

Vloga sonikacije v diagnostiki okužb umetnih vsadkov

The role of sonication in the diagnosis of prosthetic joint infections

Boštjan Kocjančič,¹ Andrej Lapoša,² Drago Dolinar¹

¹ Ortopedska klinika, Zaloška 9, Univerzitetni klinični center Ljubljana

² Splošna bolnica Novo mesto, Kirurški oddelek

Korespondenca/ Correspondence:

Boštjan Kocjančič.
e: bkocjancic@gmail.com

Ključne besede:

sonikacija; biofilm; umetna sklepna proteza; okužba sklepnih protez; ortopedska kirurgija

Key words:

sonication; biofilm; joint prosthesis; prosthesis-related infection; orthopedics

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2014;
83: 890–900

Prispelo: 26. mar. 2014,
Sprejeto: 19. okt. 2014

Izvleček

Okužbe sklepnih protez so resen zaplet po artroplastikah, prinašajo hudo obolevnost za bolnika ter hkrati težko breme za zdravstveno blagajno. S staranjem prebivalstva se povečuje število bolnikov z vstavljenimi sklepnimi protezami, zato se povečuje tudi število zapletov. Posebnost okužb umetnega materiala je tvorba bakterijskega biofilma, ki predstavlja diagnostično in terapevtsko oviro. Uvedba novega diagnostičnega orodja – sonikacije omogoča sprostitev bakterijskega biofilma in izboljša občutljivost mikrobioloških preiskav, posebno pri antibiotičnem zdravljenju pred operacijo.

Na Ortopedski kliniki UKC Ljubljana smo leta 2007 sprva poskusno, kasneje pa kot dopolnilno diagnostično metodo za dokazovanje povzročitelja okužbe uvedli sonikacijo odstranjenega umetnega materiala. V obdobju od februarja 2008 do konca decembra 2012 smo obravnavali 198 primerov revizijskih posegov po vstavitvi umetnega materiala, pri katerih je bil postavljen sum na okužbo. V diagnostični obravnavi bolnikov smo preiskovali uporabnost sonikacije kot dodatnega orodja ob uveljavljenih diagnostičnih preiskavah (kultivacija tkiva, pridobljenega med operacijo). V 14 primerih (7,1 %) smo ugotovili povzročitelja samo z mehkotkivno kulturo, v 62 primerih (31,3 %) z obema preiskavama, v 51 primerih (25,7 %) je bil pozitiven samo sonikat, v 71 primerih (35,9 %) pa sta bili negativni obe preiskavi. Naši podatki kažejo, da je sonikacija v primerjavi z mehkotkivno biopsijo boljša metoda ($p < 0,05$) za dokazovanje povzročitelja okužb umetnih materialov ter tako omogoča bolj učinkovito zdravljenje tovrstnih okužb.

Metoda je uporabna v vseh področjih ortopedske kirurgije, čeprav jo najpogosteje uporabljamo pri revizijah po artroplastikah. Sonikacija je odlična dopolnilna metoda za dokazovanje okužb umetnega materiala. Metoda je na mestu predvsem

v mejnih primerih, ko je zaradi odsotnosti kliničnih znakov okužbe ter negativnih mikrobioloških preiskav težko razmejiti med aseptičnim omajanjem proteze ter okužbo.

Abstract

Prosthetic joint infection represent a devastating complication after joint arthroplasty and causes severe patient morbidity, along with the financial burden for the healthcare system. The number of patients after joint arthroplasty increases with the ageing population, therefore there is an increase in the incidence of complications. The pathogenesis of medical device infection is based on the development of bacterial biofilm, a diagnostic and therapeutic obstacle. The implementation of a new diagnostic tool – sonication, enables disruption of bacterial biofilm and improves the sensitivity of microbiological tests, even after preoperative antimicrobial therapy.

In the period from February 2008 to December 2012 we studied 198 cases of revision surgery in the Department of Orthopaedic surgery in UKC Ljubljana, in which an infection was suspected. We studied the use of sonication of explanted orthopedic material as an add-on diagnostic tool and compared it to standard soft tissue biopsy cultures. In 14 (7,1 %) cases infection was proven only by soft tissue biopsies (negative sonication), 62 cases (31,3 %) were diagnosed by both methods, additional 51 cases (25,7 %) were diagnosed only by sonication of explanted material and in 71 cases (35,9 %) all results were negative. Our results show that sonication is a superior tool ($p < 0,05$) for the detection of pathogens compared to soft tissue biopsy and could improve the treatment of orthopedic implant infections.

Method can be used in all fields of orthopedic surgery though it is most commonly used in the field of periprosthetic revisions. Sonication is an excellent addition to standard diagnostic meth-

ods. The use of sonication is indicated in doubtful cases, where the distinction between aseptic failure and prosthetic joint infection is blurred.

1 Uvod

1.1 Okužbe sklepnih protez

Z daljšanjem življenjske dobe ter staranjem prebivalstva se večja število bolnikov, pri katerih je zaradi degenerativne, vnetne ali travmatske okvare sklepov potrebna artroplastika z vstavitvijo umetne proteze. Napredek moderne ortopedske kirurgije je pripomogel k izboljšanju kakovosti življenja ter zmanjšanju obolevnosti bolnikov, vendar se zato povečuje tudi število zapletov, povezanih z umetnimi vsadki.

Zapleti, povezani po vstavitvi endoprotez, se pojavijo pri manj kot 10 % bolnikov,¹ največji delež pa predstavlja aseptično omajanje proteze, do katerega pride zaradi osteolitičnega procesa ob vsadku.² Redkejši, vendar bistveno nevarnejši zaplet, pa je okužba sklepne proteze, ki privede do hude obolevnosti bolnika zaradi bolečine, nepomičnosti, odpovedi proteze, potrebe po ponovni operaciji ter v najhujših primerih tudi izgube uda ali življenja. Poleg velikega tveganja za bolnika nosijo okužbe sklepnih protez tudi veliko breme za zdravstveni sistem, saj se stroški zdravljenja posamezne epizode okužbe po ocenah iz tujine gibljejo okrog 50.000 dolarjev.^{3,4}

Do okužbe sklepne proteze lahko pride zaradi vnosa mikroorganizmov med operacijo, po njej pa zaradi širjenja iz bližnjega žarišča ali zaradi hematogenega razsoja mikroorganizmov iz oddaljenega mesta. Najpogostejši povzročitelji okužb sklepnih protez so koagulaza negativni stafilokoki (v 30–43 %), *Staphylococcus aureus* (12–23 %), mešana bakterijska flora (10–11 %), streptokoki (9–10 %), enterokoki (3–7 %), po gramu negativni bacili (3–6 %) ter anaerobi (2–4 %), v približno 11 % primerov pa ostane povzročitelj neprepoznan.⁵

Okužbe sklepnih protez delimo na zgodnje medoperacijske okužbe, ki nastanejo znotraj 3 mesecev po posegu, odložene medoperacijske okužbe, ki nastanejo med 3 in 24 meseci po posegu, ter pozne okužbe, ki

nastanejo več kot 2 leti po posegu. Zgodnje in odložene medoperacijske okužbe so najpogosteje posledica kontaminacije rane med posegom, pozne okužbe pa običajno nastanejo zaradi hematogenega razsoja mikroorganizmov iz oddaljenega primarnega žarišča (koža, sečila, dihala, črevesje).⁶ V raziskavi, v kateri so preučevali 63 epizod okužb kolčnih endoprotez v obdobju 16 let, so ugotavljali, da je bilo 29 % okužb zgodnjih, 41 % odloženih ter 30 % poznih okužb.⁷

Omenjena delitev okužb sklepnih protez je pomembna zaradi izbire protokola zdravljenja. Poleg konzervativnega zdravljenja z antibiotiki je v večini primerov potrebno tudi kirurško zdravljenje. Z ozirom na trajanje okužbe izbiramo med nekrektomijo mehkih tkiv ob ohranitvi proteze, enostopenjsko zamenjavo proteze z nekrektomijo ter dvostopenjsko zamenjavo proteze z uporabo distančnika (*angl.* spacer) ali brez njega.⁸

V zadnjem desetletju se v razvoju diagnostičnih metod uveljavlja nov pristop z uporabo sonikacije, ki v prihodnosti obeta izboljšano prepoznavanje in dokazovanje infekcijskih zapletov ter usmerjeno zdravljenje okužb ortopedskih endoprotez.

1.2 Epidemiologija okužb sklepnih protez

Bolniki z umetnimi sklepnimi protezami so nastanku zapletov podvrženi kadar koli po vstavitvi proteze, zato lahko v prihodnosti pričakujemo naraščanje incidence pojavnosti okužb. Slednje je mogoče predvidevati na podlagi vedno večjega števila bolnikov z vstavljenimi protezami, daljšanju življenjske dobe ter nenazadnje zaradi razvoja boljših diagnostičnih metod za prepoznavanje okužb.⁹ Do okužbe umetne proteze pride v prvih dveh letih po posegu pri manj kot 1 % bolnikov po artroplastiki kolka, pri manj kot 2 % bolnikov po zamenjavi kolena, delež bolnikov z okužbo pa je bistveno večji po artro-

plastiki ramenskega sklepa ter po revizijskih posegih.^{10,11}

Pri bolnikih s sklepnimi protezami je zaradi možnosti hematogenega razsoja mikroorganizmov tveganje za nastanek okužbe prisotno dosmrtno. Prehodna bakteriemija pri sicer zdravih posameznikih ne povzroča značilno večjega tveganja za nastanek okužbe. Tveganje se bistveno poveča v primeru pridruženih kroničnih okužb kože, pri katerih prihaja do pogostih epizod bakteriemije, ter v primeru septikemije z visoko virulentnim mikroorganizmom. Razlike v dovzetnosti za nastanek okužbe se kažejo tudi med osnovnimi boleznimi, saj je tveganje večje pri bolnikih z revmatoidnim artritisom kot pri bolnikih z osteoartritisom.¹² Glede na raziskavo nastanka okužbe z bakterijo *Staphylococcus aureus* pride do okužbe sklepne proteze po epizodi bakteriemije v 34 % primerov, medtem ko pride do okužbe drugega ortopedskega materiala (vijaki, ploščice, žblji) v 7 % primerov.¹³

Ob teh podatkih se poraja vprašanje o ustreznosti antibiotične profilakse pri bolnikih z vgrajenimi endoprotezami, pri katerih lahko pride zaradi bolezni ali raznih kirurških posegov do prehodne bakteriemije. Mnenja glede tega so v strokovni literaturi deljena, najnovejše smernice glede uporabe antibiotične profilakse pa so:¹⁴

- Bolniki, pri katerih je predvidena vgradnja sklepne endoproteze, naj pred operacijo poskrbijo za sanacijo vseh akutnih in kroničnih vnetnih žarišč zob in obzobnih tkiv. Prvo leto po vgradnji endoproteze se odsvetuje kakršna koli neakutna sanacija zobovja. Bolniki naj skrbijo za ustrezno ustno higieno. Rutinska antibiotična profilaksa pri zobozdravstvenih posegih ni potrebna.¹⁵
- Bolniki s sklepnimi endoprotezami so bolniki s povečanim tveganjem za možno hematogeno nastale okužbe endoproteze. Kakršna koli vnetna žarišča pri teh bolnikih (okužbe kože, mehkih tkiv, sečil, črevesja ...) je potrebno pravočasno prepoznati in ustrezno zdraviti.
- Pri večjih operacijah bolnikov s sklepnimi endoprotezami je potrebna običajna predpisana antibiotična profilaksa ob operaciji.
- Pri invazivnih diagnostičnih preiskavah pri bolnikih s sklepnimi endoprotezami (cistoskopija, bronhoskopija, gastrokopija, kolonoskopija ...) antibiotična profilaksa ni potrebna, razen če pri teh posegih ni že rutinsko predpisana.¹⁶

Okužbe sklepnih protez spremlja sorazmerno visoka smrtnost, saj znaša v povezavi s kirurškim ukrepanjem zaradi okužbe sklepne proteze med 0,4 % in 1,2 % za bolnike, stare 65 let, ter med 2 % in 7 % za bolnike, stare 80 let, skupna mortaliteta za vsa starostna obdobja pa se od leta 1989 naprej giblje med 1 % in 2,5 %.¹⁷

1.3 Patogeneza ter vloga biofilma

Posebnost okužb sklepnih protez ter drugega umetnega materiala je v nastanku bakterijskega biofilma, zaradi česar sta diagnosticiranje ter zdravljenje tovrstnih okužb bistveno težji. Bakterije v biofilmu so v mirujoči fazi, čvrsto adherirane na površino umetnega materiala, kjer tvorijo skupke mikroorganizmov v hidriranem zunajceličnem matriksu. Tvorba večceličnega biofilma je privedla do razvoja zapletene odpornosti na antibiotično zdravljenje, ki je deloma povezana z nedostopnostjo kemoterapevtika, s spremenjenim mikrookoljem ter s prehodom bakterij v metabolno manj aktivno fazo.¹⁸ Za uspešno izkoreninjenje bakterij v biofilmu je zaradi upočasnjenega metabolizma potrebna tudi do 800-krat višja koncentracija kemoterapevtika v primerjavi z normalno metabolno aktivnimi bakterijami.¹⁹ Zaradi tvorbe biofilma ter tesnih povezav znotraj rezistentne strukture, je rast bakterij običajno lokalno omejena, zato pa so v primeru okužbe sklepne proteze mikroorganizmi značilno nakopičeni samo na eni komponenti.²⁰

Biofilm zaradi čvrste adherence na umetno površino ter lokalno rast predstavlja diagnostični izziv, saj se z uporabo standardnih metod prepoznavanja okužb povzročitelj pogosto ne prepozna. Pri poznih okužbah, pri katerih klinična slika običajno ni izrazita, se lahko okužba sklepne proteze zamenja za aseptično omajanje, saj je občutljivost metode kultiviranja tkivnih vzorcev med 65 % in

89 %.²¹ Verjetnost prepoznavne povzročitelja se še dodatno zmanjša, če je bolnik jemal antibiotik pred operacijo. S tem se uničijo neadherirane bakterije, medtem ko na biofilm nima zelenega učinka. Iz tega razloga je uvedba antibiotične terapije na nivoju primarnega zdravstva v primeru suma na okužbo sklepne proteze s strani ortopedske skupnosti odsvetovana. V tem primeru je potrebno bolnika čim prej napotiti na pregled k specialistu ortopedu ali infektologu.

1.4 Diagnosticiranje okužb sklepnih protez

Diagnosticiranje okužb sklepnih protez temelji na anamnezi, kliničnem statusu ter preiskavah pred in med operacijo. Te vključujejo osnovne laboratorijske preiskave (število levkocitov, hitrost sedimentacije, C-reaktivni protein), odvzem hemokultur (v primeru povišane telesne temperature) ter slikovno diagnostiko, ki pridobi na pomenu pri prepoznavanju kroničnih okužb, saj so na rentgenskih posnetkih vidne značilne spremembe, ki jih v akutni fazi še ni moč zaznati. Med slikovno diagnostiko uvrščamo klasično rentgensko slikanje skeleta, ki ima nizko specifičnost ter občutljivost in je manj uporabna v primeru zgodnjih okužb, scintigrafijo skeleta s tehnejem (Tc^{99m}), ki je nespecifična slikovna metoda in je lahko lažno pozitivna več kot 1 leto po primarnem posegu. Trenutno najbolj občutljiva slikovna metoda je scintigrafija skeleta z označenimi levkociti. Računalniško tomografijo (CT) ter magnetnoresonančno slikanje (MRI) zaradi artefaktov ob protezi uporabljamo manj, v zadnjem času pa se vedno bolj uveljavlja tudi PET (*angl.* positron emission tomography) ter SPECT (*angl.* single-photon emission computed tomography).²² Med slikovno diagnostiko uvrščamo še fistulografijo, ki pa jo uporabljamo redkeje. Med pomembnejše diagnostične metode pred operacijo spada še igelna aspiracija sklepne tekočine ter z UZ vodena punkcija ob sklepne tekočine.

Med diagnostične metode za potrditev okužbe sklepne proteze med operacijo uvrščamo odvzeme tkiva ob protezi za mikrobiološko ter histološko preiskavo. Prisotnost akutnega vnetja v histoloških vzorcih tkiva

ob protezi dokazuje prisotnost okužbe. Med pomanjkljivosti metode uvrščamo nezmožnost osamitve povzročitelja ter veliko variabilnost med posameznimi vzorci, oziroma celo med posameznimi rezinami tkiva. Histološka preiskava je pri pozitivnem rezultatu zanesljiva v prepoznavanju okužbe, zaradi nizke občutljivosti ter zato nevarnosti lažno negativnih rezultatov, pa so ob negativnem rezultatu za izključitev okužbe potrebne še dodatne preiskave.²³

Poglavitna diagnostična metoda za potrditev okužbe ter prepoznavo povzročitelja je mehkoktivna kultura obproteznega tkiva, ki predstavlja zlati standard v diagnostiki okužb sklepnih protez. Z uporabo tkivnih kultur se omogoči osamitev povzročitelja ter analiza antibiograma, na podlagi katerega lahko uvedemo usmerjeno antibiotično zdravljenje. Po zadnjih kliničnih smernicah je potrebno med operacijo odvzeti 3–5 ločenih vzorcev, okužba pa je potrjena, če v 2 vzorcih osamimo isti mikroorganizem. Med operacijo se vzorci po oceni operaterja najbolj spremenjeno tkivo, ki kaže znake okužbe. Ob tem je potrebno poudariti, da z mehkoktivnimi kulturami prepoznavamo posamezne oz. planktonske bakterije, ki so za razliko od bakterij v biofilmu bistveno bolj občutljive na antibiotično zdravljenje. Glavni pomanjkljivosti metode sta nizka občutljivost, predvsem po antibiotičnem zdravljenju, ter nevarnost kontaminacije vzorca.⁵

Po zadnjih objavljenih smernicah delovne skupine Združenja za mišičnoskeletne okužbe (*angl.* Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society) lahko periprotetično okužbo potrdimo, kadar obstaja fistula, ki komunicira s sklepno protezo, kadar osamimo istega povzročitelja v 2 različnih vzorcih ali kadar so prisotni 4 od 6 dodatnih meril (porast SR in CRP, porast sinovialnih levkocitov, porast deleža nevtrofilcev v sinovialni tekočini, prisotnost gnoja v sklepu, osamitev povzročitelja iz 1 vzorca, histološki znaki vnetja obproteznega tkiva).²⁴

1.5 Sonikacija

Razvoj diagnostičnih metod za prepoznavo okužb sklepnih protez ter drugega umetnega materiala je v zadnjem desetletju

temeljlil na novih spoznanjih o vlogi biofilma pri nastanku okužbe ter na uporabi različnih načinov odstranitve biofilma s površine umetnega materiala. Med slednjimi največ obeta uporaba ultrasonikacije (krajše sonikacija) v kombinaciji z vrtinčenjem (*angl.* vortexing). Začetki uporabe sonikacije pri diagnosticiranju okužb sklepnih protez segajo v konec 90. let, ko je Dobbins s sod. preučeval bakterijsko kontaminacijo sklepnih protez, kadar ni bilo kliničnih znakov okužbe.²⁵ Uvedba nove metode je privedla do spoznanja, da gre v določenih primerih aseptičnega omajanja proteze v bistvu za okužbo proteze z minimalnimi kliničnimi znaki.²⁶

Ultrasonikacija je metoda, pri kateri s pomočjo nizkofrekvenčnega valovanja (40 kHz) v tekočini ustvarimo področja z nizkim in visokim tlakom. Med nizkotlačno fazo nastanejo v tekočini mikroskopski plinski mehurčki (proces kavitacije), ki v visokotlačni fazi kolabirajo, ob tem sprostitjo ogromno energije na površini preiskovanega predmeta ter povzročijo vakumsko abrazijo biofilma.¹⁹ Postopek opravljamo v vodni kopeli, v kateri je po zaključku postopka tudi odstranjen biofilm. Z uporabo ultrasonikacije pridobimo vzorec – sonikat, ki ga nato s standardnimi (kultura) ali naprednimi (polimerazna verižna reakcija – PCR) mikrobi-

ološkimi metodami analiziramo za povzročitelja ter določimo antibiogram. Metoda sama po sebi ni diagnostično orodje, temveč izboljša občutljivost klasičnih mikrobioloških metod z izpopolnjenim vzorčenjem mikroorganizmov.

2 Metode

V raziskavo smo vključili bolnike, ki so bili na Ortopedski kliniki Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana obravnavani zaradi revizijskega posega, pri katerem smo odstranili ortopedski material. Sprva smo analizirali material v primerih, ko je bil postavljen klinični sum na okužbo, od leta 2010 dalje pa smo na analizo po obeh metodah rutinsko pošiljali ves odstranjeni material ob reviziji.

Pri preiskovancih smo po predvideni pripravi na operacijo opravili revizijski poseg. Poseg je potekal po ustaljenem postopku priprave ter indukcije anestezije, priprave operativnega polja ter s kirurškim pristopom. Med operacijo smo na aseptični način odvzeli 3–5 vzorcev tkiva ob ortopedskem vsadku ter ga shranili v sterilnih posodah za mikrobiološke vzorce. Nadalje smo glede na načrtovanje pred posegom odstranili umetni material. Eksplantirani ortopedski material je bil shranjen v sterilnem transportnem mediju (Lock&lock, Hana Cobi Plastic Co, Ltd., Seul, Južna Koreja). Materialu smo dodali 100–500 ml Ringerjeve raztopine (do 2/3 volumna posode). Odvzete vzorce obproteznega tkiva ter odstranjeni ortopedski material smo neposredno po operaciji pod anaerobnimi pogoji poslali na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani ali na Oddelek za klinično mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor.

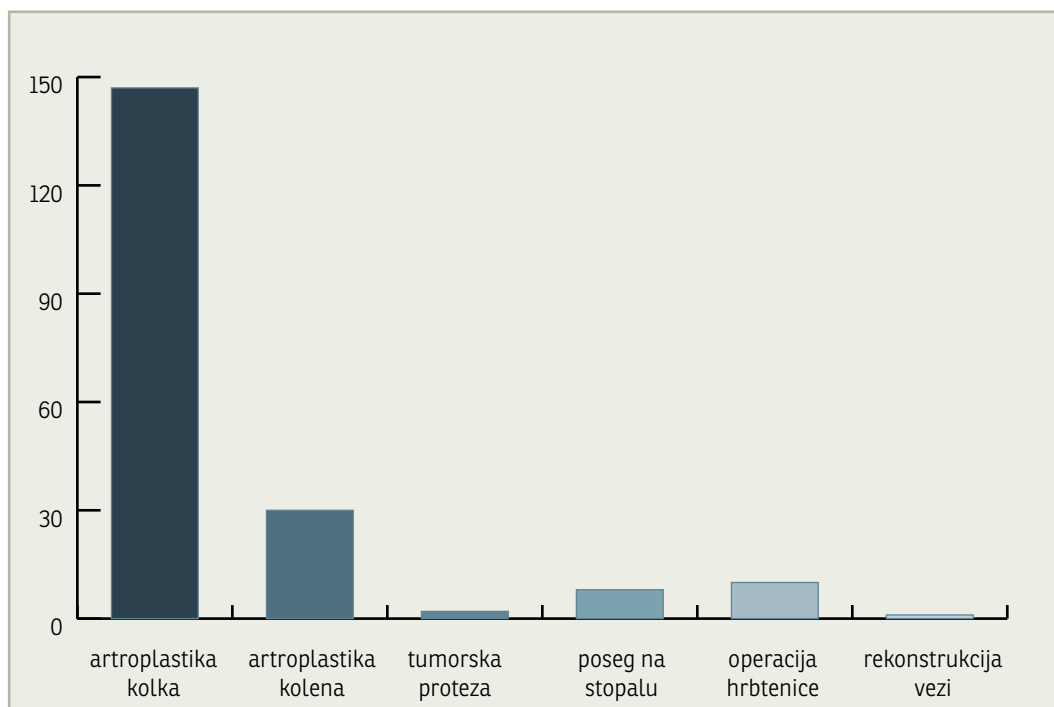
Mehkotkivne vzorce smo homogenizirali, zasejali na bakteriološka gojišča ter jih vsak dan pregledovali skupaj s kulturo sonikata. Količino bakterij v tkivih smo določili semikvantitativno; od 1+ (malo) do 3+ (veliko).

Odstranjeni ortopedski material smo sprva stresali (*angl.* vortex) 30 sekund ter nato sonicirali v ultrazvočni kopeli s frekvenco ultrazvočnih valov 40 kHz (1 minu-

Tabela 1: Vrsta ter delež izoliranih povzročiteljev glede na posamezno metodo osamitve.

Povzročitelj	Delež vzorcev (v %)
Mehkotkivna biopsija obproteznega tkiva	
Mešana bakterijska flora	29,0
<i>S. aureus</i>	19,7
<i>P.acnes</i>	19,7
Koagulaza negativni stafilokoki	18,4
Ostalo	13,2
Sonikacija eksplantiranega materiala	
Koagulaza negativni stafilokoki	32,8
Mešana bakterijska flora	28,3
<i>S. aureus</i>	16,8
<i>P.acnes</i>	9,7
<i>Streptococcus spp.</i>	3,5
Ostalo	8,9

Slika 1: Vrsta revizijskega posega pri katerem smo odvzeli material za sonikacijo ter število primerov glede na posamezno vrsto posega.



ta). Približno 50 ml sonikata smo centrifugirali pri 3200 obratih (10 minut). Sediment smo nacepili na bakteriološka gojišča: 0,1 ml sonikata na trda gojišča (krvni agar, čokoladni agar, Schaedler agar), 1 ml sonikata v tekoča gojišča (tioglikoladni bujon, hemokulturni sistem BacTAlert, BioMerieux, Rhone, Francija). Vzorce smo inkubirali naslednjih 7–10 dni in dnevno pregledali in zabeležili število kolonij ter mikrobiološko klasificirali vsako morfološko različno kolonijo (aerobna in anaerobna). Število bakterij na agarški plošči smo po pretečeni inkubacijski dobi prešteli ter njihovo količino izrazili s številom bakterij v ml sonikata (*angl.* CFU/ml – colony forming units/ml).

Pridobljene podatke smo nato zbrali ter računalniško analizirali s statističnim programom SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ZDA) in s programskim jezikom R. Mejo statistične pomembnosti smo zastavili pri $\alpha = 0,05$.

3 Rezultati

V obdobju od februarja 2008 do konca decembra 2012 smo obravnavali 198 primerov revizijskih posegov po vstavitvi umetnega materiala pri 156 bolnikih, od tega je bilo 87 žensk (55,8 %) ter 69 moških (44,2 %). Primeri revizijskih posegov so vključevali (Sli-

ka 1) 147 primerov revizijske artroplastike kolka, 30 primerov revizijske artroplastike kolena, 2 primera revizije tumorske proteze, 8 primerov po posegih na stopalu, 10 primerov po operaciji hrbtenice ter 1 primer po rekonstrukciji kolenskih vezi.

Od 198 primerov smo v 14 primerih (7,1 %) ugotovili povzročitelja samo s tkivno kulturo, v 62 primerih (31,3 %) z obema preiskavama, v 51 primerih (25,7 %) je bil pozitiven samo sonikat, v 71 primerih (35,9 %) pa sta bili negativni obe preiskavi. V primeru pozitivnih rezultatov oz. pozitivne izolacije smo po posvetu z infektologom uvedli ustrezno zdravljenje. Rezultati so grafično prikazani v Sliki 2.

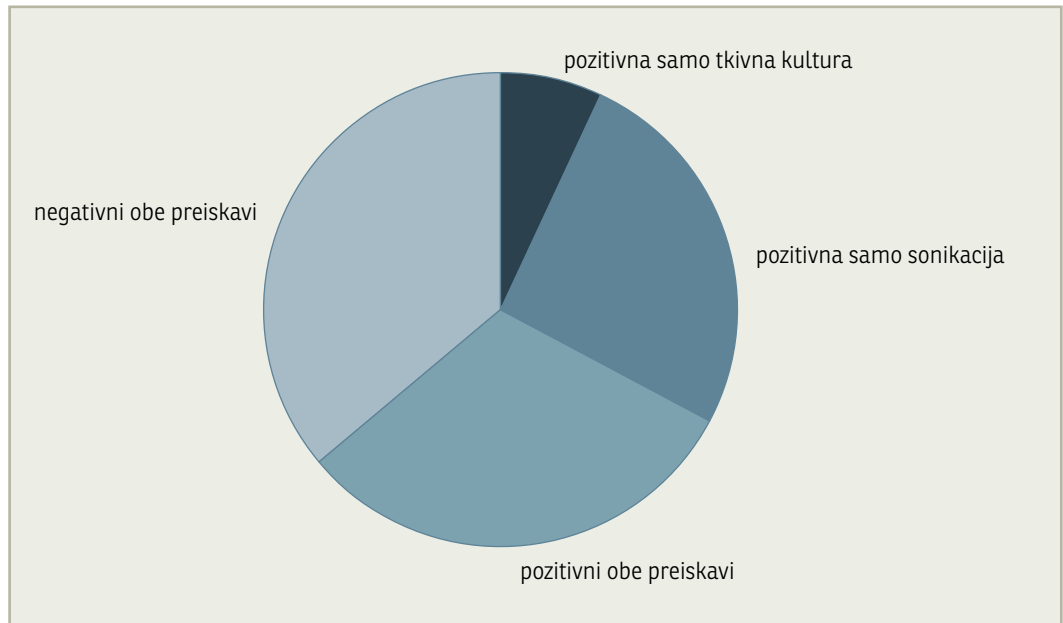
V Tabeli 1 so prikazani izolati posameznih bakterij. Pri prikazu so ločeni izolati za mehkotkivne biopsije in sonikacijo odstranjenega materiala.

Z uporabo McNemarjevega testa smo izračunali statistično značilno razliko $p < 0,05$ ($p = 0,0001$) med rezultati mehkotkivne biopsije ter rezultati sonikacije v prid sonikaciji.

4 Razpravljanje

Pridobljeni rezultati in statistična analiza potrjujejo uspešnost sonikacije pri dokazovanju povzročitelja okužbe. Rezultati so

Slika 2: Delež pridobljenih pozitivnih rezultatov mikrobiologije glede na uporabljeno diagnostično metodo.



primerljivi z rezultati do danes objavljenih raziskav na tem področju.^{11,20,27}

Pri obravnavanju rezultatov glede na povzročitelja smo zasledili sorazmerno veliko število primerov, pri katerih smo s sonikacijo osamili mešano bakterijsko floro (28,3 %) ter *Propionibacterium acnes* (9,7 %). V do danes objavljenih raziskavah so bili kot najpogostejši povzročitelj prepoznani stafilokoki (koagulaza negativni stafilokoki ter *S. aureus*), v manjšem deležu pa je bila izolirana mešana bakterijska flora ter ostali povzročitelji.⁵ Pridobljeni rezultati so deloma lahko posledica kontaminacije vzorca, saj *Propionibacterium spp.* uvrščamo med značilno kožno floro, obenem pa je bil prepoznani kot 2. najpogostejši vzrok kontaminacije aspiracije sklepa.²⁸ V prid kontaminacije rane govori tudi visok delež mešane bakterijske flore, pri čemer običajno mešano floro sestavlja bakterija, ki je povzročitelj okužbe, ter bakterija, ki je prisotna zaradi kontaminacije vzorca.

Druga razlaga pridobljenih rezultatov pa je, da so bili vzorci pogosto odvzeti pri nejasnih primerih. V tovrstnih okoliščinah se pogosteje osamijo redkejši in manj virulentni povzročitelji. Prav tako so tovrstne okužbe v zadnjih objavljenih smernicah Ameriškega združenja infektologov (posebej nizkovirulentne bakterije in *Propionibacterium spp.*) prvič priznali in definirali kot možne povzročitelje okužbe sklepne

proteze.²⁸ V teh smernicah je sonikacija tudi prvič definirana in priznana kot mikrobiološka metoda, s katero je možno in primerno dokazovati okužbo sklepne proteze.

V naši ustanovi menimo, da je *Propionibacterium spp.* pomemben povzročitelj ter pogost vzrok spregledanih okužb, zato v naši ustanovi osamitev tovrstnega povzročitelja opredelimo kot okužbo sklepne proteze. Rezultati naše raziskave in podobnih raziskav drugod so privedle do opisanih sprememb smernic zdravljenja okužb sklepnih protez.

Sonikacija se je v dosedanjih raziskavah v primerjavi z aspiratom sinovialne tekočine ter periprotetičnim tkivom izkazala za bolj občutljivo metodo pridobitve vzorca za mikrobiološko kulturo.²⁰ S kultivacijo aspirata sklepne tekočine se je spregledalo 12 %, s kulturo periprotetičnega tkiva 17 % ter s kulturo sonikata 9 % okužb sklepnih protez. Do primerljivih rezultatov so prišli tudi pri nedavni raziskavi primerjave občutljivosti mehkotkivne kulture ter kulture sonikata, pri čemer se je slednja izkazala za bolj specifično metodo.²⁹ Zaradi tovrstnih ugotovitev se sonikacija vedno bolj uveljavlja kot dopolnilna metoda prepoznavanja okužb sklepnih protez.

V naši seriji bolnikov smo pri pozitivnih rezultatih bodisi tkivnih kultur ali sonikacije po posvetu z infektologom uvedli ustrezno zdravljenje. Pri periprotetični okužbi smo rezultate preiskav upoštevali v okviru

protokola zdravljenja (pozitivni vsaj 2 tkivni kulturi ali tkivna kultura in sonikacija). Rezultate sonikacije in tkivnih kultur smo upoštevali kot pozitivne tudi pri podaljšani kultivaciji na obogatenih gojiščih, ki so potrebna predvsem za dokaz *Propionibacterium spp.* Pri interpretaciji rezultatov sonikacije smo za referenčno točko (cut-off) uporabili mednarodni standard 50 CFU/ml, nižje vrednosti pa smo obravnavali kot kontaminacijo.

Če primerjamo rezultate izoliranih mikroorganizmov, predstavljene v Tabeli 1, je vidna dobra korelacija med obema metodama. Pri določenih bolnikih so se izvidi metod razlikovali, klinično smo po teh merilih upoštevali oba rezultata. Sonikacija je dokazala večji delež bakterij, ki tvorijo biofilm, s čimer razlagamo večji delež koagulaza negativnih stafilokokov.

Od uvedbe sonikacije v diagnostični protokol se je v mnogih primerih aseptično omajanje sklepne proteze izkazalo kot tiha okužba brez očitnih kliničnih znakov okužbe.³⁰ Glede na grobe ocene je pri 4–13 % bolnikov, ki so imeli pred operacijo diagnozo aseptično omajanje sklepne proteze, prisotna okužba sklepne proteze z negativno kulturo (*angl.* culture-negative prosthetic joint infection).^{31,32} Pri bolnikih, ki so bili obravnavani zaradi omajanja z napredovalo osteolizo ter negativno kulturo obroteznega tkiva, so z uporabo sonikacije osamili mikrobiološkega povzročitelja v 57 % primerov.³³ Morebitna dodatna razlaga za tovrstne rezultate je ob tvorbi biofilma še rast bakterij v majhnih kolonijah (*angl.* small colony forming units) in internalizacija bakterij v osteoblastih.⁸ Dodatni dejavnik tveganja za nastanek kulturno negativnih okužb sklepnih protez je predhodna antibiotična terapija ter podaljšano dreniranje operativnega polja po primarnem posegu.³⁴

Zaradi tega dejstva pride uporabnost sonikacije do izraza predvsem pri bolnikih, ki so pred operacijo prejeli antibiotično terapijo, saj pri njih pride do uničenja prostih oz. planktonskih bakterij v okolici proteze, zaradi česar nato s standardnimi metodami težje oz. sploh ne uspemo osamiti povzročitelja. Po drugi strani predstavlja biofilm odporno obliko bakterijske rasti, ki ga z

običajnimi režimi zdravljenja ne uspemo izkoreniniti. Občutljivost kulture sonikata v primerjavi z obproteznim tkivom ostaja sorazmerno visoka kljub antibiotični terapiji, ki je bila ukinjena manj kot 14 dni pred operacijo (75 % občutljivost sonikacije, 45 % občutljivost tkivnih kultur).³⁵

Klinični pomen se je pokazal, ko smo po začetku uvajanja metode s sonikacijo uspešno dokazali prisotnost okužbe v številnih primerih antibiotičnega zdravljenja pred operacijo. Začetno vključitveno merilo so bili torej jasni klinični znaki vnetja – bodisi sistemski (z vročino, povišanimi laboratorijskimi parametri ...) ali lokalni (z rdečino, fistulo v operativnem področju). Ker so bili rezultati vzpodbudni, smo od začetka leta 2010 rutinsko pošiljali na sonikacijo ves pri revizijski operaciji odstranjen material, ne glede na klinične znake o prisotnosti okužbe.

Prednost sonikacije je, da s pomočjo ultrazvoka odstrani biofilm s površine umetnega materiala ter ga naredi dostopnega za standardne mikrobiološke metode. Z natančno opredeljenimi parametri, sonikacija vpliva zgolj na strukturo biofilma, medtem ko bakterijske celice ostanejo viabilne, torej zmožne kultivacije.³⁶ S tem je mogoče odpraviti poglavitno oviro pri diagnosticiranju okužb umetnih materialov.

Na tem mestu je potrebno poudariti, da je metoda uporabna za vse vrste umetnih materialov, pri katerih pride do tvorbe biofilma. Tako je mogoče metodo uporabiti pri diagnosticiranju okužb drugega osteosintetskega materiala (ploščice, žice, vijaki, žebliji, tumorskih protez, žilnih ter urinskih kateetrov, umetnih srčnih zaklopk, srčnih spodbujevalnikov³⁷ ter vsadkov v rekonstrukcijski in estetski kirurgiji.³⁸ Pri slednji so s pomočjo sonikacije ugotovili povezavo med bakterijsko kolonizacijo površine prsnih vsadkov ter nastankom kapsularne kontrakture proteze.³⁹ Sonikacija je uporabna v vseh primerih okužb, pri katerih pride do nastanka biofilma. Na mestu je nato odstranitev umetnega materiala z operacijo.

Pomanjkljivost novega pristopa je predvsem v nevarnosti, da se vzorec kontaminira, do česar lahko pride ob nepravilnem shranjevanju ter prevozu sorazmerno veli-

kih vzorcev (deli sklepnih protez).⁴⁰ V prid kontaminacije vsadka lahko govori mešana bakterijska flora, pri čemer običajno mešana flora sestavlja bakterija, ki je povzročitelj okužbe, ter bakterija, ki je prisotna zaradi kontaminacije vzorca. Dodatna pomanjkljivost metode je v lokalni tvorbi biofilma, ki lahko nastane zgolj na določenem delu ortopedskega materiala. Ob upoštevanju slednjega lahko pri sonikaciji posameznega dela sorazmerno velike sklepne proteze spregledamo mikrobiološkega povzročitelja. Ob sonikaciji glavice femoralnega dela proteze je negativen izvid sonikacije kljub prisotnosti okužbe nedvomno mogoč, biofilm pa je lahko prisoten na neodstranjenem delu proteze.

V ortopedski skupnosti se v zadnjem obdobju zaradi uspešnosti sonikacije uveljavlja sonikacija premičnih delov proteze, t.i. »mobile parts removal«. Kjer obstaja sum na okužbo, pri revizijskem posegu odstranimo zgolj glavico ali vrat femoralnega dela proteze, acetabularni vložek pri kolčni protezi ali tibialni vložek pri kolenski protezi ter ga analiziramo s sonikacijo. Namen metode je uporaba manj invazivnega posega, na podlagi katerega lahko odkrijemo septični proces v umetnem sklepu, ki ga z ostalimi predoperativnimi preiskavami nismo prepoznali. Ob pisanju članka v dostopnih virih ni objavljene raziskave, ki bi primerjala uspešnost dokazovanja povzročitelja s sonikacijo premičnih delov v primerjavi s sonikacijo celotne proteze.

Posebna previdnost pri interpretaciji rezultata sonikacije je potrebna pri obravnavanju mejnih primerov, ko ob odsotnosti znakov vnetja s sonikacijo osamimo potencialnega povzročitelja okužbe. V tovrstnih okoliščinah je pogostejša osamitev redkejših in manj virulentnih povzročiteljev. Glede na nedavno objavljene smernice Združenja za mišičnoskeletne okužbe, osamitev nizkovirulentnih povzročiteljev, kot so koagulaza negativni stafilokoki, *Propionibacterium* spp. ter *Corynebacterium* spp., v enem vzorcu ne potrdi okužbe sklepne proteze, medtem ko osamitev visokovirulentnega povzročitelja v enem vzorcu govori v prid okužbi. V naši ustanovi menimo, da je *Propionibacterium* spp. pomemben povzročitelj

ter pogost vzrok spregledanih okužb, zato osamitev tovrstnega povzročitelja opredelimo kot okužbo sklepne proteze. Pri interpretaciji rezultata sonikacije se pri večini raziskav upošteva meja 50 CFU/ml (angl. colony forming units). Obstaja pa težnja, da se zniža meja, predvsem zaradi mejnih primerov.

Pozornost je potrebna tudi pri nastavitvi parametrov sonikacije, pri katerih je ključnega pomena čas delovanja akustične energije. Daljši časi sonikacije (več kot 30 min) lahko uničijo tudi bakterije v biofilmu, zaradi česar pride do več lažno negativnih rezultatov.²⁶ Sonikacija zaradi relativno novega pristopa ter slabše dostopnosti metode zaenkrat ostaja omejena na večje ortopedske centre. Slednje je pokazala tudi nedavna anketa o diagnostiki in zdravljenju okužb sklepnih protez v ZDA, kjer je sonikacija dostopna 45 % zdravnikov, ki se ukvarjajo z okužbami sklepnih protez, njeno uporabo pa je priporočalo le 11 % vprašanih zdravnikov.⁴¹

5 Zaključek

Okužbe sklepnih protez ter drugega umetnega materiala so naraščajoč problem moderne medicine, saj zaplet s seboj prinaša hudo obolevnost bolnika, ponovne ter podaljšane hospitalizacije, pogosto več operativnih posegov, podaljšano antibiotično terapijo in zato veliko finančno breme za zdravstveni sistem. S staranjem prebivalstva pričakujemo vse več tovrstnih zapletov, predvsem zaradi večjega števila bolnikov z vgrajenim umetnim materialom ter daljšim obdobjem, ko je vgrajen umetni material. Uvedba sonikacije kot dodatne metode za diagnosticiranje omogoča boljše prepoznavanje in dokazovanje povzročitelja ob ohranitvi prednosti standardnih metod (izdelava antibiograma ter posledično usmerjena antibiotična terapija). Uporaba sonikacije se je izkazala za odlično metodo prepoznavanja povzročiteljev okužb sklepnih protez v primerjavi s klasičnimi mikrobiološkimi metodami (tkivne kulture, brisi), njen pomen pa pride posebno do izraza po antibiotični terapiji pred posegom. Nedvomno je sonikacija pripomogla pri razjasnitvi mejnih primerov, pri katerih je razlikovanje med aseptičnim

omajanjem ter okužbo oteženo. Menimo, da bo metoda v prihodnosti postala stalna mikrobiološka metoda za dokazovanje okužbe umetnega materiala odstranjenega iz telesa.

Literatura

- Steckelberg JM, Osmon DR. Prosthetic joint infections. In: Bisno AL, Waldvogel FA ed. *Infections associated with indwelling medical devices*. Washington: American Society for Microbiology 1994; 259–90.
- Kadoya Y, Kobayashi A, Ohashi H. Wear and osteolysis in total joint replacements. *Acta Orthop Scand Suppl* 1998; 278: 1–16.
- Berbari EF, Hanssen AD, Duffy MC, Steckelberg JM, Ilstrup DM, Harmsen WS, et al. Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1247–54.
- Klouché S, Sariali E, Mamoudy P. Total hip arthroplasty revision due to infection: a cost analysis approach. *Orthop Traumatol Surg Res* 2010 Apr; 96 (2): 124–32.
- Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-Joint Infections. *N Engl J Med* 2004; 351: 1645–54.
- Dolar D, Koritnik B, Meglič-Volkar J, Lotrič-Furlan S. Preprečevanje in principi zdravljenja proteznih okužb v ortopediji. *Zdrav Vestn* 2007; 76: 117–24.
- Giulieri SG, Graber P, Ochsner PE, Zimmerli W. Management of infection associated with total hip arthroplasty according to a treatment algorithm. *Infection* 2004; 32: 222–8.
- Maurer TB, Ochsner PE. Infekt nach Knie-Totalprothesenimplantation. Zweizeitiger Wechsel als Element des Liestaler Behandlungsalgorithmus. *Orthopade* 2006 Sep; 35 (9): 917–8, 920–8.
- Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly* 2005; 135: 243–251.
- Harris WH, Sledge CB. Total hip and total knee replacement. *N Engl J Med* 1990 Sep 20; 323 (12): 801–7.
- Piper KE, Jacobson MJ, Cofield RH, Sperling JW, Sanchez-Sotelo J, Osmon DR, et al. Microbiologic Diagnosis of Prosthetic Shoulder Infection by Use of Implant Sonication. *J Clin Microbiol* 2009 Jun; 47 (6): 1878–84.
- Ainscow DA, Denham RA. The risk of haematogenous infection in total joint replacements. *J Bone Joint Surg Br* 1984 Aug; 66 (4): 580–2.
- Murdoch DR, Roberts SA, Fowler VG Jr, Shah MA, Taylor SL, Morris AJ, et al. Infection of orthopedic prostheses after *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clin Infect Dis* 2001 Feb 15; 32 (4): 647–9.
- Krijnen P, Kaandorp C, Steyerberg E, van Schaardenburg D, Moens H, Habbema J. Antibiotic prophylaxis for haematogenous bacterial arthritis in patients with joint disease: a cost effectiveness analysis. *Ann Rheum Dis* 2001 April; 60 (4): 359–66.
- American Dental Association, American Academy Of Orthopaedic Surgeons. Antibiotic prophylaxis for dental patients with total joint replacements. *JADA* 2003; 134: 895–9.
- Trampuz A, Widmer AF. Infections associated with orthopedic implants. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2006; 19: 349–56.
- Lentino JR. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin Infect Dis* 2003; 36 (9): 1157–61.
- Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358: 135–138.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 711–745.
- Trampuz A, Kavcic M, Grmek-Kosnik I, Trebse R. Primerjava kulture sinovialne tekočine, obprotznega tkiva in sonikata proteze v diagnostiki okužb kolenskih protez. *Zdrav Vestn* 2003; 72: 117–25.
- Bjerkkan G, Witsø E, Bergh K. Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro. *Acta Orthopaedica* 2009; 80 (2): 245–250.
- Cataldo MA, Petrosillo N, Cipriani M, Cauda R, Tacconelli E. Prosthetic joint infection: Recent developments in diagnosis and management. *J Infect* (2010) 61, 443–448.
- Francés Borrego A, Martínez FM, Cebrian Parra JL, Grañeda DS, Crespo RG, López-Durán Stern L. Diagnosis of infection in hip and knee revision surgery: intraoperative frozen section analysis. *Int Orthop*. 2007 Feb; 31 (1): 33–7.
- Workgroup Convened by the Musculoskeletal Infection Society. New definition for periprosthetic joint infection. *J Arthroplasty* 2011 Dec; 26(8): 1136–8.
- Dobbins JJ, Seligson D, Raff MJ. Bacterial colonization of orthopedic fixation devices in the absence of clinical infection. *J Infect Dis* 1988; 158: 203–5.
- Nelson CL, McLaren AC, McLaren SG, Johnson JW, Smeltzer MS. Is aseptic loosening truly aseptic? *Clin Orthop Relat Res*. 2005 Aug; (437): 25–30.
- Barrack RL, Harris WH. The value of aspiration of the hip joint before revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 1993; 75: 66–76.
- Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *CID* 2013; 56: 1–25.
- Holinka J, Bauer L, Hirschl AM, Graninger W, Windhager R, Presterl E. Sonication cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological diagnostics improve pathogen detection. *J Orthop Res* 2011 Apr; 29 (4): 617–22.
- Nelson CL, McLaren AC, McLaren SG, Johnson JW, Smeltzer MS. Is aseptic loosening truly aseptic? *Clin Orthop Relat Res*. 2005 Aug; (437): 25–30.
- Moojen DJ, van Hellemond G, Vogely HC, Burger BJ, Walenkamp GH, Tulp NJ, et al. Incidence of low-grade infection in aseptic loosening of total hip arthroplasty. *Acta Orthop*. 2010 Dec; 81 (6): 667–73.
- Berbari EF, Marculescu C, Sia I, Lahr BD, Hanssen AD, Steckelberg JM, et al. Culture-negative pro-

- sthetic joint infection. *Clin Infect Dis*. 2007 Nov 1; 45 (9): 1113–9.
33. Sierra JM, García S, Martínez-Pastor JC, Tomás X, Gallart X, Vila J, et al. Relationship between the degree of osteolysis and cultures obtained by sonication of the prostheses in patients with aseptic loosening of a hip or knee arthroplasty. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2011 Oct; 131 (10): 1357–61.
 34. Malekzadeh D, Osmon DR, Lahr BD, Hanssen AD, Berbari EF. Prior use of antimicrobial therapy is a risk factor for culture-negative prosthetic joint infection. *Clin Orthop Relat Res*. 2010 Aug; 468 (8): 2039–45.
 35. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med* 2007 Aug 16; 357 (7): 654–63.
 36. Kobayashi N, Bauer TW, Tuohy MJ, Fujishiro T, Procop GW. Brief ultrasonication improves detection of biofilm-formative bacteria around a metal implant. *Clin Orthop Relat Res* 2007 Apr; 457: 210–3.
 37. Mason PK, Dimarco JP, Ferguson JD, Mahapatra S, Mangrum JM, Bilchick KC, et al. Sonication of explanted cardiac rhythm management devices for the diagnosis of pocket infections and asymptomatic bacterial colonization. *Pacing Clin Electrophysiol* 2011 Feb; 34(2): 143–9.
 38. Rieger UM, Mesina J, Kalbermatten DF, Haug M, Frey HP, Pico R, et al. Bacterial biofilms and capsular contracture in patients with breast implants. *Br J Surg* 2013 May; 100 (6): 768–74.
 39. Del Pozo JL, Tran NV, Petty PM, Johnson CH, Walsh MF, Bite U, et al. Pilot study of association of bacteria on breast implants with capsular contracture. *J Clin Microbiol* 2009 May; 47 (5): 1333–7.
 40. Trampuz A, Piper KE, Hanssen AD, Osmon DR, Cockerill FR, Steckelberg JM, et al. Sonication of explanted prosthetic components in bags for diagnosis of prosthetic joint infection is associated with risk of contamination. *J Clin Microbiol* 2006 Feb; 44 (2): 628–31.
 41. Johannsson B, Taylor J, Clark CR, Shamsuddin H, Beekmann SE, Polgreen P. Treatment approaches to prosthetic joint infections: results of an Emerging Infections Network survey. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010 Jan; 66 (1): 16–23.