

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Η συμβολή των υπερήχων στις συμβατικές και στις μοριακές μεθόδους για τη μικροβιολογική διάγνωση των σχετιζομένων με εμφυτεύματα λοιμώξεων

Στην παρούσα ανασκόπηση παρουσιάζονται συνοπτικά οι λοιμώξεις που προκαλούνται από εμφυτεύματα, με ιδιαίτερη αναφορά στις περιπροθετικές λοιμώξεις. Περιγράφονται οι συμβατικές διαγνωστικές μέθοδοι μικροβιολογικής διάγνωσης των εν λόγω λοιμώξεων και γίνεται λεπτομερής αναφορά στη συμβολή των υπερήχων στη μικροβιολογική διάγνωση. Προτείνονται λύσεις σε πιθανά προβλήματα εκτέλεσης και αξιολόγησης της συγκεκριμένης μεθοδολογίας. Γίνεται επίσης αναφορά στις μοριακές μεθόδους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με εμπλουτισμένα δείγματα υπερήχησης. Η υπερήχηση των εμφυτευμάτων αποτελεί μια μη δαπανηρή και αξιόπιστη μέθοδο που συμβάλλει σημαντικά στη βελτίωση της μικροβιολογικής διάγνωσης των μολυσμένων εμφυτευμάτων και των λοιμώξεων που προκαλούν αυτά. Ο συνδυασμός τους με μοριακές τεχνικές μπορεί να βελτιώσει περαιτέρω την ευαισθησία και την αποτελεσματικότητα της μικροβιολογικής διάγνωσης.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σύγχρονη ιατρική βιοτεχνολογία έχει αναπτύξει ποικιλία τεχνητών οργάνων και μελών για να βοηθήσει στην εκτέλεση φυσιολογικών λειτουργιών και κινήσεων είτε βραχυπρόθεσμα, όπως συμβαίνει με τα συστήματα των εξωτερικών οστεοσυνθέσεων, είτε μόνιμα, όπως με τις τεχνητές καρδιακές βαλβίδες, τους βηματοδότες, τους εμφυτευμένους απινιδωτές, τις εσωτερικές οστεοσυνθέσεις, τις αρθροπλαστικές και γενικότερα τις ορθοπαιδικές προθέσεις. Ο αριθμός των εμφυτευμάτων αυξάνεται ιδιαίτερα στον ολόένα αυξανόμενο πληθυσμό της τρίτης ηλικίας. Στην αύξηση του αριθμού της εφαρμογής των εμφυτευμάτων επέδρασε καθοριστικά η σημαντική μείωση της συχνότητας των λοιμώξεων από εμφυτεύματα συγκριτικά με την εποχή που εφαρμόστηκαν αρχικά. Στην επίτευξη αυτή συνέβαλαν οι σύγχρονες χειρουργικές τεχνικές, η προφυλακτική αντιμικροβιακή αγωγή, η βελτίωση των βιοϋλικών των προθέσεων, η βελτίωση των συνθηκών πρόληψης επιμολύνσεων εντός

του χειρουργείου, η καταλληλότερη επιλογή ασθενών και η βελτίωση στη μετεγχειρητική παρακολούθησή τους.

2. ΚΙΝΔΥΝΟΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ ΕΜΦΥΤΕΥΜΑΤΑ

Παρ' όλα αυτά, ο κίνδυνος για λοιμώξεις αυξάνει όσο περισσότερο παραμένει το εμφύτευμα στον ασθενή που έχει χειρουργηθεί, γιατί η πιθανότητα μόλυνσης μετά την εμφύτευση υφίσταται διαρκώς, από μια απομακρυσμένη εστία διά μέσου της αιματογενούς οδού. Εάν επί πλέον ληφθεί υπ' όψη ότι ο χρόνος παραμονής των προθέσεων αυξάνεται λόγω και του υψηλότερου προσδόκιμου επιβίωσης που έχει επιτευχθεί, οι λοιμώξεις από εμφυτεύματα αναμένεται να αυξάνονται συνεχώς και σημαντικά τις επόμενες δεκαετίες. Ο κίνδυνος πρόκλησης λοίμωξης από εμφυτεύματα μειώθηκε διαχρονικά, αλλά δεν εξαφανίστηκε. Σε μελέτη των Darouiche et al στις ΗΠΑ, ο κίνδυνος πρόκλησης λοίμωξης για τις κυριαρχούσες ποσοτικά εσωτερικές

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2012, 29(6):688-694
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2012, 29(6):688-694

Α. Στυλιανάκης,¹
Α. Τσακρής²

¹Μικροβιολογικό Τμήμα, Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «ΚΑΤ», ESCMID Study Group of Implant Associated Infections, Αθήνα
²Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

The contribution of implant sonication to the conventional and molecular methods for microbiological diagnosis of implant associated infections

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

Λοιμώξεις σχετιζόμενες με εμφυτεύματα
Μικροβιολογική διάγνωση
Ορθοπαιδική πρόθεση
Πραγματικού χρόνου πολυπλεκτική PCR
Υπέρηχοι

Υποβλήθηκε 24.6.2012
Εγκρίθηκε 6.7.2012

οστεοσυνθέσεις και για τα οδοντικά εμφυτεύματα κυμαίνεται από 5–10%, για τις αρθροπλαστικές 1–3%, για τα αγγειακά μοσχεύματα 1–5%, για τους βηματοδότες 1–7%, για τα μαστικά εμφυτεύματα 1–2%, ενώ στα ίδια επίπεδα με τα τελευταία κυμαίνεται ο κίνδυνος πρόκλησης λοίμωξης και για τα υπόλοιπα είδη εμφυτευμάτων.¹

3. ΕΙΔΗ ΠΕΡΙΠΡΟΘΕΤΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΚΑΙ ΣΥΧΝΟΤΕΡΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΠΟΥ ΤΙΣ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ

Τα είδη λοιμώξεων από ορθοπαιδικά εμφυτεύματα (περιπροθετικές λοιμώξεις) διακρίνονται χρονικά σε τρία είδη: Στην *πρώιμη μετεγχειρητική λοίμωξη*, η οποία εμφανίζεται τους 3 πρώτους μήνες από την τοποθέτηση της πρόθεσης και προκαλείται πιο συχνά από *Staphylococcus aureus* και στρεπτοκόκκους, στην *όψιμη χρόνια*, η οποία είναι συνήθως χαμηλής βαρύτητας λοίμωξη, εμφανίζεται μετά τους πρώτους 3 μήνες από την επέμβαση έως και 2 έτη και προκαλείται συνήθως από κοαγκουλάση-αρνητικούς σταφυλοκόκκους (CNS) και αναερόβια βακτήρια και στην *όψιμη αιματογενή*, η οποία εμφανίζεται μετά τα 2 έτη από την επέμβαση και προκαλείται συνήθως από *S. aureus* και *Escherichia coli* προερχόμενα από μια απομακρυσμένη εστία λοίμωξης διά μέσου της αιματογενούς οδού.

Σημαντικό ρόλο στην πρόκληση λοίμωξης από εμφυτεύματα διαδραματίζει ο σχηματισμός βιομεμβράνης. Η δημιουργία των βιομεμβρανών είναι ένα φυσικό φαινόμενο που δεν περιορίζεται μόνο στον άνθρωπο αλλά επεκτείνεται σε όλο το περιβάλλον και παρ' όλο που ο ρόλος τους δεν είναι απόλυτα αποσαφηνισμένος, σε μεγάλο βαθμό σχετίζεται με μια «κοινωνικοποίηση» των μικροοργανισμών, που έχει μεταξύ άλλων ως αποτέλεσμα την επιβίωση των μικροβίων σε αφιλόξενα περιβάλλοντα. Αφιλόξενο περιβάλλον για τους μικροοργανισμούς αποτελούν και οι επιφάνειες των εμφυτευμάτων εξ αιτίας της σχετικής ένδειας θρεπτικών ουσιών για τα μικρόβια, της ανοσιακής απάντησης του ξενιστή (κυτταρική και χυμική ανοσία), καθώς και της δράσης των αντιμικροβιακών παραγόντων.

4. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΕΜΦΥΤΕΥΜΑΤΑ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Σκοπός της διάγνωσης των λοιμώξεων από εμφυτεύματα είναι η βελτίωση της πρόγνωσης της λοίμωξης και όσον αφορά στην περιπροθετική λοίμωξη είναι η αύξηση των πιθανοτήτων διατήρησης της πρόθεσης και της κινητικότητας της άρθρωσης. Η διάγνωση της περιπροθετικής λοίμωξης βασίζεται στα κλινικά σημεία της, σε απεικονιστικές, ραδιοϊσοτοπικές και μικροβιολογικές εξετάσεις.

4.1. Συμβατικές μικροβιολογικές εξετάσεις

Στις συμβατικές μικροβιολογικές εξετάσεις, συνοπτικά, περιλαμβάνονται η CRP ορού αίματος, η ΤΚΕ, ο αριθμός και ο τύπος των λευκών αιμοσφαιρίων, οι οποίες συνιστάται να μετρώνται αλλά είναι μη ειδικές,² η προκαλσιτονίνη (PCT), η οποία έχει υψηλή ειδικότητα (περίπου 98%) αλλά χαμηλή ευαισθησία (33%),³ ενώ οι αιμοκαλλιέργειες είναι συχνά αρνητικές λόγω προηγηθείσας χορήγησης εμπειρικής αντιμικροβιακής θεραπείας.⁴ Οι ανωτέρω εξετάσεις συνιστώνται να εκτελούνται, αλλά η συμβολή τους στην ορθή διάγνωση είναι περιορισμένη.

Ειδικότερες εξετάσεις για την επίτευξη της διάγνωσης περιπροθετικών λοιμώξεων αποτελούν οι καλλιέργειες δειγμάτων που λαμβάνονται είτε προεγχειρητικά, π.χ. αρθρικό υγρό, είτε διεγχειρητικά, όπως οστικά δείγματα περιπροθετικής περιοχής. Η καλλιέργεια του αρθρικού υγρού έχει χαμηλή ευαισθησία (55%)⁵ λόγω του εγκλωβισμού των μικροοργανισμών στη βιομεμβράνη, αλλά βοηθά στην εξακρίβωση μιας σηπτικής ή άσηπτης κατάστασης.

Η καλλιέργεια του περιπροθετικού ιστού αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς.⁵ Πρέπει να σημειωθεί ότι στο 60–70% των ιστικών δειγμάτων με τεκμηριωμένη λοίμωξη αναπτύσσονται μικροοργανισμοί κατά την καλλιέργεια. Επίσης, είναι δύσκολη η διάκριση μεταξύ λοίμωξης και επιμόλυνσης λόγω της ομοιότητας των μικροοργανισμών που προκαλούν τις περιπροθετικές λοιμώξεις με αυτούς της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος.

Για τη διάκριση της λοίμωξης από την επιμόλυνση απαιτείται η λήψη μεγάλου αριθμού περιπροθετικών ιστικών δειγμάτων, τουλάχιστον 5 από περιοχές του οστού που οπτικά φλεγμαίνουν, γιατί όταν σε ένα δείγμα αναπτύσσεται κάποιος μικροοργανισμός τότε η πιθανότητα ψευδώς θετικού αποτελέσματος ανέρχεται στο 30%, ενώ η ανάπτυξη του ίδιου μικροοργανισμού σε 5 δείγματα περιορίζει την πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων σε <5%. Σε ανάπτυξη του ίδιου μικροοργανισμού σε >2 δείγματα, η ευαισθησία της μεθόδου αναφοράς ανέρχεται στο 71% και η ειδικότητα στο 97%.⁵

5. Η ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΥΠΕΡΗΧΩΝ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ ΕΜΦΥΤΕΥΜΑΤΑ

Η χρήση των υπερήχων συνέβαλε σημαντικά στη βελτίωση της μεθοδολογίας ανίχνευσης μικροοργανισμών που αποικίζουν τα εμφυτεύματα με τη μορφή βιομεμβρανών σε ορθοπαιδικά⁶ αλλά και σε άλλου είδους εμφυτεύματα,⁵ που χειρουργικά και άσηπτα απομακρύνονται. Στη μέθοδο αυτή, οι υπέρηχοι χρησιμοποιούνται για την αποκόλληση

των μικροβίων που είναι εμπεδωμένα στη βιομεμβράνη του εμφυτεύματος (προσκολλημένη μορφή),¹⁸ τα οποία μετά από καλλιέργειά τους στα θρεπτικά υλικά μετατρέπονται σε ελεύθερη (πλαγκτονική) μορφή επανακτώντας άμεσα ή σταδιακά το φυσιολογικό τους φαινότυπο.^{10,17}

Η επίδραση των υψηλής συχνότητας (>100 kHz) και ακουστικής έντασης υπερήχων στους μικροοργανισμούς έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των μικροοργανισμών, ιδιαίτερα των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Όταν όμως επιδρούν υπέρηχοι χαμηλής συχνότητας (20–100 kHz) στα πρώτα 5 min, δεν υπάρχει σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα των μικροβίων. Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί ότι αναπτύσσονται οι Gram-θετικοί κόκκοι πιο εύκολα γιατί καταστρέφονται οι συσσωματώσεις τους ή διασπώνται οι άλυσοί τους, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η επιφάνειά τους κι έτσι μπορούν να προσλαμβάνουν περισσότερα θρεπτικά στοιχεία.⁷

Η υπερήχηση του αποικισμένου εμφυτεύματος με χαμηλής συχνότητας υπερήχους έχει ως αποτέλεσμα τη λήψη ζωντανών μικροβίων που προέρχονται από τη βιομεμβράνη του μολυσμένου εμφυτεύματος, στα οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί καλλιέργεια, ταυτοποίηση και έλεγχος ευαισθησίας έναντι διαφόρων αντιμικροβιακών παραγόντων με τις κλασικές μεθόδους.

Τα είδη των εμφυτευμάτων στα οποία μπορούν να εφαρμοστούν οι υπέρηχοι είναι τα ορθοπαιδικά εμφυτεύματα (ενδοπροθέσεις αρθρώσεων, σύνδεσμοι εσωτερικής οστεοσύνθεσης), τα μαστικά εμφυτεύματα, οι εσωτερικές νευροχειρουργικές αναστομώσεις, οι καρδιολογικές ηλεκτροφυσιολογικές συσκευές (βηματοδότες, εμφυτευμένοι καρδιακοί απινιδωτές) και γενικά παρόμοια εμφυτεύματα, τα οποία άσηπτα απομακρύνονται από το σώμα.

Δείγματα τα οποία δεν μπορούν να ελεγχθούν με τη χρήση υπερήχων είναι γενικά βιολογικοί ιστοί, όπως οστικά τεμάχια (π.χ. απολύματα), μαλακά μόρια κ.λπ. Υλικά που μπορούν να ελεγχθούν με τη χρήση υπερήχων υπό περιορισμούς είναι τα προερχόμενα από μη στείρες περιοχές του σώματος, όπως σπόγγοι συστημάτων αναρρόφησης υπό αρνητική πίεση, αγγειακοί καθετήρες και εξωτερικές παροχετεύσεις εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY).

Ένα σημαντικό πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπίζεται είναι οι ενδεχόμενες επιμολύνσεις που μπορεί να συμβούν κατά την τοποθέτηση και μεταφορά των δειγμάτων. Γι' αυτό, θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση σάκων για τη μεταφορά των εμφυτευμάτων γιατί έχουν ενοχοποιηθεί για υψηλό κίνδυνο επιμολύνσεων.⁸ Επίσης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα δοχεία διαφόρων μεγεθών και με ανάλογο του υπό εξέταση εμφυτεύματος μέγεθος, τα οποία κλείνουν αεροστεγώς, είναι κατασκευασμένα

από προπυλένιο κι έτσι μπορούν να αποστειρωθούν με το πέρασμα των χειρισμών. Εντός των συγκεκριμένων δοχείων το δείγμα διατηρείται για 3 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου. Επισημαίνεται ότι όλες οι διαδικασίες χειρισμού του δείγματος πρέπει να λαμβάνουν χώρα εντός θαλάμου βιοασφάλειας (νηματικής ροής).

Όταν το εμφύτευμα είναι μικρού μεγέθους (π.χ. οδοντικό εμφύτευμα, βίδα κ.λπ.) καλύπτεται εντός του ειδικού δοχείου μεταφοράς πλήρως με διάλυμα Ringer ή 0,9% NaCl. Όταν το εμφύτευμα είναι μεγάλου μεγέθους, τότε πρέπει να καλύπτεται το 80–90% του εμφυτεύματος με ένα από τα προαναφερθέντα διαλύματα κι αυτό για να αποφεύγεται η μεγάλη αραίωση του μικροβιακού φορτίου που απελευθερώνεται από τη βιομεμβράνη. Ακολουθεί έντονη χειρωνακτική ή μηχανική (vortex) ανακίνηση για 30 sec περίπου του κλειστού δοχείου με το εμφύτευμα και το διάλυμα, γιατί με τη μερική απαέρωση του διαλύματος που έτσι επιτυγχάνεται οι υπέρηχοι θα είναι πιο αποτελεσματικοί στη δράση τους. Κατόπιν τοποθετείται το δοχείο σε ειδικό υδατόλουτρο όπου γίνεται εφαρμογή των υπερήχων, συχνότητας 35–40 kHz για 1 min. Ακολουθεί νέα έντονη ανακίνηση για 30 sec περίπου, όπως προηγουμένως, προκειμένου να αποκολληθούν οι υπολειπόμενοι εμπεδωμένοι μικροοργανισμοί της βιομεμβράνης. Έτσι, δημιουργείται ένα νέο δείγμα, το οποίο είναι ένα εμπλουτισμένο υγρό με τους αποκολλημένους μικροοργανισμούς της βιομεμβράνης ή υγρό εμπλουτισμένο με τη χρήση των υπερήχων ή υγρό υπερήχησης (sonication fluid).

Το διάλυμα Ringer αλλά και ο στείρος φυσιολογικός ορός είναι κατάλληλα για την εφαρμογή των υπερήχων, γιατί τα μικρόβια ή οι μύκητες της βιομεμβράνης επιβιώνουν αλλά δεν πολλαπλασιάζονται εντός των διαλυμάτων. Εδώ θα πρέπει όμως να αναφερθεί ότι το διάλυμα Ringer είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που διατηρεί σταθερό το pH 7, ενώ ο φυσιολογικός ορός δεν έχει αυτή την ιδιότητα και το pH μπορεί να εμφανίζει διακυμάνσεις. Αυτό πιθανόν να επηρεάζει τη βιωσιμότητα ορισμένων μικροβίων, τα οποία είναι περισσότερο ευαίσθητα σε αλλαγές του pH. Γι' αυτό και προτιμότερη είναι η χρήση του διαλύματος Ringer στην κατεργασία του εμφυτεύματος με τους υπερήχους.

Στο εμπλουτισμένο υγρό με τα βακτήρια της βιομεμβράνης μπορούν να εφαρμοστούν (α) οι συμβατικές μέθοδοι μικροβιολογικής διάγνωσης (καλλιέργεια του υγρού, ταυτοποίηση των απομονώσεων και έλεγχος ευαισθησίας στους διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες), (β) μοριακές τεχνικές, καθώς και (γ) να χρησιμοποιηθεί το νέο δείγμα μας στη βασική έρευνα (π.χ. για έλεγχο της έκφρασης γονιδίων από βακτήρια που διαβιούν εντός της βιομεμβράνης).

Πριν από την καλλιέργεια του εμπλουτισμένου δείγματος καλό είναι να γίνεται μεταφορά 10 mL υγρού σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Falcon για πιθανή χρήση του ως παρακαταθήκη (stock) ή και για τις μοριακές τεχνικές.

Η Gram χρώση του εμπλουτισμένου υγρού έχει ειδικότητα 100% αλλά η ευαισθησία της είναι 44,7%,⁶ γι' αυτό και δεν συνιστάται.

Η ποσοτική καλλιέργεια του δείγματος περιλαμβάνει ενοφθαλμισμό 100 μ L υγρού σε στερεά θρεπτικά υλικά, καθώς και 3–4 mL υγρού σε θειογλυκολικό ζυμό στις ακόλουθες συνθήκες: Blood agar: αερόβια σε 37 °C έως 5 ημέρες, anaerobic sheep blood agar: αναερόβια σε 37 °C έως 7 ημέρες, chocolate agar: 5% CO₂ σε 37 °C έως 5 ημέρες, Brucella agar: 5% CO₂ σε 37 °C έως 10 ημέρες, thioglycolate broth: σε 37 °C έως 10 ημέρες.

Εάν δεν παρατηρηθεί κάποια ανάπτυξη στα τρυβλία, τότε εφαρμόζεται ανακαλλιέργεια του θειογλυκολικού ζυμού σε Blood και Brucella agar. Τα τρυβλία ελέγχονται καθημερινά για μικροβιακή ανάπτυξη. Εάν παρατηρηθεί ανάπτυξη, αναφέρεται ο αριθμός CFU κάθε διαφορετικής μορφολογίας και ακολουθεί ταυτοποίηση και έλεγχος ευαισθησίας με τις μεθόδους που έχει επιλέξει το κάθε εργαστήριο.

Η αναφορά αποτελεσμάτων γίνεται ποσοτικά. Ο αριθμός των CFU ανά τρυβλίο πολλαπλασιάζεται επί 10 και το αποτέλεσμα εκφράζεται ως CFU/mL εμπλουτισμένου υγρού.

5.1. Όρια θετικότητας και ερμηνεία του αποτελέσματος

Ως θετικό θεωρείται κάθε αποτέλεσμα ≥ 10 CFU/mL (optimal cut-off).

Σύμφωνα με μελέτη των Trampuz et al,⁶ τα όρια θετικότητας σε καλλιέργεια εμπλουτισμένου υγρού με υπερήχους που προέρχεται από ορθοπαιδικές προθέσεις θα πρέπει να είναι ≥ 50 CFU/mL (ideal cut-off), γιατί είναι σημαντικότερη για τη διάγνωση της περιπροθετικής λοίμωξης η αύξηση της ειδικότητας της μεθόδου –φθάνει στο 98,8%– από τη σχετικά μικρή μείωση της ευαισθησίας, η οποία φθάνει στο 78,5%.⁶ Έτσι, με την αύξηση αυτή του ορίου θετικότητας του αποτελέσματος μειώνονται σημαντικά ψευδώς θετικά αποτελέσματα τα οποία προέρχονται από πιθανές επιμόλυνσεις.⁶ Επισημαίνεται επίσης ότι το ιδανικό όριο θετικότητας των ≥ 50 CFU/mL αναφέρεται για το ίδιο είδος κάθε μικροοργανισμού που αναπτύσσεται στο τρυβλίο της αερόβιας, μικροαερόφιλης ή αναερόβιας καλλιέργειας.

Με βάση λοιπόν την αξιολόγηση-πρόταση της ανωτέρω ερευνητικής ομάδας, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της καλλιέργειας εμπλουτισμένου υγρού με υπερήχους προερ-

χόμενου από εμφυτεύματα μπορεί να συνοψιστεί ως εξής: Η συγκέντρωση ≥ 50 CFU/mL είναι συνήθως σημαντική.⁶ Συγκέντρωση 10–40 CFU/mL πρέπει να συνεκτιμηθεί με βάση την κλινική κατάσταση του ασθενούς. Εάν μόνον ο θειογλυκολικός ζυμός είναι θετικός, το αποτέλεσμα είναι συνήθως μη σχετικό και εξαιρείται. Αυτό αποτελεί επιπρόσθετο βήμα της συγκεκριμένης μεθοδολογίας ελέγχου πιθανής επιμόλυνσης κατά το χειρισμό του δείγματος (λήψη, μεταφορά, επεξεργασία).

Η καλλιέργεια του εμπλουτισμένου υγρού υπερήχησης έχει παρόμοια ειδικότητα (98% έναντι 95,1%) αλλά μεγαλύτερη ευαισθησία (66,7%) συγκριτικά με την καλλιέργεια του αντίστοιχου περιπροθετικού ιστού (54,5%) σε αρθροπλαστικές της κατ'ώμου άρθρωσης.¹¹ Επίσης, η καλλιέργεια του υγρού υπερήχησης υπερέχει σημαντικά ως προς την ευαισθησία έναντι της μεθόδου αναφοράς (καλλιέργεια του αντίστοιχου περιπροθετικού ιστού) όταν η διακοπή της αντιμικροβιακής αγωγής είναι <14 ημερών.⁶ Επιπρόσθετα, προκύπτουν σχετικά ταχέα αποτελέσματα (1 έναντι 3 ημερών με τις περιπροθετικές ιστικές καλλιέργειες) και πραγματοποιείται ευκολότερα η ανίχνευση πολυμικροβιακών λοιμώξεων και η απομόνωση σχετικά δύσκολα απομονούμενων βακτηρίων, όπως π.χ. είδη *Protonibacterium* κ.ά.

Μερικές φορές προκύπτουν και διαφορετικές δοκιμασίες ευαισθησίας για τον ίδιο μικροοργανισμό από διακριτές του απομονώσεις.

5.2. Περιορισμοί της μεθοδολογίας των υπερήχων στη μικροβιολογική διάγνωση

Η χρήση των υπερήχων και η καλλιέργεια των δειγμάτων εμπλουτισμένου υγρού παρουσιάζουν ορισμένους περιορισμούς, οι οποίοι συνοπτικά είναι οι εξής: (α) Δεν μπορούν να ελεγχθούν με τους υπερήχους βιολογικά δείγματα, όπως οστικά τεμάχια (π.χ. απολύματα) ή μαλακά μόρια. (β) Υπό περιορισμούς μπορούν να ελεγχθούν υλικά προερχόμενα από μη στείρες περιοχές του σώματος (π.χ. σπόγγοι συστημάτων αναρρόφησης υπό αρνητική πίεση, εξωτερικές παροχετεύσεις ENY, αγγειακοί καθετήρες). Η καλλιέργεια του εμπλουτισμένου υγρού με υπερήχους προερχόμενου από αγγειακού καθετήρες δεν πλεονεκτεί έναντι της ημιποσοτικής καλλιέργειας κατά Maki.⁹ (γ) Η συγκεκριμένη μεθοδολογία δεν έχει σχεδιαστεί να ανιχνεύει μυκοβακτηρίδια. (δ) Μεγάλα σε μέγεθος εμφυτεύματα δεν είναι δυνατόν να τοποθετηθούν και να κατεργαστούν εντός των αεροστεγών κλεισμένων και αποστειρωμένων δοχείων εξ αιτίας του μεγέθους τους. (ε) Εάν υπάρχει ιστός προσκολλημένος πάνω στο εμφύτευμα κατά την κατεργασία του με τους υπερήχους, αυξάνεται ο κίνδυνος επιμόλυνσης.

(στ) Μερικές φορές μπορεί να παρουσιαστεί δυσκολία στην ταυτοποίηση βακτηριακών ειδών λόγω ύπαρξης αποικιών με (i) διαφορετικές μορφολογίες, πιθανόν λόγω της αλλαγής από τη φάση της στασιμότητας των βακτηρίων που ανευρίσκονται εντός της βιομεμβράνης στη φάση της ανάπτυξης κατά την καλλιέργεια στα καλλιεργητικά υλικά, (ii) διαφορετικές βιοχημικές αντιδράσεις και διαφορετική κινητικότητα, αφού διαφορετικά γονίδια εκφράζονται στα βακτήρια εντός της βιομεμβράνης σε σύγκριση με τα βακτήρια που απαντώνται σε πλαγκτονική μορφή.

Το ανωτέρω πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί σχετικά εύκολα στο εργαστήριο με ανακαλλιέργειες των βακτηρίων, γιατί έτσι οι μικροοργανισμοί επανέρχονται στο φυσικό τους φαινότυπο και επανακτούν την κινητικότητα και τις κυριότερες βιοχημικές ιδιότητές τους σε μεγάλο βαθμό.¹⁰ Μέθοδος αναφοράς για την αντιμετώπιση του ανωτέρω μειονεκτήματος είναι η αλληλούχηση του 16S rDNA του βακτηρίου με πιθανές κάποιες πρόσθετες εξετάσεις (π.χ. συγκολλητινοαντίδραση για τη διάκριση μεταξύ των αλληλουχιών των ειδών *E. coli* και *Shigella*).¹⁰

5.3. Μοριακές τεχνικές σε συνδυασμό με τη χρήση εμπλουτισμένου υγρού υπερήχησης

Οι μοριακές τεχνικές δεν έχουν ακόμη καθιερωθεί ως μέθοδοι αναφοράς στη διαγνωστική προσέγγιση των σχετιζομένων με εμφυτεύματα λοιμώξεων, αλλά σίγουρα στο μέλλον θα έχουν πιο ευρεία χρήση. Ακολουθεί μια συνοπτική κριτική προσέγγιση της εφαρμογής των εν λόγω μεθόδων σε συνδυασμό με εμπλουτισμένα δείγματα υγρού υπερήχησης αναφορικά με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους, καθώς και τις πιθανές εφαρμογές ή βελτιώσεις που θα πρέπει να αποκτήσουν:

Η απλή ή ειδική PCR έχει υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία ανιχνεύοντας μόνο ένα είδος μικροοργανισμού. Γι' αυτό και είναι δύσκολη η εφαρμογή της στη διάγνωση πολυμικροβιακών λοιμώξεων, όπως πολύ συχνά συμβαίνει με τις λοιμώξεις από εμφυτεύματα.

Η ευρέος φάσματος PCR (broad range PCR) εμφανίζει σημαντικά μειονεκτήματα στη διάγνωση των περιπροθετικών λοιμώξεων: (α) Έχει μικρότερη ευαισθησία (50%) και ειδικότητα από την PCR,¹² (β) απαιτεί την ανεύρεση της αλληλουχίας του 16S rDNA, γεγονός που καθιστά αναγκαία τη διαθεσιμότητα και της απαιτούμενης υψηλής τεχνολογίας υλικοτεχνικής υποδομής (π.χ. automated sequencers κ.λπ.), (γ) ανιχνεύει μολυσματικούς παράγοντες οι οποίοι ανήκουν στο ίδιο είδος μικροοργανισμών που προκαλούν χαμηλής έντασης λοιμώξεις (low grade infections), όπως συμβαίνει σε υψηλό ποσοστό στις περιπροθετικές λοιμώ-

ξεις. (δ) Επιπρόσθετο εγγενές μειονέκτημα της ανωτέρω μεθόδου είναι η δυσκολία διάκρισης αληθώς και ψευδώς θετικών ευρημάτων PCR^{13,14} και (ε) η αποτυχία ανίχνευσης μεικτών λοιμώξεων.

Η ανωτέρω τεχνική πιθανόν θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε αρνητικές καλλιέργειες εμπλουτισμένων υγρών υπερήχησης.¹⁵

Η εφαρμογή σε δείγματα εμπλουτισμένου υγρού υπερήχησης μιας *πραγματικού χρόνου πολυπλεκτικής PCR* (multiplex real time PCR), σχεδιασμένης να ανιχνεύει και να ταυτοποιεί τα 25 σημαντικότερα είδη βακτηρίων και μυκήτων που προκαλούν μικροβιαμίες (υπάρχουν διαθέσιμα συστήματα του εμπορίου), αυξάνει την ευαισθησία (78%) συγκριτικά με την αντίστοιχη ευαισθησία της καλλιέργειας του εμπλουτισμένου υγρού (62%) ή της καλλιέργειας περιπροθετικού ιστού (65%) σε ασθενείς που ελάμβαναν αντιμικροβιακή αγωγή.¹⁶ Το μειονέκτημα της ανωτέρω μοριακής τεχνικής είναι ότι δεν ανιχνεύει μικρόβια όπως το *Propionibacterium acnes*, είδη *Corynebacterium* και *Peptostreptococcus* ή τη *Fingoldia magna*, που εμπλέκονται στις περιπροθετικές λοιμώξεις. Η τροποποίηση του σχεδιασμού της ανωτέρω μοριακής τεχνικής έτσι ώστε να περιλαμβάνει και εκκινητές (primers) που να ανιχνεύουν τα αναφερόμενα μικρόβια θα μπορούσε να αυξήσει ακόμη περισσότερο την ευαισθησία της μεθόδου και να βελτιώσει τη δυνατότητα της μικροβιολογικής διάγνωσης των περιπροθετικών λοιμώξεων.¹⁶

6. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στόχος της θεραπευτικής αντιμετώπισης της περιπροθετικής λοίμωξης είναι η διάσωση της πρόθεσης (σε πρώιμη μετεγχειρητική λοίμωξη) ή η αναθεώρηση της αρθροπλαστικής σε πρώτο στάδιο ή δεύτερο στάδιο διατηρώντας την κινητικότητα της άρθρωσης με τη χρήση spacer τσιμέντου που περιέχει αντιβιοτικό (συνήθως γενταμικίνη) για την παρεμπόδιση του αποικισμού του με μικρόβια.

Η ακριβής μικροβιολογική διάγνωση των περιπροθετικών λοιμώξεων είναι κρίσιμη γιατί επηρεάζει καθοριστικά την κατεύθυνση της θεραπευτικής αντιμετώπισης (αντιμικροβιακή αντιμετώπιση και χειρουργική αποκατάσταση) και την πορεία της αρθροπλαστικής. Επιπρόσθετα, μη διαγνωσμένες περιπτώσεις περιπροθετικής λοίμωξης μπορεί λανθασμένα να εκληφθούν ως περιπτώσεις άσηπτης χαλάρωσης με, επακόλουθα, λήψη μη ορθών για τον ασθενή θεραπευτικών επιλογών.

Η ταυτοποίηση και ο έλεγχος ευαισθησίας των μικροβίων που προκάλεσαν τη λοίμωξη βοηθά στη χορήγηση στοχευμένης και όχι εμπειρικής αντιμικροβιακής θεραπείας. Η μέθοδος αναφοράς για τη διάγνωση των σχετιζομένων

με προθέσεις λοιμώξεων παραμένει η καλλιέργεια πολλαπλών περιπροθετικών ιστικών δειγμάτων. Ο λανθασμένος όμως τρόπος δειγματοληψίας, ο ανεπαρκής αριθμός ιστικών δειγμάτων, ο οποίος δυσκολεύει τη διάκριση μεταξύ αληθώς και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων εξ αιτίας πιθανής επιμόλυνσης, το χαμηλό μικροβιακό φορτίο που δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί στις καλλιέργειες, η προηγούμενη λήψη αντιβιοτικών και η ανικανότητα απόσπασης μικροοργανισμών από την πηγή της λοίμωξης, που είναι η βιομεμβράνη, περιορίζουν σημαντικά τις δυνατότητες της μεθόδου αναφοράς να οδηγήσει στην ορθή διάγνωση.

Η εφαρμογή των χαμηλής έντασης και συχνότητας υπερήχων (35–40 kHz) βελτιώνει τις δυνατότητες για ακριβή μικροβιολογική διάγνωση των σχετιζομένων με εμφυτεύματα λοιμώξεων. Όπως έχει δείχθει έως σήμερα, η καλλιέργεια του υγρού υπερήχησης των εξαχθέντων αποικισμένων με μικροοργανισμούς εμφυτευμάτων είναι περισσότερο ευαίσθητη και ειδική σε σχέση με τις συμβατικές καλλιερνητικές μεθόδους που στηρίζονται στην άμεση καλλιέργεια του εμφυτεύματος και τις καλλιέργειες του αρθρικού υγρού⁵ και περισσότερο ευαίσθητη και τουλάχιστον εφάμιλλη ως προς την ειδικότητα (ειδικότητα με χρήση υπερήχων 98% έναντι 95,1% της ιστικής καλλιέργειας)¹¹ σε σχέση με τη μέθοδο αναφοράς. Τόσο οι εξαχθείσες προθέσεις όσο και τα δείγματα περιπροθετικού ιστού μπορεί να επιμολυνθούν στο χειρουργικό πεδίο αλλά και κατά τους χειρισμούς στο μικροβιολογικό εργαστήριο.

Η μεθοδολογία της υπερήχησης των εμφυτευμάτων με την ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος της καλλιέργειας των μικροοργανισμών του εμπλουτισμένου υγρού βοηθά περισσότερο στη διάκριση μεταξύ των επιμολύνσεων και των λοιμώξεων που σχετίζονται με τα εμφυτεύματα.

Η μέθοδος της υπερήχησης του εμφυτεύματος είναι επίσης σημαντικά πιο ευαίσθητη από την καλλιέργεια του

περιπροθετικού ιστού, ιδιαίτερα σε ασθενείς που διέκοψαν την αντιμικροβιακή αγωγή για διάστημα <14 ημερών πριν από την εξαγωγή της πρόθεσης.⁶ Η μεγαλύτερη αυτή ευαισθησία που παρουσιάζει η μεθοδολογία της υπερήχησης πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι τα πλαγκτονικά μικρόβια που είναι παρόντα στον ιστό είναι περισσότερο ευαίσθητα στους αντιμικροβιακούς παράγοντες συγκριτικά με τα μικρόβια που προέρχονται από τη βιομεμβράνη και αποκολλήθηκαν με την εφαρμογή των υπερήχων. Επί πλέον, η εφαρμογή των υπερήχων σε συνδυασμό με τις μοριακές τεχνικές αυξάνει τη διαγνωστική ευαισθησία, ιδιαίτερα σε ασθενείς που λαμβάνουν αντιμικροβιακή αγωγή.¹⁶

Η αυξημένη ευαισθησία της μεθοδολογίας των υπερήχων παρέχει περισσότερα δεδομένα για να μπορεί να εφαρμοστεί συχνότερα η στοχευμένη αντιμικροβιακή αντί της εμπειρικής αγωγής. Η δυνατότητα της μεθόδου να ανιχνεύει ευκολότερα πολυμικροβιακές λοιμώξεις και σχετικά δύσκολα στην απομόνωσή τους βακτήρια μπορεί να συνδράμει περισσότερο στην επιλογή του καταλληλότερου αντιβιοτικού για την προσθήκη του σε εξατομικευμένα (custommade) spacer τιμέντου, για την αποτελεσματικότερη πρόληψη αποικισμού από τα συγκεκριμένα μικρόβια. Επίσης, η δυνατότητα της μεθόδου ανίχνευσης ετερογένειας αντοχής σε μικροβιακούς πληθυσμούς μπορεί να μειώσει θεραπευτικές αποτυχίες της χορηγούμενης αντιμικροβιακής αγωγής.

Η καλλιέργεια του υγρού υπερήχησης αποτελεί μια οικονομική, απλή, εύχρηστη, ποσοτική μέθοδο, η οποία υπερβαίνει τα προβλήματα των επιμολύνσεων που δυσχεραίνουν την εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων, ιδιαίτερα στα ορθοπαιδικά εμφυτεύματα. Η ορθή εφαρμογή της μεθοδολογίας των υπερήχων αποτελεί προϋπόθεση για την επιτυχή χρήση τους στη μικροβιολογική διαγνωστική των λοιμώξεων από εμφυτεύματα.

ABSTRACT

The contribution of implant sonication to the conventional and molecular methods for microbiological diagnosis of implant associated infections

A. STYLIANAKIS,¹ A. TSAKRIS²

¹Microbiology Laboratory, "KAT" Hospital, and ESCMID Study Group of Implant Associated Infections, Athens,

²Department of Microbiology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2012, 29(6):688–694

This is a review of clinical and laboratory aspects of implant associated infections, with an emphasis to the periprosthetic infections. The conventional microbiological methods for diagnosis of these infections are described and the diagnostic contribution of sonication is detailed. Solutions to possible problems related to performance and evaluation of the sonication method are proposed and the application of molecular methods to the sonication fluid sam-

ples is described. Sonication of implants by low frequency ultrasound is a simple method with low cost which improves the microbiological diagnosis of implant-associated infections. The combination of the sonication method with molecular techniques may further improve the sensitivity and the efficacy of microbiological diagnosis of implant associated infections.

Key words: Implant-associated infections, Microbiological diagnosis, Multiplex real time PCR, Prosthesis, Sonication, Standard operating procedures

Βιβλιογραφία

- DAROUICHE RO. Device-associated infections: A macroproblem that starts with microadherence. *Clin Infect Dis* 2001, 33:1567–1572
- BILGEN O, ATICI T, DURAK K, KARAEMINOĞULLARI O, BILGEN MS. C-reactive protein values and erythrocyte sedimentation rates after total hip and total knee arthroplasty. *J Int Med Res* 2001, 29:7–12
- BOTTNER F, WEGNER A, WINKELMANN W, BECKER K, ERREN M, GÖTZE C. Interleukin-6, procalcitonin and TNF-alpha: Markers of periprosthetic infection following total joint replacement. *J Bone Joint Surg Br* 2007, 89:94–99
- PAVONI GL, GIANNELLA M, FALCONE M, SCORZOLINI L, LIBERATORE M, CARLESIMO B ET AL. Conservative medical therapy of prosthetic joint infections: Retrospective analysis of an 8-year experience. *Clin Microbiol Infect* 2004, 10:831–837
- NATIONAL STANDARD METHODS. Investigation of prosthetic joint infections samples. *BSOP* 2009, 44, 1.1
- 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, 357:654–663
- MONSEN T, LÖVGRÉN E, WIDERSTRÖM M, WALLINDER L. *In vitro* effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections. *J Clin Microbiol* 2009, 47:2496–2501
- 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 infections is associated with risk of contamination. *J Clin Microbiol* 2006, 44:628–631
- SLOBBE L, EL BARZOUHI A, BOERSMA E, RIJNDERS BJ. Comparison of the roll plate method to the sonication method to diagnose catheter colonization and bacteremia in patients with long-term tunnelled catheters: A randomized prospective study. *J Clin Microbiol* 2009, 47:885–888
- SENDI P, FREI R, MAURER TB, TRAMPUZ A, ZIMMERLI W, GRABER P. *Escherichia coli* variants in periprosthetic joint infections: Diagnostic challenges with sessile bacteria and sonication. *J Clin Microbiol* 2010, 48:1720–1725
- 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, 47:1878–1884
- DE MAN FH, GRABER P, LÜEM M, ZIMMERLI W, OCHSNER PE, SENDI P. Broad-range PCR in selected episodes of prosthetic joint infection. *Infection* 2009, 37:292–294
- BORST A, BOX AT, FLUIT AC. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: Suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004, 23:289–299
- CORLESS CE, GUIVER M, BORROW R, EDWARDS-JONES V, KACZMARSKI EB, FOX AJ. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* 2000, 38:1747–1752
- NELSON CL, McLAREN AC, McLAREN SG, JOHNSON JW, SMELTZER MS. Is aseptic loosening truly aseptic? *Clin Orthop Relat Res* 2005, 437:25–30
- ACHERMANN Y, VOGT M, LEUNIG M, WÜST J, TRAMPUZ A. Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. *J Clin Microbiol* 2010, 48:1208–1214
- VAN HOUTD R, MICHIELS CW. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol* 2005, 156:626–633
- TUNNEY MM, PATRICK S, GORMAN SP, NIXON JR, ANDERSON N, DAVIS RI ET AL. Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. *J Bone Joint Surg Br* 1998, 80:568–572

Corresponding author:

A. Stylianakis, Laboratory of Microbiology, "KAT" Hospital, 2 Nikis street, GR-145 61 Kifisia, Greece
e-mail: astylianakis@hotmail.com