is the description of the DFOM ecology. Our
264 biopsies showed a polymicrobial situation, a result previously confirmed by pyrosequencing
265 [6]. Staphylococci represent by far the most common origin of these infections, as previously
266 observed [25]. Interestingly, we noted the very low rate of MRSA (2/36, 5.5%) confirming
267 the importance of debridement which causes excision of necrotic soft tissues, devitalized and
268 contaminated tissues, a clear niche of some multidrug resistant bacteria [9]. One other
269 important point noted in our study is the importance of anaerobes (16.5%). Synergistic actions
270 between bacteria can increase the pathogenic potential of the entity. For instance, facultative
271 anaerobes will consume oxygen and allow growth of anaerobes frequently isolated from these
272 infections [6]. Thus these bacteria play a clear pathogenic role in DFI [27,28]. In bone, these
273 bacteria find an environment particularly adapted for their development. Their frequent
274 presence in DFOM indicates that the preanalytic management of these infections is crucial
275 (e.g. correct handling of the sample with a quick transport to the lab and immediate
276 inoculation on reduced blood agar plates). Indeed, the anaerobes are clearly difficult to
277 cultivate. A thorough control of sampling, transport, inoculation and use of reduced culture
278 media for the identification of these bacteria will allow the recovery of various types of
279 bacteria [29,30]. Here, the Unyvero ITI® system is of interest because this PCR detects the
280 main anaerobes isolated in DFI and is more efficient than the culture (Table 2). In this way,
281 we identified for the first time to our knowledge the infection due to *Granulicatella adiacens*,
282 an anaerobic Gram-positive cocci present in the normal flora of human mouth, genital and
283 intestinal tracts and previously identified in endocarditis, osteomyelitis, arthritis, sepsis,
284 implant, or prosthesis-associated infections. There are serious diagnostic difficulties to
285 identify these bacteria because they are difficult to culture and show non-specific colony

286 morphology. They need cysteine and pyridoxine to grow. Even though Schaedler contains L-
287 cysteine, some strains need additional nutrients not available in routine culture media
288 [31,32]. The combination of culture and PCR seems necessary to identify all types of present
289 bacteria in order to optimize antibiotic treatment.

290

291 Early susceptibility results are crucial for the initiation of appropriate antimicrobial
292 therapy for DFI patients, including those in settings challenged by MDR bacteria. Moreover,
293 it is also known that DFI are responsible for significant morbidity and mortality and their
294 number continues to increase [2]. To date, no tool gives a fast identification and an orientation
295 of the resistance profile in less than 5 hours direct from specimens such as positive bone or
296 tissue cultures. Four recent studies by Borde *et al.* [33], Hischebeth *et al.* [34], Malandain *et*
297 *al.* [35] and Villa F *et al.* [36], have demonstrated the performance of the Unyvero ITI®
298 system in a routine diagnostic setting of prosthetic and joint infections. However, as the
299 majority of infections were monomicrobial, these studies have not challenged the instrument
300 for a polymicrobial diagnosis. In this study, we demonstrated an interesting performance of
301 this new technology in DFI. Although routine culture is essential in chronic deep infections,
302 this PCR system may enable clinicians to adjust antimicrobial treatment earlier to facilitate
303 patient management and outcomes as well as antimicrobial stewardship.

304

305 **Acknowledgments**

306 The authors thank all the patients for acceptance to be included into this study.

307 This manuscript will be presented in the 28th ECCMID (April, 2018), Madrid, Spain.

308 We are grateful to the Curetis Company for providing the devices. They played no role in the
309 study design, data collection and analysis, and decision to publish.

310

311 **Funding**

312 This work was supported by the National Institute of Health and Medical Research
313 (INSERM) and the University Hospital of Nîmes.

314

315 **Transparency declaration**

316 All authors have nothing to declare.

317

318 **References**

- 319 1. Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. The global burden of
320 diabetic foot disease. *Lancet* 2005;336:1719-24.
- 321 2. Pereira SG, Moura J, Carvalho E, Empadinhas N. Microbiota of chronic diabetic Wounds:
322 Ecology, impact, and potential for innovative treatment strategies. *Front Microbiol*
323 2017;8:1791.
- 324 3. Bakker K, Apelqvist J, Lipsky BA, Van Netten JJ; International Working Group on the
325 Diabetic Foot. The 2015 IWGDF guidance documents on prevention and management of
326 foot problems in diabetes: development of an evidence-based global consensus. *Diabetes*
327 *Metab Res Rev* 2016;32:2-6.
- 328 4. Lipsky BA, Peters EJ, Senneville E, Berendt AR, Embil JM, Lavery LA, Urbancic-Rovan
329 V, Jeffcoate WJ. Expert opinion on the management of infections in the diabetic foot.
330 *Diabetes Metab Res Rev* 2012;28:163-78 .
- 331 5. Fosse-Edorh S, Mandereau-Bruno L, Regnault N. [Le poids des complications liées au
332 diabète en France en 2013. Synthèse et perspectives]. *Bull Epidemiol Hebd* 2015;34-
333 35:619-25.
- 334 6. van Asten SA, La Fontaine J, Peters EJ, Bhavan K, Kim PJ, Lavery LA. The microbiome
335 of diabetic foot osteomyelitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016;35:293-8.
- 336 7. Boulton AJM, Kirsner RS, Vileikyte L. Neuropathic Diabetic Foot Ulcers. *N Engl J Med*
337 2004;351:48–55.
- 338 8. Lavery LA, Fontaine JL, Bhavan K, Kim PJ, Williams JR, Hunt NA. Risk factors for
339 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in diabetic foot infections. *Diabet Foot Ankle*
340 2014;5.
- 341 9. Lavigne JP, Sotto A. Microbial management of diabetic foot osteomyelitis. *Future*
342 *Microbiol* 2017;12:1243-6.
- 343 10. Lavigne JP, Sotto A, Dunyach-Remy C, Lipsky BA. New Molecular Techniques to Study
344 the Skin Microbiota of Diabetic Foot Ulcers. *Adv Wound Care (New Rochelle)*.
345 2015;4:38-49.
- 346 11. Bakker K, Apelqvist J, Lipsky BA, Van Netten JJ; International Working Group on the
347 Diabetic Foot. The 2015 IWGDF guidance documents on prevention and management of
348 foot problems in diabetes: development of an evidence-based global consensus. *Diabetes*
349 *Metab Res Rev* 2016;32:2-6.
- 350 12. Lipsky BA & International consensus group on diagnosing and treating the infected
351 diabetic foot. A report from the international consensus on diagnosing and treating the

- 352 infected diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev* 2004;20:S68-77.
- 353 13. Senneville E, Melliez H, Beltrand E, Legout L, Valette M, Cazaubiel M, Cordonnier M,
354 Caillaux M, Yazdanpanah Y, Mouton Y. Culture of percutaneous bone biopsy specimens
355 for diagnosis of diabetic foot osteomyelitis: concordance with ulcer swab cultures. *Clin*
356 *Infect Dis* 2006;42:57-62.
- 357 14. Dryden M, Lavigne JP. Diabetic foot infection. In: EMCM, European Manuel of Clinical
358 Microbiology, ESCMID-SFM Ed. Paris; 2012, 1st edition ; 31 : 235-240.
- 359 15. Dunyach-Remy C, Cadière A, Richard JL, Schuldiner S, Bayle S, Roig B, Sotto A,
360 Lavigne JP. Denatured gradient gel electrophoresis: a promising tool to diagnose bacterial
361 infections in diabetic foot ulcers. *Diabet Metabolism* 2014;40:476-80.
- 362 16. Pitout JD, Hanson ND, Church DL, Laupland KB. Population-based laboratory
363 surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum beta-lactamases:
364 importance of community isolates with *bla*CTX-M genes. *Clin Infect Dis* 2004;38:1736-
365 41.
- 366 17. Kim J, Lim YM, Jeong YS, Seol SY. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14
367 and CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates
368 in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1572-5.
- 369 18. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired
370 carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:119-23.
- 371 19. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG,
372 Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in
373 *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006;27:351-3.
- 374 20. Boye K, Bartels MD, Andersen IS, Møller JA, Westh H. A new multiplex PCR for easy
375 screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I-V. *Clin*
376 *Microbiol Infect* 2007;13:725-7.
- 377 21. James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini Ed, Secor P, Sestrich J, Costerton JW, Stewart
378 PS. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008;16:37-44.
- 379 22. Dowd SE, Wolcott RD, Sun Y, McKeehan T, Smith E, Rhoads D. Polymicrobial nature of
380 chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX
381 amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *PLoS One* 2008;3:e3326.
- 382 23. Senneville E, Morant H, Descamps D, Dekeyser S, Beltrand E, Singer B, Caillaux M,
383 Boulogne A, Legout L, Lemaire X, Lemaire C, Yazdanpanah Y. Needle puncture and

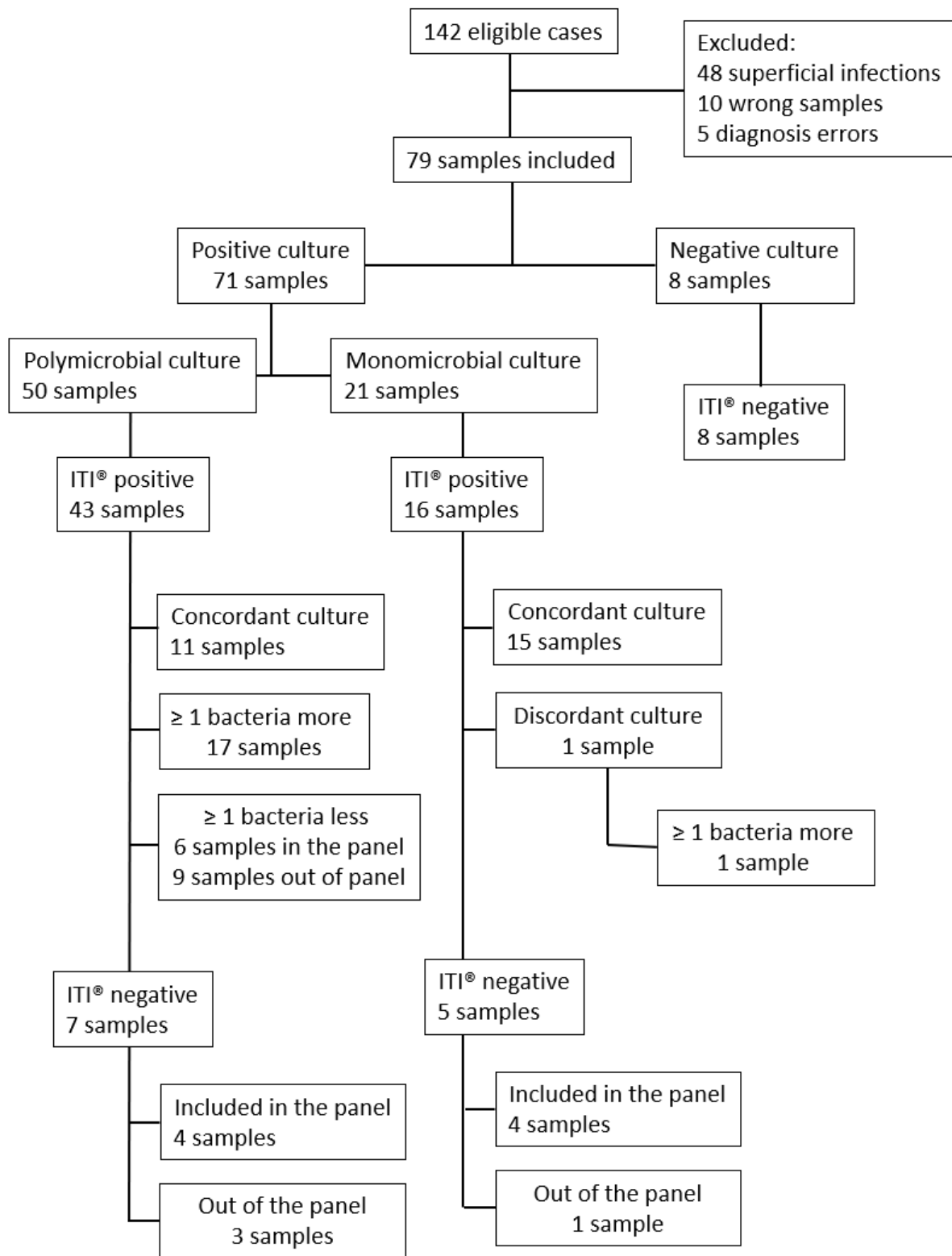
- 384 transcutaneous bone biopsy cultures are inconsistent in patients with diabetes and
385 suspected osteomyelitis of the foot. Clin Infect Dis 2009;48:888-93.
- 386 24. Hatipoglu M, Mutluoglu M, Turhan V, Uzun G, Lipsky BA; Turk-DAY Study Group.
387 Causative pathogens and antibiotic resistance in diabetic foot infections: A prospective
388 multi-center study. J Diabetes Complications 2016;30:910-6.
- 389 25. Dunyach-Remy C, Ngba Essebe C, Sotto A, Lavigne JP. *Staphylococcus aureus* toxins
390 and diabetic foot ulcers: Role in pathogenesis and interest in diagnosis. Toxins (Basel)
391 2016;8:pii: E209.
- 392 26. Levy PY, Fournier PE, Fenollar F, Raoult D. Systematic PCR detection in culture-
393 negative osteoarticular infections. Am J Med 2013;126:1143.e25-33.
- 394 27. Stappers MH, Hagen F, Reimnitz P, Mouton JW, Meis JF, Gyssens IC. *Bacteroides*
395 *fragilis* in biopsies of patients with major abscesses and diabetic foot infections: direct
396 molecular versus culture-based detection. Diagn Microbiol Infect Dis 2016;85:263-5.
- 397 28. Charles PG, Uçkay I, Kressmann B, Emonet S, Lipsky BA. The role of anaerobes in
398 diabetic foot infections. Anaerobe 2015;34:8–13.
- 399 29. Citron DM, Goldstein EJ, Merriam CV, Lipsky BA, Abramson MA. Bacteriology of
400 moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. J
401 Clin Microbiol 2007;45:2819-28.
- 402 30. Abdulrazak A, Bitar ZI, Al-Shamali AA, Mobasher LA. Bacteriological study of diabetic
403 foot infections. J Diabetes Complications 2005;19:138-41.
- 404 31. Quénard F, Seng P, Lagier JC, Fenollar F, Stein A. Prosthetic joint infection caused by
405 *Granulicatella adiacens*: a case series and review of literature. BMC Musculoskelet
406 Disord 2017;18:276.
- 407 32. Jones BM, Hersey RM, Trestman IJ, Bland CM. Successful treatment of a penicillin-
408 intermediate and ceftriaxone-resistant *Granulicatella adiacens* presumed prosthetic valve
409 endocarditis with vancomycin. Int J Antimicrob Agents 2018 Jan 9. doi:
410 10.1016/j.ijantimicag.2017.12.031.
- 411 33. Borde JP, Häcker GA, Guschl S, Serr A, Danner T, Hübner J, Burrack-Lange S, Lüdke G,
412 Helwig P, Hauschild O, Kern WV. Diagnosis of prosthetic joint infections using UMD-
413 Universal Kit and the automated multiplex-PCR Unyvero i60 ITI® cartridge system: a
414 pilot study. Infection. 2015;43:551-60.
- 415 34. Hischebeth GT, Randau TM, Buhr JK, Wimmer MD, Hoerauf A, Molitor E, Bekeredjian-
416 Ding I, Gravius S. Unyvero i60 implant and tissue infection (ITI) multiplex PCR system
417 in diagnosing periprosthetic joint infection. J Microbiol Methods 2016;121:27-32.

- 418 35. Malandain D, Bémer P, Leroy AG, Léger J, Plouzeau C, Valentin AS, Jolivet-Gougeon A,
419 Tandé D, Héry-Arnaud G, Lemarié C, Kempf M, Bret L, Burucoa C, Corvec S; Centre de
420 Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest (CRIOGO) Study Team.
421 Assessment of the automated multiplex-PCR Unyvero i60 ITI® cartridge system to
422 diagnose prosthetic joint infection: a multicentre study. *Clin Microbiol Infect*
423 2018;24:83.e1-83.e6.
- 424 36. Villa F, Toscano M, De Vecchi E, Bortolin M, Drago L. Reliability of a multiplex PCR
425 system for diagnosis of early and late prosthetic joint infections before and after broth
426 enrichment. *Int J Med Microbiol* 2017;307:363-70.

427

428 **Figure Legend**

Figure 1. Flow chart of the multiplex PCR results according to the culture results.



429

430 **Table 1.** Demographic and clinical characteristics of the study patients

Characteristics	Total
Number of patients (total n)	79
Median Age (range) (years)	69.8 (31-94)
Male/female, n (%)	62 (78.4)/ 17 (21.6)
Type 1/type 2 diabetes mellitus	5 (8.9)/72 (91.1)
Diabetes duration (years)	17.9 ±14.3
HbA _{1c} (%), mean	8.13 ±2.03
Cardiovascular disease	
Absence	22 (27.8)
Coronary heart disease 1	24 (30.4)
Peripheral arterial disease	57 (72.2)
Neuropathy	22 (27.8)
Absence	9 (11.4)
Sensitive	70 (88.6)
Vegetative	37 (46.8)
Nephropathy ^a	
Absence	21 (26.6)
Microalbuminuria	22 (27.8)
Proteinuria	12 (15.2)
Renal failure	24 (30.4)
Diabetic retinopathy	
Absence	35 (44.3)
Non-proliferative diabetic retinopathy	36 (45.6)
Proliferative diabetic retinopathy	8 (10.1)
Previous hospitalization < 1 year	27 (34.2)
Previous antibiotics < 1 month	25 (31.6)
Comorbidities	
Hypertension	21 (26.6)
Obesity	55 (69.6)
Sedentary	41 (51.9)
Dyslipidemia	49 (62.0)
History of ulcers	31 (39.2)
History of lower limb amputation	15 (19.0)
Minor/Major	14 (93) / 1 (7)
Osteomyelitis	65 (82.3)
Samples	
Bone biopsy	65 (82.3)
Tissue biopsy	14 (17.7)
IDSA/IWGDF infection classification	
Grade 3 (moderate)	75 (94.9)
Grade 4 (severe)	4 (5.1)

431 HbA_{1c}: glycated hemoglobin; IWGDF: International Working Group of the Diabetic Foot; IDSA: Infectious

432 Diseases Society of America

433 Values are median and interquartile ranges (25th to 75th percentile) or numbers and percentages

434 ^aFor nephropathy, we used ADA criteria: microalbuminuria and macroalbuminuria were defined by urinary

435 albumin excretion between 30 and 299 mg/24 h and in excess of 300 mg/24 h, respectively; renal failure was

436 diagnosed if creatinine clearance was lower than 60 ml/min, using Cockcroft and Gault formula.

437

438 **Table 2.** Repartition of bacterial species found by culture and/or ITI® Unyvero PCR system.

	Species ^a	Ecology obtained for:		Discordance according to:	
		Culture	ITI®	Culture	ITI®*
Gram positive cocci	<i>S. aureus</i>	34	29	7	2
	<i>S. lugdunensis</i>	7	3	4	0
	<i>S. epidermidis</i>	5	4	1	0
	<i>S. capitis</i>	3	2	1	0
	Other CNS in the panel	9	15	0	6
	Other CNS out of panel ^b	4	0	4	0
	<i>S. agalactiae</i>	6	8	0	2
	<i>Streptococcus</i> sp.	4	5	0	1
	<i>S. constellatus</i>	2	1	1	0
	<i>E. faecalis</i>	5	5	2	2
	<i>Enterococcus</i> sp.	1	2	0	1
	<i>E. avium</i>	1	0	1	0
Gram positive bacilli	<i>C. amycolatum</i>	2	0	2	0
	<i>C. jeikeium</i>	2	1	1	0
	<i>C. aurimucosum</i>	1	0	1	0
	<i>Corynebacterium</i> sp.	5	7	0	2
	<i>Coyrenbacterium</i> out of panel ^c	5	0	5	0
	<i>D. hominis</i>	4	0	4	0
Gram negative bacilli	<i>P. mirabilis</i>	8	4	4	0
	<i>Proteus</i> sp.	2	2	0	0
	<i>E. coli</i>	7	7	0	0
	<i>C. koseri</i>	7	5	2	0
	<i>E. cloacae</i>	7	8	0	1
	<i>K. oxytoca</i>	2	2	0	0
	<i>K. pneumoniae</i>	1	0	1	0
	<i>M. morgani</i>	6	0	6	0
	<i>H. alvei</i>	1	0	1	0
	<i>P. aeruginosa</i>	6	7	0	1
	<i>A. baumannii</i>	1	2	0	1
	<i>H. parainfluenzae</i>	1	0	1	0
Anaerobes	<i>F. magna</i>	15	14	2	1
	<i>B. fragilis</i>	5	6	0	1
	<i>P. acnes</i>	0	5	0	5
	<i>Granulicatella adiacens</i>	0	1	0	1
	Other anaerobes ^d	5	0	5	0
	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	2	0	2	0
	<i>Truperella bernadiae</i>	1	0	1	0
Fungi	<i>Candida</i> sp.	0	1	0	1
Total		177	146	59	28

439 ^a,Bold: microorganisms included in the ITI® Unyvero Panel; ^b, CNS, Coagulase-negative staphylococci not
440 included in the Unyvero panel (*S. simulans*, *S. pettenkoferi*, *S. caprae*); ^c, *Coyrenbacterium* sp. out of panel (*C.*
441 *pseudodiphtheriae*, *C. striatum*, *C. xerosis*); ^d, Other anaerobes out of panel (*Prevotella* sp., *Clostridia*,
442 *Fusobacterium* sp.) ; *, all these results were confirmed by additional molecular analyses.

443 **Table 3.** Evaluation of Unyvero ITI® assays according to the Gold standard (bacterial
 444 culture)
 445

	Conventional Culture		
	Positive	Negative	Total
ITI® PCR Positive	118	28	146
ITI® PCR Negative	59	1533	1592
Total	177	1561	1738

446 Data are n. Sensitivity, 0.667; Specificity, 0.982, positive predictive value, 0.808; negative predictive value,
 447 0.963; Accuracy, 0.950.

Table 4. Results for the 12 patients with positive culture samples and negative ITI® PCR.

Patient	Samples ^a	Culture result ^b	No. of colonies	Delay of growth	ITI results	Antibiotic prescribed	Follow-up at 1 month
9	TB	<i>S. aureus</i>	<5	2 days	Negative	Amox/clavulanate	Amputation
14	BB	<i>S. lugdunensis</i>	5-50	3 days	Negative	No	Healing
20	BB	<i>C. amycolatum</i>	5-50				
		<i>S. lugdunensis</i>	<5	3 days	Negative	Ofloxacin/rifadine	Amputation
		CNS ^{c,d}	<5				
23	BB	<i>M. morgani</i>	<5	2 days	Negative	Ofloxacin/rifadine	Improvement
		<i>S. capitis</i>	5-50				
24	BB	<i>S. aureus</i>	<5	4 days	Negative	Ofloxacin/rifadine	Improvement
		<i>S. lugdunensis</i> ^d	<5				
		<i>S. constellatus</i>	5-50				
		<i>Corynebacterium</i> sp.	5-50				
25	BB	<i>C. striatum</i>	>50	7 days	Negative	Cotrimoxazole/rifadine	Amputation
		<i>Dermobacter hominis</i>	5-50				
		<i>Prevotella</i> sp.	<5				
32	BB	<i>S. aureus</i>	<5	3 days	Negative	No	Amputation
		<i>P. mirabilis</i>	5-50				
		<i>M. morgani</i>	>50				
		<i>E. faecalis</i>	<5				
52	BB	<i>S. aureus</i>	<5	2 days	Negative	Ofloxacin/rifadine	Improvement
		<i>P. mirabilis</i>	5-50				
		<i>M. morgani</i>	5-50				
		<i>C. striatum</i>	5-50				
55	TB	<i>S. caprae</i>	<5	5 days	Negative	No	Healing
56	BB	<i>P. mirabilis</i>	>50	5 days	Negative	Ofloxacin/rifadine	Healing
64	BB	<i>S. lugdunensis</i>	<5	2 days	Negative	Cotrimoxazole/rifadine	Healing
70	BB	<i>S. aureus</i>	<5	1 day	Negative	Amoxicillin	Amputation

^a, BB, bone biopsy – TB, Tissue biopsy; ^b, Bold: microorganisms included in the ITI® Unyvero Panel; ^c, CNS, Coagulase-negative staphylococci not included in the Unyvero panel (*S. simulans*, *S. pettenkoferi*, *S. caprae*); ^d, this isolate was methicillin-resistant.

Conclusion

Les infections du pied chez les patients diabétiques, sont une complication grave et fréquente, conduisant à une mortalité et à une morbidité élevées. Leur diagnostic est souvent difficile et est basé sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques mais aussi microbiologiques. Leur prise en charge demeure complexe et nécessite une approche pluridisciplinaire (21). Depuis quelques années de nouveaux outils innovants apparaissent sur le marché, permettant de détecter un large panel d'agents pathogènes et de résistances aux antibiotiques en quelques heures directement à partir d'échantillons cliniques.

Cette étude est la première évaluant le potentiel d'identification d'espèces bactériennes et de détection de certains gènes de résistance de l'Unyvero® ITI technology sur les IPD et les ostéites du pied chez le diabétique.

La simplicité d'utilisation de cet automate, ses bonnes performances et la possibilité d'étudier différents types d'échantillons (liquides, tissulaires, osseux) en font un outil intéressant dans le diagnostic des IDP et des ostéites du pied chez le diabétique. En effet le résultat apporté en 5h environ présente un net avantage par rapport aux techniques habituelles utilisées au laboratoire de microbiologie. Le système Unyvero® ITI a démontré sa bonne capacité à identifier les micro-organismes et leurs marqueurs de résistance. De plus, son aptitude à détecter les principales bactéries anaérobies impliquées dans l'IPD était supérieure aux performances de la culture traditionnelle. Cependant au cours de cette étude nous avons pu mettre en évidence certaines faiblesses de la technique notamment dans la détection des bactéries lorsque l'inoculum bactérien était faible y compris pour les bactéries pathogènes. L'association de la culture et de la PCR semble importante dans le but d'identifier toutes les espèces bactériennes présentes au niveau de l'ulcère infecté afin d'optimiser l'antibiothérapie.

Néanmoins le coût de cette technologie reste élevé, et représente un facteur limitant à son utilisation en systématique. Il conviendra donc de définir la place du test au laboratoire.

L'utilisation d'une technologie comme l'Unyvero® ITI technology, pourrait améliorer la prise en charge des ostéites chez le patient diabétique car ce système permet un gain de temps essentiel dans la mise en place d'un traitement antibiotique précoce et adapté afin de limiter un risque d'évolution défavorable. A l'heure actuelle il s'agit de la seule technologie

disponible sur le marché permettant un diagnostic rapide et fiable des ostéites du pied chez le patient diabétique directement à partir des échantillons cliniques.

Bibliographie

1. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA*. 2005 Jan 12;293(2):217–28.
2. Prompers L, Huijberts M, Schaper N, Apelqvist J, Bakker K, Edmonds M, et al. Resource utilisation and costs associated with the treatment of diabetic foot ulcers. Prospective data from the Eurodiale Study. *Diabetologia*. 2008 Oct;51(10):1826–34.
3. Goldenberg R, Punthakee Z. Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. *Can J Diabetes*. 2013 Apr;37 Suppl 1:S8-11.
4. American Diabetes Association. Executive summary: Standards of medical care in diabetes-2012. *Diabetes Care*. 2012 Jan;35 Suppl 1:S4–10.
5. Drouin P, Blicke JF, Charbonnel B, Eschwege E, Guillausseau PJ, Plouin PF, et al. [Diagnosis and classification of diabetes mellitus: the new criteria]. *Diabetes Metab*. 1999 Mar;25(1):72–83.
6. Effects of diabetes definition on global surveillance of diabetes prevalence and diagnosis: a pooled analysis of 96 population-based studies with 331,288 participants. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015 Aug;3(8):624–37.
7. Fagot-Campagna A, Fosse S, Roudier C, Romon I. Caractéristiques, risque vasculaire et complications chez les personnes diabétiques en France métropolitaine : d’importantes évolutions entre Entred 2001 et Entred 2007. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 3, 624–637 (2015).
8. Abdulrazak A, Bitar ZI, Al-Shamali AA, Mobasher LA. Bacteriological study of diabetic foot infections. *J Diabetes Complications*. 2005 Jun;19(3):138–41.
9. Jeffcoate WJ, Harding KG. Diabetic foot ulcers. *The Lancet*. 2003 May 3;361(9368):1545–51.
10. Boulton AJM. The diabetic foot: grand overview, epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008 Jun;24 Suppl 1:S3-6.
11. Senneville E, Brière M, Neut C, Messad N, Lina G, Richard J-L, et al. First report of the predominance of clonal complex 398 *Staphylococcus aureus* strains in osteomyelitis complicating diabetic foot ulcers: a national French study. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Apr;20(4):O274-277.
12. Sotto A, Richard J-L, Jourdan N, Combescure C, Bouziges N, Lavigne J-P, et al. Miniaturized oligonucleotide arrays: a new tool for discriminating colonization from infection due to *Staphylococcus aureus* in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*. 2007 Aug;30(8):2051–6.
13. Prise en charge du pied diabétique infecté. Texte court. *Médecine Mal Infect*. 2007

Jan;37(1):1–13.

14. Société de pathologie infectieuse de langue française. Recommandations pour la pratique clinique. Prise en charge du pied diabétique infecté. *Méd Mal Infect* 2007;37:26-50.
15. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Apr;14(2):244–69.
16. Raymakers JT, Houben AJ, van der Heyden JJ, Tordoir JH, Kitslaar PJ, Schaper NC. The effect of diabetes and severe ischaemia on the penetration of ceftazidime into tissues of the limb. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* 2001 Mar;18(3):229–34.
17. Richard J-L, Schuldiner S. [Epidemiology of diabetic foot problems]. *Rev Med Interne.* 2008 Sep;29 Suppl 2:S222-230.
18. Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999 Dec;26(3–4):259–65.
19. Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* 1997 Jan;14(1):29–34.
20. Senneville E. [Infection and diabetic foot]. *Rev Med Interne.* 2008 Sep;29 Suppl 2:S243-248.
21. Lavigne J-P, Dunyach-Remy C, Sotto A. Ostéite du pied diabétique. *Rev Francoph Lab.* 2016 Mar;2016(480):55–60.
22. Diabetic Foot Infections: Current Diagnosis and Treatment “ *Journal of Diabetic Foot Complications.*”
23. Rauwerda JA. Foot debridement: anatomic knowledge is mandatory. *Diabetes Metab Res Rev.* 2000 Oct;16 Suppl 1:S23-26.
24. Lipsky BA, Berendt AR, Embil J, De Lalla F. Diagnosing and treating diabetic foot infections. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004 Jun;20 Suppl 1:S56-64.
25. Jeffcoate WJ, Macfarlane RM, Fletcher EM. The description and classification of diabetic foot lesions. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* 1993 Sep;10(7):676–9.
26. Lavery LA, Armstrong DG, Harkless LB. Classification of diabetic foot wounds. *J Foot Ankle Surg Off Publ Am Coll Foot Ankle Surg.* 1996 Dec;35(6):528–31.
27. Oyibo SO, Jude EB, Tarawneh I, Nguyen HC, Harkless LB, Boulton AJ. A comparison of two diabetic foot ulcer classification systems: the Wagner and the University of Texas wound classification systems. *Diabetes Care.* 2001 Jan;24(1):84–8.
28. 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 Off Publ Infect Dis Soc Am. 2007 Feb 15;44(4):562–5.

29. Lipsky BA, Berendt AR, Deery HG, Embil JM, Joseph WS, Karchmer AW, et al. Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Jun;117(7 Suppl):212S–238S.
30. Jeffcoate WJ, Lipsky BA, Berendt AR, Cavanagh PR, Bus SA, Peters EJG, et al. Unresolved issues in the management of ulcers of the foot in diabetes. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2008 Dec;25(12):1380–9.
31. Lipsky BA, International consensus group on diagnosing and treating the infected diabetic foot. A report from the international consensus on diagnosing and treating the infected diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev*. 2004 Jun;20 Suppl 1:S68-77.
32. Richard J-L, Lavigne J-P, Got I, Hartemann A, Malgrange D, Tsirtsikolou D, et al. Management of patients hospitalized for diabetic foot infection: results of the French OPIDIA study. *Diabetes Metab*. 2011 Jun;37(3):208–15.
33. Citron DM, Goldstein EJC, Merriam CV, Lipsky BA, Abramson MA. Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. *J Clin Microbiol*. 2007 Sep;45(9):2819–28.
34. Slater RA, Lazarovitch T, Boldur I, Ramot Y, Buchs A, Weiss M, et al. Swab cultures accurately identify bacterial pathogens in diabetic foot wounds not involving bone. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2004 Jul;21(7):705–9.
35. Cavanagh PR, Lipsky BA, Bradbury AW, Botek G. Treatment for diabetic foot ulcers. *Lancet Lond Engl*. 2005 Nov 12;366(9498):1725–35.
36. Williams DT, Hilton JR, Harding KG. Diagnosing foot infection in diabetes. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2004 Aug 1;39 Suppl 2:S83-86.
37. Sapico FL, Canawati HN, Witte JL, Montgomerie JZ, Wagner FW, Bessman AN. Quantitative aerobic and anaerobic bacteriology of infected diabetic feet. *J Clin Microbiol*. 1980 Sep;12(3):413–20.
38. Sapico FL, Witte JL, Canawati HN, Montgomerie JZ, Bessman AN. The infected foot of the diabetic patient: quantitative microbiology and analysis of clinical features. *Rev Infect Dis*. 1984 Apr;6 Suppl 1:S171-176.
39. Lipsky BA. Osteomyelitis of the foot in diabetic patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1997 Dec;25(6):1318–26.
40. Frykberg RG, Armstrong DG, Giurini J, Edwards A, Kravette M, Kravitz S, et al. Diabetic foot disorders: a clinical practice guideline. American College of Foot and Ankle Surgeons. *J Foot Ankle Surg Off Publ Am Coll Foot Ankle Surg*. 2000;39(5 Suppl):S1-60.

41. American Diabetes Association. Consensus Development Conference on Diabetic Foot Wound Care: 7-8 April 1999, Boston, Massachusetts. American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 1999 Aug;22(8):1354–60.
42. Gerding DN. Foot infections in diabetic patients: the role of anaerobes. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1995 Jun;20 Suppl 2:S283-288.
43. Johnson S, Lebahn F, Peterson LR, Gerding DN. Use of an anaerobic collection and transport swab device to recover anaerobic bacteria from infected foot ulcers in diabetics. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1995 Jun;20 Suppl 2:S289-290.
44. Lavigne J-P, Richard J-L, Sotto A. Nouvelles avancées dans les infections des plaies du pied chez le patient diabétique. *Rev Francoph Lab*. 2011 Jul;2011(434):57–64.
45. Jones EW, Edwards R, Finch R, Jeffcoate WJ. A microbiological study of diabetic foot lesions. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 1985 May;2(3):213–5.
46. Abdulrazak A, Bitar ZI, Al-Shamali AA, Mobasher LA. Bacteriological study of diabetic foot infections. *J Diabetes Complications*. 2005 Jun;19(3):138–41.
47. Ge Y, MacDonald D, Hait H, Lipsky B, Zasloff M, Holroyd K. Microbiological profile of infected diabetic foot ulcers. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2002 Dec;19(12):1032–4.
48. Lipsky BA, Armstrong DG, Citron DM, Tice AD, Morgenstern DE, Abramson MA. Ertapenem versus piperacillin/tazobactam for diabetic foot infections (SIDESTEP): prospective, randomised, controlled, double-blinded, multicentre trial. *Lancet Lond Engl*. 2005 Nov 12;366(9498):1695–703.
49. Gerding DN. Foot infections in diabetic patients: the role of anaerobes. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1995 Jun;20 Suppl 2:S283-288.
50. Ng LSY, Kwang LL, Yeow SCS, Tan TY. Anaerobic culture of diabetic foot infections: organisms and antimicrobial susceptibilities. *Ann Acad Med Singapore*. 2008 Nov;37(11):936–9.
51. Charles PGP, Uçkay I, Kressmann B, Emonet S, Lipsky BA. The role of anaerobes in diabetic foot infections. *Anaerobe*. 2015 Aug;34:8–13.
52. Bessman AN, Geiger PJ, Canawati H. Prevalence of Corynebacteria in diabetic foot infections. *Diabetes Care*. 1992 Nov;15(11):1531–3.
53. Zemmouri A, Tarchouli M, Benbouha A, Lamkinsi T, Bensghir M, Elouennass M, et al. [Bacteriological profile of diabetic foot and its impact on the choice of antibiotics]. *Pan Afr Med J*. 2015;20:148.
54. Belefquih B, Frikh M, Benlahlou Y, Maleh A, Jadid L, Bssaibis F, et al. Diabetic Foot

Infection in Morocco: Microbiological Profile. *Wounds Compend Clin Res Pract*. 2016 Mar;28(3):89–98.

55. Lipsky BA, Holroyd KJ, Zasloff M. Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2008 Dec 15;47(12):1537–45.

56. Al Benwan K, Al Mulla A, Rotimi VO. A study of the microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Kuwait. *J Infect Public Health*. 2012 Mar;5(1):1–8.

57. Shankar EM, Mohan V, Premalatha G, Srinivasan RS, Usha AR. Bacterial etiology of diabetic foot infections in South India. *Eur J Intern Med*. 2005 Dec;16(8):567–70.

58. Uçkay I, Gariani K, Pataky Z, Lipsky BA. Diabetic foot infections: state-of-the-art. *Diabetes Obes Metab*. 2014 Apr;16(4):305–16.

59. James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini E deLancey, Secor P, Sestrich J, et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2008 Feb;16(1):37–44.

60. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167–93.

61. Varaiya AY, Dogra JD, Kulkarni MH, Bhalekar PN. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in diabetic foot infections. *Indian J Pathol Microbiol*. 2008 Sep;51(3):370–2.

62. Tentolouris N, Petrikos G, Vallianou N, Zachos C, Daikos GL, Tsapogas P, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in infected and uninfected diabetic foot ulcers. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2006 Feb;12(2):186–9.

63. Tentolouris N, Jude EB, Smirnof I, Knowles EA, Boulton AJ. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an increasing problem in a diabetic foot clinic. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 1999 Sep;16(9):767–71.

64. Dang CN, Prasad YDM, Boulton AJM, Jude EB. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the diabetic foot clinic: a worsening problem. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2003 Feb;20(2):159–61.

65. Richard J-L, Sotto A, Jourdan N, Combescure C, Vannereau D, Rodier M, et al. Risk factors and healing impact of multidrug-resistant bacteria in diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab*. 2008 Sep;34(4 Pt 1):363–9.

66. Hartemann-Heurtier A, Robert J, Jacqueminet S, Ha Van G, Golmard JL, Jarlier V, et

- al. Diabetic foot ulcer and multidrug-resistant organisms: risk factors and impact. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* 2004 Jul;21(7):710–5.
67. Lipsky BA, Berendt AR. Principles and practice of antibiotic therapy of diabetic foot infections. *Diabetes Metab Res Rev.* 2000 Oct;16 Suppl 1:S42-46.
68. Shanmugam P, M J, Susan S L. The bacteriology of diabetic foot ulcers, with a special reference to multidrug resistant strains. *J Clin Diagn Res JCDR.* 2013 Mar;7(3):441–5.
69. Giurato L, Meloni M, Izzo V, Uccioli L. Osteomyelitis in diabetic foot: A comprehensive overview. *World J Diabetes.* 2017 Apr 15;8(4):135–42.
70. 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 Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2012 Jun;54(12):e132-173.
71. Lipsky BA, Aragón-Sánchez J, Diggle M, Embil J, Kono S, Lavery L, et al. IWGDF guidance on the diagnosis and management of foot infections in persons with diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2016 Jan;32 Suppl 1:45–74.
72. Hartemann-Heurtier A, Ha Van G, Danan JP, Koskas F, Jacqueminet S, Golmard JL, et al. Outcome of severe diabetic foot ulcers after standardised management in a specialised unit. *Diabetes Metab.* 2002 Dec;28(6 Pt 1):477–84.
73. Senneville E, Melliez H, Beltrand E, Legout L, Valette M, Cazaubiel M, et al. Culture of percutaneous bone biopsy specimens for diagnosis of diabetic foot osteomyelitis: concordance with ulcer swab cultures. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2006 Jan 1;42(1):57–62.
74. Hartemann-Heurtier A, Senneville E. Diabetic foot osteomyelitis. *Diabetes Metab.* 2008 Apr;34(2):87–95.
75. Lipsky BA, International consensus group on diagnosing and treating the infected diabetic foot. A report from the international consensus on diagnosing and treating the infected diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004 Jun;20 Suppl 1:S68-77.
76. Chantelau E, Tanudjaja T, Altenhöfer F, Ersanli Z, Lacigova S, Metzger C. Antibiotic treatment for uncomplicated neuropathic forefoot ulcers in diabetes: a controlled trial. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* 1996 Feb;13(2):156–9.
77. Cutting KF, White RJ. Criteria for identifying wound infection--revisited. *Ostomy Wound Manage.* 2005 Jan;51(1):28–34.
78. Frykberg RG. An evidence-based approach to diabetic foot infections. *Am J Surg.* 2003 Nov 28;186(5A):44S–54S; discussion 61S–64S.

79. Lipsky BA, Polis AB, Lantz KC, Norquist JM, Abramson MA. The value of a wound score for diabetic foot infections in predicting treatment outcome: a prospective analysis from the SIDESTEP trial. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* 2009 Oct;17(5):671–7.
80. Dow G, Browne A, Sibbald RG. Infection in chronic wounds: controversies in diagnosis and treatment. *Ostomy Wound Manage.* 1999 Aug;45(8):23–7, 29-40; quiz 41-42.
81. Lavigne J-P, Richard J-L, Sotto A. Nouvelles avancées dans les infections des plaies du pied chez le patient diabétique.
82. Sotto A, Lina G, Richard J-L, Combescure C, Bourg G, Vidal L, et al. Virulence Potential of Staphylococcus aureus Strains Isolated From Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Care.* 2008 Dec;31(12):2318–24.
83. Sotto A, Richard J-L, Messad N, Molinari N, Jourdan N, Schuldiner S, et al. Distinguishing colonization from infection with Staphylococcus aureus in diabetic foot ulcers with miniaturized oligonucleotide arrays: a French multicenter study. *Diabetes Care.* 2012 Mar;35(3):617–23.
84. Snyder R, Cullen B. Point of care diagnostic tests in wound management: targeted therapy for excessive protease activity the first frontier. *Wound care and hyperbaric medicine* 2011 2, 54–61.
85. Jeandrot A, Richard J-L, Combescure 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 Feb;51(2):347–52.
86. Deak E, Charlton CL, Bobenchik AM, Miller SA, Pollett S, McHardy IH, et al. Comparison of the Vitek MS and Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS platforms for routine identification of commonly isolated bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015 Jan;81(1):27–33.
87. 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 Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2015 Jun;21(6):568.e1-11.
88. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek EB, Fox AJ. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol.* 2000 May;38(5):1747–52.
89. Dunyach-Remy C, Cadière A, Richard J-L, Schuldiner S, Bayle S, Roig B, et al. Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE): a promising

- tool to diagnose bacterial infections in diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab.* 2014 Dec;40(6):476–80.
90. Gardner SE, Hillis SL, Heilmann K, Segre JA, Grice EA. The neuropathic diabetic foot ulcer microbiome is associated with clinical factors. *Diabetes.* 2013 Mar;62(3):923–30.
91. Zhao G, Usui ML, Lippman SI, James GA, Stewart PS, Fleckman P, et al. Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. *Adv Wound Care.* 2013 Sep;2(7):389–99.
92. 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.* 2011 Dec;49(12):4225–30.
93. Titécat M, Loïez C, Senneville E, Wallet F, Dezèque H, Legout L, et al. Evaluation of rapid mecA gene detection versus standard culture in staphylococcal chronic prosthetic joint infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012 Aug;73(4):318–21.
94. Lourtet-Hascoëtt J, Bicart-See A, Félicé MP, Giordano G, Bonnet E. Is Xpert MRSA/SA SSTI real-time PCR a reliable tool for fast detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in periprosthetic joint infections? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015 Sep;83(1):59–62.
95. Valour F, Blanc-Pattin V, Freydière A-M, Bouaziz A, Chanard E, Lustig S, et al. Rapid detection of Staphylococcus aureus and methicillin resistance in bone and joint infection samples: evaluation of the GeneXpert MRSA/SA SSTI assay. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014 Mar;78(3):313–5.
96. Huang H-S, Tsai C-L, Chang J, Hsu T-C, Lin S, Lee C-C. Multiplex PCR System for the Rapid Diagnosis of Respiratory Virus Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2017 Dec 2;
97. Ozongwu C, Personne Y, Platt G, Jeanes C, Aydin S, Kozato N, et al. The Unyvero P55 “sample-in, answer-out” pneumonia assay: A performance evaluation. *Biomol Detect Quantif.* 2017 Sep;13:1–6.
98. Tissari P, Zumla A, Tarkka E. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *Lancet*, Decembre 2010; 375:224-30.
99. Babady NE, England MR, Jurcic Smith KL, He T, Wijetunge DS, Tang Y-W, et al. Multicenter Evaluation of the ePlex Respiratory Pathogen Panel for the Detection of Viral and Bacterial Respiratory Tract Pathogens in Nasopharyngeal Swabs. *J Clin Microbiol.* 2018 Feb;56(2).
100. Ledebøer NA, Lopansri BK, Dhiman N, Cavagnolo R, Carroll KC, Granato P, et al.

Identification of Gram-Negative Bacteria and Genetic Resistance Determinants from Positive Blood Culture Broths by Use of the Verigene Gram-Negative Blood Culture Multiplex Microarray-Based Molecular Assay. *J Clin Microbiol.* 2015 Aug;53(8):2460–72.

101. Hinić V, Aittakorpi A, Suter S, Turan S, Schultheiss E, Frei R, et al. Evaluation of the novel microarray-based Prove-it™ Bone&Joint assay for direct detection of pathogens from normally sterile body sites in comparison with culture and broad-range bacterial PCR. *J Microbiol Methods.* 2014 Dec;107:38–40.

102. Metso L, Mäki M, Tissari P, Remes V, Piiparinen P, Kirveskari J, et al. Efficacy of a novel PCR- and microarray-based method in diagnosis of a prosthetic joint infection. *Acta Orthop.* 2014 Apr;85(2):165–70.

103. Altun O, Almuhayawi M, Ullberg M, Özenci V. Clinical Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel in Identification of Bacteria and Yeasts from Positive Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol.* 2013 Dec;51(12):4130–6.

104. Alejo-Cancho I, Fernández Avilés F, Capón A, Rodríguez C, Barrachina J, Salvador P, et al. Evaluation of a multiplex panel for the diagnosis of acute infectious diarrhea in immunocompromised hematologic patients. *PloS One.* 2017;12(11):e0187458.

105. Monteix A, Dupieux-Chabert C, Abad L, Martin T, Gracieux P, Jay C, et al. Preliminary evaluation of the development version of FilmArray BJI panel: a fast way for the detection of bacteria and fungi in bone and joint infections. *ECCMID 2017.*

106. Lander ES. Array of hope. *Nat Genet.* 1999 Jan;21(1 Suppl):3–4.

107. Malandain D, Bémer P, Leroy AG, Léger J, Plouzeau C, Valentin AS, et al. Assessment of the automated multiplex-PCR Unyvero i60 ITI® cartridge system to diagnose prosthetic joint infection: a multicentre study. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2018 Jan;24(1):83.e1-83.e6.

108. Borde JP, Häcker GA, Guschl S, Serr A, Danner T, Hübner J, et al. Diagnosis of prosthetic joint infections using UMD-Universal Kit and the automated multiplex-PCR Unyvero i60 ITI(®) cartridge system: a pilot study. *Infection.* 2015 Oct;43(5):551–60.

109. Rodriguez-Sevilla G, Prieto-Borja L, Blanco A, Cimas D, Fernandez-Roblas R, Gaeda I. Evaluation of a new multiplex PCR assay of the sonification implant for the diagnosis of prothetic joint infection. 2015 Apr 27; ESCMID Copenhagen, Denmark.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens 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, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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

Evaluation du système Unyvero® ITI dans le cadre de la prise en charge des ostéites du pied chez le diabétique

Résumé :

Le diagnostic des IPD et des ostéites du pied chez le diabétique nécessite la mise en culture d'échantillons profonds (tissulaires ou osseux), durant une longue période d'incubation (de 7 à 14 jours) dans les laboratoires de microbiologie. Les nouveaux outils moléculaires permettent une diminution considérable du temps d'identification des bactéries pathogènes impliquées dans les infections bactériennes. Le but de cette étude était d'évaluer les performances de la technologie Unyvero® utilisant la technique de multiplexage, détectant les micro-organismes impliqués dans les infections ostéo-articulaires et des tissus mous en 5 heures.

Une étude prospective a été réalisée au Centre de référence du pied diabétique du CHU de Nîmes du 1^{er} décembre 2016 au 31 mai 2017. Les échantillons ont été analysés à la fois par la culture conventionnelle (incubée 14 jours) et par l'Unyvero® ITI technology. La confirmation des résultats obtenus par l'Unyvero® ITI technology a été effectuée par PCR spécifiques ou par ARNr 16S suivie d'un séquençage.

79 patients ont été inclus dans l'étude. 177 bactéries ont été isolées en culture (soit 2.2 par patient). 31 (17.5%) de ces bactéries n'étaient pas incluses dans le panel Unyvero ITI®. Le taux de concordance entre l'Unyvero® ITI technology et la culture conventionnelle était de 66,7%. Parmi ces discordances, 31 (52.5%) ne concernaient pas des bactéries incluses dans le panel et 20 (33,9%) concernaient des bactéries pathogènes. L'Unyvero® ITI technology a permis la détection de 28 bactéries (15.8%), qui n'ont pas été détectées en culture, 18 (64,3%) étaient pathogènes.

Même si la culture est essentielle dans le diagnostic des ostéites du pied chez le patient diabétique, la PCR Unyvero® ITI représente une solution intéressante pouvant permettre aux cliniciens un ajustement plus rapide de l'antibiothérapie et donc une meilleure prise en charge du patient.

Mots clés : Ostéites du pied chez le patient diabétique, Diagnostic microbiologique, PCR multiplex, Unyvero® i60 ITI système.