

Molekulární diagnostika infekcí kloubních náhrad

Molecular Diagnostics for the Detection of Prosthetic Joint Infection

J. GALLO¹, P. SAUER², M. DENDIS³, Y. LOVEČKOVÁ², M. KOLÁŘ², J. ZAPLETALOVÁ⁴, V. JANOUT⁵

¹ Ortopedická klinika LF UP a FN Olomouc

² Ústav mikrobiologie LF UP a FN Olomouc

³ Genex CZ, s.r.o., Brno

⁴ Ústav biofyziky LF UP v Olomouci, pracoviště biometrie

⁵ Ústav preventivního lékařství LF UP v Olomouci

ABSTRACT

PURPOSE OF THE STUDY

Ten years after inauguration of the molecular methods into the orthopaedic practice for diagnosing Prosthetic Joint Infection (PJI), this approach is still in the limelight of research and discussion. The aim of the current study was to determine the diagnostic power of our Polymerase Chain Reaction (PCR) protocol for preoperative detection of bacterial nucleic acid in the synovial joint fluid.

MATERIAL AND METHODS

Synovial fluids obtained from thirty-five septic hip or knee arthroplasties and sixty-six aseptic controls were investigated by the conventional PCR technique. Two subgroups were established with regard to antibiotic administration before sample collection; with (n=13) and without (n=22) previous antibiotic exposition, respectively. All the surgeries were performed under the identical conditions with strictly established and fulfilled inclusion criteria. The study design applied was a prospective cohort trial. Primers targeting phylogenetically conserved regions of the bacterial gene were used to detect the bacterial 16SrRNA gene in the retrieved samples. If this was positive, a restriction endonuclease treatment of the amplified DNA was performed to reveal the PJI pathogen. Current guidelines were used to evaluate the test performance, including the confidence intervals. The concordance between the culture and PCR identification of PJI pathogens was estimated providing both of the relevant data were available.

RESULTS

A qualitative analysis showed the following figures in the subgroup without previous antibiotic exposition: sensitivity (0.64), specificity (0.97), accuracy (0.89), positive predictive value (0.88), negative predictive value (0.89), likelihood ratio for positive result (21.0), and likelihood ratio for negative result (0.38). In the second subgroup the corresponding figures were as follows: 0.85, 0.97, 0.95, 0.85, 0.97, 27.9, and 0.16. The rate of concordance between the microbial and PCR findings was almost identical in both of the subgroups.

DISCUSSION

There were large discrepancies in sensitivity and positive predictive values found in the published results. The earlier studies have had various methodological weaknesses, including a lack of strictly formulated inclusion criteria and control groups. In addition, there are differences among research centers in PCR laboratory procedures and specimen retrieval tactics which may potentially have an impact on PCR results. Low sensitivity and high specificity of our PCR technique may be explained by both the intrinsic (DNA extraction protocol, configuration of inner controls, choice of detection threshold, etc.) and extrinsic factors (in particular intra-operative retrieval of specimens). A hypothesis on the inadequacy of PCR techniques for PJI detection still remains to be excluded.

CONCLUSION

Based on the current study, the positive results of our PCR technique may be perceived as a mild criterion from the point of power for PJI diagnosis support. However, its clinical utility should be significantly increased in cases with higher pre-test probability of PJI, but negative cultures.

Key words: prosthetic joint infection, deep sepsis, PCR, 16S rDNA gene, diagnostics, total joint replacement.

ÚVOD

Infekce kloubní náhrady (dále PPI – periprotetická infekce) zůstává přes veškeré pokroky v prevenci a terapii obávanou „vadou na kráse“ endoprotetiky (12). Obvykle je definována jako replikace bakterií na povrchu implantátu nebo v jeho okolí, která vede k poškození tkání hostitele s lokální či celkovou reakcí organismu (5). Prevalence této komplikace se na špičkových pracovištích pohybuje pod úrovní 1 %, častěji však dosahuje vyšších hodnot (20). Z hlediska „snadnosti“ diagnózy jsou rozlišovány infekce klinicky jednoznačné a skryté, které je nutno více či méně složitě dokazovat (4). Podle našich zkušeností lze za pomoci standardních nástrojů stanovit důvěryhodnou diagnózu PPI u více než 2/3 případů. Přibližně jedna třetina diagnóz zůstává nejistá a může být předmětem sporu, protože chybí výsledková shoda. Existují i případy, které jsou považovány za aseptické, přestože jsou ve skutečnosti septické (24).

Prvním úkolem ortopeda je potvrzení nebo vyloučení infekce jako příčiny selhávání endoprotézy. K tomu účelu bylo navrženo několik algoritmů a testována řada metod (11, 12). Avšak kromě nálezu hnisu v kloubu nebo pístěle komunikující s kloubem neexistuje žádný jiný test, který by dokázal podepřít diagnózu PPI jednoznačně. Spíše lze konstatovat, že pozitivní výsledky klinického vyšetření a laboratorních či zobrazovacích metod podporují diagnózu PPI nebo naopak. Přitom důsledkem pozitivní interpretace je indikace dvojdobého výkonu (8), zatímco negativní závěr umožňuje provedení revize v jedné době či dokonce jiný méně razantní postup. Druhým závažným úkolem předoperační diagnostiky je identifikace původce infekce. Zde je nutné se spoléhat na rutinní provoz mikrobiologické laboratoře a kultivační průkaz. Podle literatury (2) však může být předoperační mikrobiologické vyšetření punktátu falešně negativní u více než 50 % skutečně infekčních vzorků, což zřejmě souvisí s „biofilmovou“ podstatou PPI.

S úspěchy molekulárně biologických postupů v jiných oborech medicíny se objevila naděje, že by tyto mohly přispět k překonání výše naznačených slabin předoperační diagnostiky PPI a prospět tak pacientům s endoprotézou (16, 22). Molekulární metodiky (v textu dále pouze PCR – Polymerase Chain Reaction) jsou založené na extrakci, amplifikaci a následné detekci konzervativních nebo variabilních úseků bakteriální DNA (5). Jde o časově nenáročnou (řádově několik hodin), vysoce efektivní (postačuje 1 ml vzorku) a velmi citlivé postupy, které nevyžadují robustní laboratorní zázemí. Jako první se pokusili o PCR diagnostiku infekcí kloubních náhrad Mariani a spol. (14), kteří vypracovali metodiku a provedli první klinickou studii u náhrad kolenního kloubu (15). Měli však značné množství falešně pozitivních nálezů (specifita 49 %). Následné pokusy o snížení četnosti falešně pozitivních výsledků kompromitovaly senzitivitu metody (5). Přehlédnout a porovnat stávající literaturu je velmi obtížné, a to nejen kvůli metodologické nejednotnosti (rozdílné laboratorní postupy, design studie, definice PPI), nýbrž i pro publi-

kační styl, nedovolující v řadě případů ani výpočet standardních charakteristik metody (5). Teoreticky nelze vyloučit ani to, že pro oblast PPI nemusí být PCR přístup vhodný.

První práce související s PCR detekcí bakteriální DNA v kloubním výpotku byly na našich pracovištích (Ortopedická klinika, Ústav imunologie, později Ústav mikrobiologie) zahájeny během roku 2001. Cílem předkládané studie je stanovit základní charakteristiky modifikované PCR techniky pro účely předoperační diagnostiky PPI.

MATERIÁL A METODIKA

V období od září 2003 do května 2005 bylo získáno za standardizovaných podmínek celkem 101 vzorků kloubního výpotku od pacientů reoperovaných na Ortopedické klinice (tab. 1). Odběr byl prováděn sterilní punkční jehlou a stříkačkou na aseptickém sále po obnazení kloubního pouzdra. Aspirovaná tekutina byla poté označena a transportována v původní stříkačce na pracoviště provádějící PCR analýzu (Ústav imunologie, Ústav mikrobiologie). Celkem 35 případů (35/101, 34,7 %) bylo vedeno jako infekční selhání totální endoprotézy (TEP) kyčelního nebo kolenního kloubu. Do této skupiny byli zařazeni pacienti, u nichž byla splněna kritéria definující PPI (tab. 2). Tento soubor byl ještě rozdělen podle toho, jestli pacient před operací dostával antibiotika (amoxicilin/kyselina klavulanová, cefuroxim, klindamycin, ciprofloxacin, oxacilin) či nikoli. Průměrná délka podávání antibiotik před odběrem vzorků na PCR vyšetření byla 21 dnů (2-79, SD 22, medián=15). Kontrolní soubor (tab. 1) byl vymezen tak, že jednoznačně nesplňoval parametry septického selhávání (tab. 2) a minimální délka sledování od revize byla u těchto pacientů 15 měsíců. Přehled provedených diagnostických vyšetření je uveden v tabulce 3.

Tab. 1. Přehled základních charakteristik porovnávaných souborů. PPI = periprotetická infekce, ATB = antibiotikum, ASU = aseptické uvolnění, PPOL = periprotetická osteolýza, Me = medián, SD = směrodatná odchylka.

Znak	Kontrola (N=66)	PPI bez ATB (N=22)	PPI s ATB (N=13)
Pohlaví (M/Ž)	25/41	7/15	3/10
Oblast (Kyčel / Koleno)	52/14	7/15	4/9
Věk v době revize (roky) Me	62 (35-80, SD 10,9)	66 (38-74, SD 9,7)	69 (38-77, SD 12,4)
Doba předchozí operace-revize (měsíce) Me	88 (12-240, SD 39,5)	33 (3,7-104, SD 32,7)	8,6 (0,6-153, SD 48,1)
Důvod k revizi	ASU – 25x (38%) PPOL – 38x (58%) Jiný důvod – 3x (5%)	Septické selhání	Septické selhání
Typ infekce		Akutní – 3x (14%) Hematogen. – 6x (27%) Chronická – 12x (55%) Recidivující – 1x (5%)	Akutní – 6x (46%) Hematog. – 1x (8%) Chron. – 4x (31%) Recidiv. – 2x (15%)
Pořadí revize	63x první revize	18x první revize	11x první revize

Tab. 2. Kritéria použitá v této studii k určení periprotetické infekce (PPI). K zařazení mezi PPI byla nutná přítomnost jednoho ze silných znaků, obou standardních znaků nebo současný výskyt 1 standardního a alespoň 2 slabých znaků. FW = sedimentace, CRP = C-reaktivní protein.

Znaky	Popis
Silné	Hnis v kloubu, pšišť komunikující s kloubem
Standardní	Pozitivní kultivace, pozitivní histologický nález
Slabé	Pozitivní anamnéza a klinické vyšetření, FW > 30 mm/hod, CRP > než 1,5 násobek normy, pozitivní scintigrafický obraz při vyšetření značenými leukocyty

Tab. 3. Přehled ostatních vyšetření prováděných v rámci studie s cílem podpořit nebo vyloučit infekci kloubní náhrady. PPI = periprotetická infekce, ATB = antibiotikum, FW = sedimentace, CRP = C-reaktivní protein, Me = medián, SD = směrodatná odchylka.

Znak	Kontrola (N=66)	PPI bez ATB (N=22)	PPI s ATB (N=13)
Kultivace	Pozitivní – 3x Negativní – 63x	Pozitivní – 21x Negativní – 1x	Pozitivní – 11x Negativní – 2x
Histologie	Pozitivní – 1x Negativní – 62x Neděláno – 3x	Pozitivní – 16x Negativní – 5x Neděláno – 1x	Pozitivní – 11x Negativní – 2x
Hodnocení operátora	Pozitivní – 2x Negativní – 64x	Pozitivní – 22x	Pozitivní – 22x
FW (mm/hod)	18 (2-78, SD 14,0)	64 (6-180, SD 39,1)	88 (24-170, SD 44,6)
Me			
CRP (průměr)	V normě – 59x Zvýšené – 7x	147 (9-519, SD 162,4) Me = 61,3	102 (7-307, SD 89,4) Me = 64,3
Scintigrafie značenými leukocyty		Pozitivní – 11x Negativní – 1x Neděláno – 10x	Pozitivní – 7x Neděláno – 6x

PCR vyšetření

Extrakce DNA ze vzorku klinického materiálu byla prováděna za pomoci komerčního kitu QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Německo). DNA byla izolována z 500 µl vzorku a eluována do 50 µl elučního pufru. S vyšetřovaným vzorkem byl zároveň zpracováván pozitivní a negativní vzorek kloubního výpotku sloužící jako pozitivní a negativní izolační kontrola.

Detekce přítomnosti bakteriální DNA ve vzorku byla založena na PCR amplifikaci z primerů komplementárních k fylogeneticky konzervativním úsekům genu kódujícího 16S rRNA (16S rDNA gen) – univerzální detekce bakterií.

PCR reakce o objemu 50 µl obsahovala 25 pmol každého primeru (forward primer RW01: 5' aac tgg agg aag gtg ggg at 3'; reverse primer DG74: 5' tgc ggt tgg atc acc tcc t 3'), 1 × HotStart Taq Master Mix (Qiagen, Německo), 0,7 mM MgCl₂, 100 mM dUTP (Roche Diagnostics, Německo) a 8-methoxypsoralen (Sigma, USA) v konečné koncentraci 25 µg/ml. Po smíchání jednotlivých ingrediencí byla PCR směs inkubována 30 minut při 4 °C a následně 6 minut dekontaminována UV (265 nm) iradiací. Po dekontaminaci byl do PCR přidán PCR MIMIC interní standard (21) a 5 µl vzorku. PCR reakce byla prováděna v termocykleru PTC-200 (MJ Research, USA) za následujících amplifikačních podmínek:

iniciační denaturace 15 minut při 96 °C; následovalo 45 amplifikačních cyklů skládajících se z denaturace při 96 °C 10 sekund, annealing při 58 °C 10 sekund a extenze při 72 °C 30 sekund. Amplifikační program byl ukončen finální extenzí 2 minuty při 72 °C.

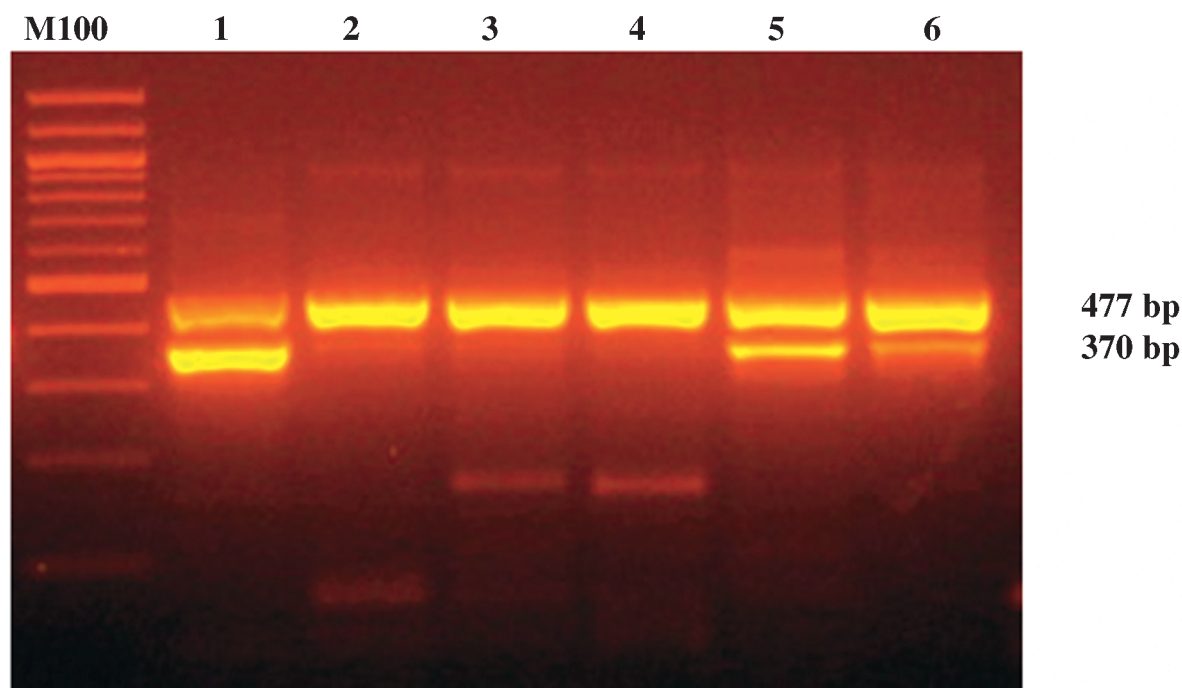
Výsledné amplifikační produkty byly separovány na 2% agarózovém gelu obsahujícím ethidiumbromid (5 µg/ml) při napětí 5V/cm a vizualizovány UV iluminací. V případě pozitivního vzorku byl detekovatelný amplifikační produkt 16S rDNA genu o velikosti 370 bp, zatímco v případě negativního výsledku byl detekován pouze amplifikační produkt PCR MIMIC interního standardu o velikosti 477 bp (obr. 1).

Amplifikační produkty pozitivních vzorků byly dále podrobeny inkubaci s restričními endonukleázami *Hae*III a *Nco*I (New England Biolabs, USA), což umožňovalo bližší druhovou specifikaci pozitivního nálezu (obr. 2).

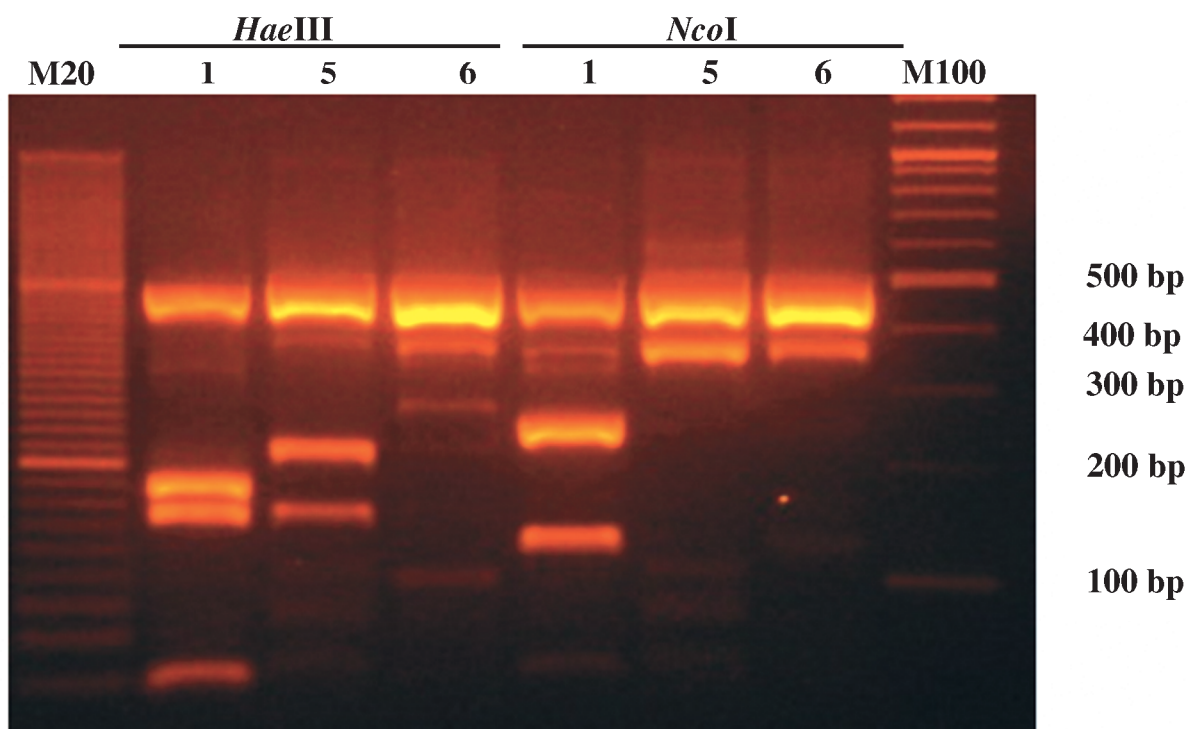
Ostatní vyšetření

Před každou operací bylo provedeno klinické vyšetření a odběry krve na sedimentaci (FW) a stanovení C-reaktivního proteinu (CRP). Klinicky svědčily pro možnou infekci především diskrepance v pooperačním průběhu, lokální nález či teploty (11, 12). Za patologickou byla považována hodnota FW > 30 mm/hodinu. Poněkud složitější byla situace s CRP: jednak existují rozdílné referenční hodnoty z různých laboratoří, jednak není zcela jasné, jak by se měla odlišit významná patologická hodnota od nevýznamné. Nakonec bylo rozhodnuto, že za patologickou bude považována každá hodnota přesahující jeden a půl násobek normy. U pacientů, kteří antibiotika do doby reoperace neužívali, byly odběry na mikrobiologické i PCR vyšetření provedeny před intravenózním podáním antibiotika.

Na bakteriologickou analýzu byly posílány kloubní výpotky, vzorky granulační tkáně a stěry z implantátů, případně kostního lůžka. Transport materiálu proběhl bezprostředně po ukončení odběrů; výpotek v původní stříkačce, granulační tkáň ve sterilní zkumavce a stěr ve speciální transportní půdě (Amies, Dispolab, ČR). Tekuté materiály a vzorky tkání byly hodnoceny mikroskopicky (barvení podle Grama). Bakteriální původci byly diagnostikovány standardními postupy aerobní (krevní, Endův a glukosopeptonový agar včetně půdy pomnožovací, Trios, ČR) i anaerobní (anaerobní krevní agar BHI, Trios, ČR) kultivace za použití komerčně vyráběných identifikačních setů (STAPHYtest 16, Encocustest, ENTEROtest 16, NEFERMtest 24, ANAEROtest 23, Lachema, ČR, Rapid STR, Remel, USA), případně doplňkových testů (7). Kultivační vyšetření bylo považováno za signifikantní, jestliže byla stejná bakterie izolována alespoň ze dvou odběrových materiálů. U většiny pacientů bylo také provedeno histologické vyšetření tkání odebraných z oblasti kloubního pouzdra, resp. aktivního granulomu (haematoxylin-eosin, 10 mikroskopických polí při zvětšení 40x) se standardizovanou interpretací pozorovaných obrazů (17). Vyšetření značenými leukocyty (13) bylo prováděno pouze u pacientů, u nichž bylo diferenciatně diagnostické rozpaky.



Obr. 1. Průkaz přítomnosti genu kódujícího bakteriální 16S rRNA metodou PCR ve vzorcích kloubního výpotku. 2% agarózo-
vá elektroforéza. Jestliže byla ve vzorku přítomna bakteriální DNA, byl detekován PCR amplifikační produkt o velikosti 370
bp. V případě nepřítomnosti bakteriální DNA byl detekován pouze amplifikační produkt MIMIC interního standardu o velikosti
477 bp. Dráhy č. 1, 5 a 6 – výsledek amplifikace pozitivních vzorků; dráhy č. 2, 3 a 4 – výsledek amplifikace negativních vzor-
ků; M100 – 100 bp velikostní standard.



Obr. 2. Specifikace bakteriálního původce metodou PCR-RFLP. Vzorky kloubního výpotku s prokázanou přítomností 16S rRNA.
2% agarózo-
vá elektroforéza. **Vzorek č. 1** – specifikován jako *Enterobacteriaceae*, protože po inkubaci s restriční endonukleá-
zou (RE) *HaeIII* vznikly fragmenty o velikostech 40, 150 a 180 bp a po inkubaci s RE *NcoI* fragmenty o velikosti 130 a 240 bp.
Vzorek č. 5 – pozitivní na *Streptococcus* sp., neboť inkubace s *HaeIII* vedla k fragmentům o velikostech 155 a 215 bp a RE
NcoI poskytla neštěpený produkt o velikosti 370 bp. **Vzorek č. 6** – pozitivní na *Staphylococcus* sp., neboť RE *HaeIII* a *NcoI*
poskytly neštěpené produkty PCR amplifikace o velikosti 370 bp. M20 – 20 bp velikostní standard. M100 – 100 bp velikostní
standard.

Organizace studie

Jednalo se o prospektivní kohortovou studii, do které byli zařazeni pacienti se selhávající endoprotézou kyčelního nebo kolenního kloubu. Popis vyšetřovacího postupu i metodika rozdělení souboru na infekční a neinfekční případy jsou uvedeny výše. Molekulární biologové provádějící PCR vyšetření neměli k dispozici žádné klinické informace, stejně jako mikrobiolog či histolog. Všechny výsledky byly průběžně dodávány do databáze vedené v programu Excel 2000 (Microsoft). Závěrečné statistické zpracování bylo provedeno nezávisle na dodavateli jednotlivých údajů za pomoci profesionálního statistického softwaru SPSS verze 10.1 (SPSS Inc., USA).

VÝSLEDKY**1. PCR detekce bakteriální DNA u souboru pacientů bez předchozího podání antibiotik (n=22)**

Detekce bakteriální DNA pomocí PCR byla pozitivní u 14 vzorků získaných z infikovaného kloubu. Naopak v osmi případech nedokázala tato technika bakteriální DNA detekovat (falešně negativní výsledky). V kontrolním souboru byly zachyceny pouze dva falešně pozitivní výsledky. Přehled statistických charakteristik účinnosti PCR metody při záchytu bakteriální DNA v kloubním výpotku podává tabulka 4.

Jestliže byla současně pozitivní kultivace, mohla být posouzena shoda mezi bakteriologicky a PCR stanoveným původcem PPI. To bylo možné u 13 ze 14 pozitivních záchytů tzv. univerzální bakterie (průkaz konzervativní sekvence genu pro 16S rRNA). Nálezy se shodovaly u 11 případů (84,6 %). Diskrepance se týkala specifikace stafylokoků, které byly PCR jednou zaměřeny za čeleď *Enterobacteriaceae*, podruhé za streptokoky.

2. PCR detekce bakteriální DNA u pacientů, kteří před odběrem výpotku užívali antibiotika (n=13)

V souboru případů, u nichž byl kloubní punktát odebrán po minimálně dvoudenním podávání antibiotik, nedokázala PCR technika detekovat bakteriální DNA dvakrát (2/13, 15,4 %). Ostatní statistické charakteristiky metody jsou uvedeny v tabulce 5.

Shoda mezi kultivačním záchytem původce infekce a PCR identifikací byla zjištěna u 8 z 10 případů (80 %). K diskrepanci došlo v případě jednoznačného kultivačního nálezu *Pseudomonas aeruginosa*, který byl pomocí PCR určen jako atypická mykobakteria (opakovaně ověřeno), resp. *Streptococcus intermedius*, který byl PCR identifikován jako stafylokok.

Testem rovnosti dvou podílů bylo prokázáno, že rozdíly v senzitivitě PCR detekce tzv. univerzální bakterie nejsou mezi oběma soubory (63,6 % versus 84,6 %) statisticky významné ($p = 0,193$). Stejný závěr potvrzuje i porovnání 95 % intervalů spolehlivosti, které se překrývají (tab. 4, 5).

Tab. 4. Charakteristiky PCR detekce bakteriální DNA ze vzorků kloubních výpotků bez předchozí aplikace antibiotik. PPH = pozitivní prediktivní hodnota, NPH = negativní prediktivní hodnota, LR = likelihood ratio.

	infekty	kontrola	
PCR pozitivní (= infekce)	14	2	16
PCR negativní (non-infekt)	8	64	72
	22	66	88
	95% CI		
Senzitivita	63,6	43,9	80,4
Specifita	97,0	88,5	99,5
Přesnost	88,6	82,0	95,3
PPH	87,5	60,4	97,8
NPH	88,9	78,7	94,7
Falešná pozitivita	3,0	0,8	10,4
Falešná negativita	36,4	19,6	56,1
LR pozitivního testu	21,0	5,7	85,2
LR negativního testu	0,38	0,22	0,65

Tab. 5. Charakteristiky PCR detekce bakteriální DNA ze vzorků kloubních výpotků po předchozí aplikaci antibiotik. PPH = pozitivní prediktivní hodnota, NPH = negativní prediktivní hodnota, LR = likelihood ratio.

	infekty	kontrola	
PCR pozitivní (= infekce)	11	2	13
PCR negativní (non-infekt)	2	64	66
	13	66	79
	95% CI		
Senzitivita	84,6	53,7	97,3
Specifita	97,0	88,5	99,5
Přesnost	94,9	90,1	99,8
PPH	84,6	53,7	97,3
NPH	97,0	88,5	99,5
Falešná pozitivita	3,0	0,8	10,4
Falešná negativita	15,4	2,8	41,0
LR pozitivního testu	27,9	6,99	111,5
LR negativního testu	0,16	0,04	0,57

DISKUSE

Metody založené na práci s nukleovými kyselinami akcelerovaly rozvoj celé řady medicínských oborů a nevyhnuly se ani ortopedii, potažmo diagnostice PPI (11, 14, 16, 19, 22). Před zavedením jakékoli metody do rutinní praxe je namístě zodpovědět několik otázek. Předně by měl být známý jasný důvod k jejímu zavedení. Mezi výrazné výhody molekulární diagnostiky se řadí vysoká citlivost, kdy teoreticky postačuje jediná kopie DNA, dále rychlost, která se řádově pohybuje v několika hodinách, což zatím nedokáže žádný jiný stejně zaměřený postup (22). Rovněž se často argumentuje nespolehlivostí tradičních diagnostických technik. Podle některých prací může být bakteriologické vyšet-

ření kloubního punktátu falešně negativní u více než 50 % případů PPI (2). Zatím však není jasné, jestli by molekulární diagnostika byla schopna toto diagnostické okno zaplnit. Také nebylo jednoznačně určeno, jaký má falešně negativní kultivace praktický dopad na další osud pacienta. Naproti tomu je evidentní, že se výtěžnost kultivačních technik dá významně ovlivnit celou řadou opatření (okamžitý transport vzorků do laboratoře, sonifikace extrahovaného implantátu nebo použití abrazivních metod při jeho stěru, speciální transportní půdy, adekvátní mikrobiologické postupy, souběžná interpretace kultivačních a PCR technik s analýzou případných diskrepancí). Alternativně jsou vyvíjeny velmi efektivní mikroskopické metody zobrazující biofilm na implantátu (3), ty však zatím nejsou schopny blíže specifikovat původce infekce.

V předkládané studii byly na souboru 35 zřejmých PPI testovány základní charakteristiky PCR detekce tzv. univerzální bakterie (průkaz konzervativní sekvence genu pro 16S rRNA). S překvapením bylo zjištěno, že dlouhodobým cízelováním laboratorní praxe došlo k oslabení schopnosti PCR určovat skutečně nemocné (senzitivita 64 %), zatímco vnitřními kontrolami a precizností laboratorního uspořádání bylo téměř odstraněno riziko falešně pozitivních výsledků (specifita 97 %). Určitou roli zřejmě sehrálo i uspořádání studie, kdy odběr materiálu v průběhu operace minimalizoval riziko odběrové kontaminace. Nejdůležitějším výstupem studií podobných té naší by mělo být zařazení nové diagnostické metody do stávajícího diagnostického algoritmu. Na první pohled se zdá, že tato verze PCR by se hodila spíše k vyloučení infekce nežli k jejímu potvrzení pro svou vysokou specifitu. Avšak poměrně vysoká pozitivní prediktivní hodnota i „likelihood ratio“ pozitivního testu naznačují právě opačný potenciál (9). Vždyť k tomuto vyšetření by stejně nebyli indikováni všichni pacienti před revizí TEP, nýbrž pouze ti, u nichž existuje určité podezření na PPI (většinou klinické a laboratorní). Předtestová pravděpodobnost pozitivního záchytu by se tedy jistě pohybovala nad 0,35.

Většina prací do roku 1999 publikovala vynikající senzitivitu PCR pro detekci bakteriální DNA v materiálech z infikované kloubní náhrady (5). První výjimkou byl tým z univerzity v Nebrasce (USA), který vypracoval postup zaměřený na eliminaci falešně pozitivních PCR výsledků („genus focused PCR primers“) a posléze na souboru 63 pacientů stanovil senzitivitu a specifitu metodiky na 71 %, resp. 49 % (6). Nesporným handicapem těchto čísel je, že byly prezentovány okrajově v části diskuse bez podrobnějších informací o materiálu či metodě (6). Patrně „nejhorší“ senzitivitu publikovali Kordelle a spol. (10) z univerzity v Giessenu (Německo), a to i přesto, že vyšetřovali nejen výpotek, ale i tkáňové materiály a stěry. Slabším místem této studie byla definice PPI, neboť výsledek PCR detekce tzv. univerzální bakterie byl porovnáván pouze s histologickým nálezem. Senzitivita PCR byla 36 %, zato specifita a pozitivní prediktivní hodnota byly 100 % (10). Panousis a spol. (18) zase dosáhli v prospektivně vedené studii (kloubní výpotky, 12 případů, 80 kontrol) poziti-

vní prediktivní hodnotu jen 34 % a nedoporučili proto zařazení PCR detekce tzv. univerzální bakterie do rutinní diagnostiky PPI. Přes uvedené diskrepance nebyla víra v užitečnost této cesty ztracena a na některých pracovištích se molekulární diagnostice PPI stále věnuje pozornost (1, 11, 22, 23). Bohužel, dosud nebyly publikovány konkrétní výsledky. Naše metodika vyšetřování kloubních výpotků se nachází někde mezi uvedenými přístupy. Pokud bychom hodnotili celkovou úspěšnost záchytu bakteriální DNA, dosáhla by senzitivita naší metody 71 % (25/35). Pozitivní prediktivní hodnota s korekcí na prevalenci PPI v našem souboru (34,7 %) by byla 92,6 % a „likelihood ratio“ pro pozitivní výsledek by bylo 23,6.

Druhým velkým tématem PCR diagnostiky je identifikace původce PPI obecně, resp. po podání antibiotik. V předložené práci bylo dosaženo shody mezi bakteriologickou a PCR identifikací původce PPI u více než 80 % případů, které bylo takto možné vyhodnotit. Paradoxní je, že zjištěné diskrepance lze mimo jiné komentovat v kontextu polymikrobiální povahy biofilmu, kdy každá z metod může skutečně identifikovat jiného původce stejné infekce. Vyšší shody mezi bakteriologickým a PCR nálezem dosáhli Kordelle a spol. (100 %), dokonce i v případě infekce *Pasteurella haemolytica* (10). Stejný tým však pozoroval pokles senzitivity PCR na 25 % u případů léčených průměrně 15 dnů před operací antibiotiky (n=6). PCR je kultivačně nezávislá metodika a měla by proto nabízet zjevnou výhodu zvláště tam, kde se po určitou dobu antibiotika podávala (25). Rozkydal a spol. (19) našli bakteriální DNA pomocí PCR u všech 8 pacientů s jednoznačným PPI, kteří před odběrem vzorků užívali antibiotika a měli negativní kultivace. V předložené práci bylo pozorováno nevýznamné zvýšení senzitivity PCR metody po průměrně 21 dnech podávání antibiotik (p = 0,193). Za zmínku jistě stojí i vysoký podíl pozitivních kultur u případů s předchozí aplikací antibiotik (11/13), což mimo jiné ukazuje na neúčinnost podávaných antibiotik a vůbec problematičnost tohoto přístupu k dysfunkční endoprotéze.

ZÁVĚR

PCR metodika prezentovaná v naší studii může doplňovat stávající arzenál nástrojů určených k diagnostice PPI. Pozitivní výsledek lze zatím zařadit pouze mezi „slabé“ znaky PPI podle našeho schématu (tab. 2). U případů s negativní kulturou může diagnostická cena PCR vyšetření prudce vzrůst, neboť informaci, kterou obsahuje, nelze zatím získat žádným jiným způsobem.

Poděkování

Autoři jsou vděční za laskavou pomoc paní docentce MUDr. Dagmar Koukalové, CSc., z Ústavu mikrobiologie LF UP a FN Olomouc.

Studie vznikla za podpory Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR v rámci projektu NM 7680-3.

Literatura

1. BAUER, T. W., BROOKS, P. J., SAKAI, H., KREBS, V., BORDEN, L.: A diagnostic algorithm for detecting an infected hip arthroplasty. *Orthopedics*, 26: 929–930, 2003.
2. BERNARD, L., LUBBEKE, A., STERN, R., BRU, J. P., FERON, J. M., PEYRAMOND, D., DENORMANDIE, P., ARVIEUX, C., CHIROUZE, C. et al.: Value of preoperative investigations in diagnosing prosthetic joint infection: retrospective cohort study and literature review. *Scand. J. Infect. Dis.*, 36: 410–416, 2004.
3. DONLAN, R. M.: New approaches for the characterization of prosthetic joint biofilms. *Clin. Orthop.*, 437: 12–19, 2005.
4. FITZGERALD, R. H., Jr.: Infected Total Hip Arthroplasty: Diagnosis and Treatment. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 3: 249–262, 1995.
5. GALLO, J., RAŠKA, M., DENDIS, M., FLORSCHÜTZ, A. V., KOLÁŘ, M.: Molecular diagnosis of prosthetic joint infection. A review of evidence. *Biomed. Papers*, 148(2): 123–129, 2004.
6. HOFFEL, D. P., HINRICHS, S. H., GARVIN, K. L.: Molecular Diagnostics for the Detection of Musculoskeletal Infection. *Clin. Orthop.*, 360: 37–46, 1999.
7. ISENBERG, H. D. (ed.): Clinical microbiology procedures handbook. Washington D. C., ASM Press, 2004.
8. JAHODA, D., SOSNA, A., LANDOR, I., VAVŘÍK, P., POKORNÝ, D., HUDEC, T.: Dvojdobá reimplantace za použití spaceru - metoda volby při řešení infekce náhrady kyčelního kloubu. Srovnání metod použitých v letech 1979 až 1998. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 70: 17–24, 2003.
9. JANOUT, V.: Klinická epidemiologie - diagnóza. *Čas. Lék. čes.*, 142: 625–629, 2003.
10. KORDELLE, J., HOSSAIN, H., STAHL, U., SCHLEICHER, I., HAAS, H.: Wert der 16S rRNA Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur intraoperativen Infektdetektion bei Endoprothesenrevisionseingriffen. *Z. Orthop.*, 142: 571–576, 2004.
11. KRBEČ, M., ČECH, O., DŽUPA, V., PACOVSKÝ, V., KLÉZL, Z.: Infekční komplikace TEP kyčelního kloubu. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 71: 179–188, 2004.
12. LANDOR, I., VAVŘÍK, P., JAHODA, D.: Obecné principy léčby infekce kloubních náhrad. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 72: 183–190, 2005.
13. LARIKKA, M. J., AHONEN, A. K., JUNILA, J. A., NIEMELA, O., HAMALAINEN, M. M., SYRJALA, H. P.: Extended combined 99mTc-white blood cell and bone imaging improves the diagnostic accuracy in the detection of hip replacement infections. *Europ. J. Nucl. Med.*, 28: 288–293, 2001.
14. MARIANI, B. D., LEVINE, M. J., BOOTH, R. E., JR., TUAN, R. S.: Development of a novel, rapid processing protocol for polymerase chain reaction-based detection of bacterial infections in synovial fluids. *Mol. Biotechnol.*, 4: 227–237, 1995.
15. MARIANI, B. D., MARTIN, D. S., LEVINE, M. J., BOOTH, R. E., JR., TUAN, R. S.: The Coventry Award. Polymerase Chain Reaction Detection of Bacterial Infection in Total Knee Arthroplasty. *Clin. Orthop.*, 331: 11–22, 1996.
16. MARIANI, B. D., TUAN, R. S.: Advances in the Diagnosis of Infection in Prosthetic Joint Implants. *Mol. Med. Today*, 4: 207–213, 1998.
17. MIRRA, J. M., AMSTUTZ, H. C., MATOS, M., GOLD, R.: The pathology of the joint tissues and its clinical relevance in prosthesis failure. *Clin. Orthop.*, 117: 221–240, 1976.
18. PANOUSIS, K., GRIGORIS, P., BUTCHER, I., RANA, B., REILLY, J. H., HAMBLIN, D. L.: Poor predictive value of broad-range PCR for the detection of arthroplasty infection in 92 cases. *Acta Orthop.*, 76: 341–346, 2005.
19. ROZKYDAL, Z., BENEDÍK, J., TOMÁŠ, T., DENDIS, M., HORVÁTH, R.: Polymerázová řetězová reakce v diagnostice infekcí totální náhrady kolenního kloubu. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 65: 272–276, 1999.
20. SALVATI, E. A., GONZALEZ DELLA VALLE, A., MASRI, B. A., DUNCAN, C. P.: The infected total hip arthroplasty. *Instr. Course Lect.*, 52: 223–245, 2003.
21. SIEBERT, P., LARRICK, J.: PCR MIMICS: competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. In: LARRICK, J. (ed.): The PCR technique: quantitative PCR. Natick Massachusetts, Eaton Publishing 1997, 78–80.
22. TARKIN, I. S., DUNMAN, P. M., GARVIN, K. L.: Improving the treatment of musculoskeletal infections with molecular diagnostics. *Clin. Orthop.*, 437: 83–88, 2005.
23. TRAMPUZ, A., STECKELBERG, J. M., OSMON, D. R., CROCKERILL, F. R., III, HANSEN, A. D., PATEL, R.: Advances in the laboratory diagnosis of prosthetic joint infection. *Rev. Med. Microbiol.*, 14: 1–14, 2003.
24. TUNNEY, M. M., PATRICK, S., GORMAN, S. P., NIXON, J. R., ANDERSON, N., DAVIS, R. I., HANNA, D., RAMAGE, G.: Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. *J. Bone Jt Surg.*, 80-B: 568–572, 1998.
25. VAN DER HEIJDEN, I. M., WILBRINK, B., VIJE, A. E., SCHOOLS, L. M., BREEDVELD, F. C., TAK, P. P.: Detection of bacterial DNA in serial synovial samples obtained during antibiotic treatment from patients with septic arthritis. *Arthritis Rheum.*, 42: 2198–2203, 1999.

MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.,
Ortopedická klinika LF UP a FN Olomouc,
I. P. Pavlova 6,
Olomouc 775 20
E-mail: jiri.gallo@volny.cz

Práce byla přijata 28. 11. 2005.