

Statusartikel

Prøvetagning til diagnostik af ortopædkirurgiske infektioner

Thomas Bjarnsholt^{1, 2}, Hans Gottlieb³, Helle Westergren Hendel⁴, Claus Moser^{1, 2} & Anders Odgaard⁵

1) Afdeling for Klinisk Mikrobiologi, Københavns Universitetshospital – Rigshospitalet, 2) Costerton Biofilm Center, Institut for Immunologi og Mikrobiologi, Københavns Universitet, 3) Ortopædkirurgisk Afdeling, Københavns Universitetshospital – Herlev Hospital, 4) Nuklearmedicinsk Afdeling, Københavns Universitetshospital – Herlev og Gentofte Hospital, 5) Afdeling for Led- og Knoglekirurgi, Københavns Universitetshospital – Rigshospitalet

Ugeskr Læger 2024;186:V07230439. doi: 10.61409/V07230439

HOVEDBUDSKABER

- Ortopædkirurgiske infektioner behandles uensartet på de forskellige afdelinger i landet.
- Konsensus om prøvetagningsmetode og -håndtering har vist positiv effekt i andre lande.
- En mere ensrettet prøvetagning og -håndtering må forventes at resultere i en forbedret behandling af patienterne og i et bedre grundlag for udvikling og forskning.

Ortopædkirurgiske infektioner i Danmark håndteres heterogent både inden for det ortopædkirurgiske og det klinisk mikrobiologiske speciale.

En ensartet prøvetagningsstrategi forventes at kunne resultere i forbedret tolkning af resultater, bedre patientforløb, ensartet dataindsamling og stærkere forskning på området. Det vil samtidig øge evidensen ved indførelse af nye metoder, da sammenligningsgrundlaget vil være væsentligt større. Derfor ønsker vi at fremkomme med denne vejledning for prøvetagning og mikrobiologisk diagnostik ved dybe ortopædkirurgiske infektioner med bakterier eller svampe i et håb om at opnå konsensus. Udgangspunktet for vejledningen har været periprostetiske infektioner (PJI), frakturrelaterede infektioner (FRI) og osteomyelitis (OM), men kan anvendes ved alle ortopædkirurgiske infektioner inklusive f.eks. spondylodiskitis eller OM hos børn. Med optimal og ensrettet prøvetagning øges muligheden for at påvise og identificere bakterier eller svampe i alle tilfælde af infektion (høj sensitivitet), og at prøver uden påviste mikroorganismer er ensbetydende med en aseptisk tilstand (høj specificitet). Få og heterogent fordelte mikroorganismer samt mikroorganismer med svækket eller langsom celledeling kan resultere i falsk negative resultater, og kontaminering kan resultere i falsk positive resultater. Ved den aktuelle manglende stringens i prøvetagning og prøvehåndtering opleves en kompromitterende hyppighed af falsk negative og falsk positive prøver, hvilket desværre ikke muliggør en fuldkommen differentiering mellem inficerede og aseptiske tilstande. Det forventes, at man ved standardiserede procedurer og arbejdsgange kan minimere antallet af falske prøveresultater og dermed øge sikkerheden i tolkningen af prøvesvarene. Den forbedrede prøvehåndtering forventes at forbedre den overordnede behandling og fremme udførelsen af kliniske studier af diagnostik og behandling. Den peroperative prøvetagning er grundlaget for det kliniske samarbejde mellem kirurg og mikrobiolog. Kvaliteten af kirurgens prøvetagning optimerer mikrobiologens mulighed for at identificere agens og resistensmønster og dermed at kunne anbefale en optimal postoperativ systemisk behandling af infektionen.

Problemet med manglende vækst i tilfælde af infektion kan skyldes dårlig prøvetagning og/eller -håndtering. I de tilfælde, hvor der er begrundet mistanke om falske negative svar, må man overveje gentagelse af prøvetagningen samt iværksættelse af empirisk antibiotisk behandling.

Forfattergruppen opfordrer til ensartethed og metodestringens vedr.: 1) den indledende vurdering af patienten, 2) den peroperativ prøvetagning og 3) de mikrobiologiske analyser.

Formål

Formålet med denne artikel er at initiere en proces, der kan lede til national konsensus om prøvetagningsmetode og klinisk mikrobiologisk prøvehåndtering ved dybe ortopædkirurgiske infektioner. Vi anvender termen »dyb infektion« til at skelne disse infektioner i knogler, led, muskler, sener og bursae fra overfladiske infektioner i hud og subcutis. De dybe infektioner er sædvanligvis karakteriseret ved intakt bløddels- og huddække over det dybe anatomiske kompartment, hvor infektion med fisteldannelse og efter penetrerende sår dog udgør en undtagelse. Disse udgør en specielt vanskelig gruppe af infektioner dels pga. diagnostiske problemer, dels pga. de ofte alvorlige konsekvenser med risiko for permanent funktionsindskrænkning, og deres behandling afviger i flere henseender fra behandlingen af overfladiske infektioner.

Indledende vurdering af patienterne

Indikationen for mikrobiologisk prøvetagning er en naturlig forudsætning for prøvetagningen. Derfor vil der blive givet en kort redegørelse for den kliniske og parakliniske vurdering, der sædvanligvis ligger forud for prøvetagningen.

Patienter med blot et af de sikre kliniske kriterier for dyb infektion (fistel til hudoverfladen eller synligt implantat) ved enten PJI eller FRI [1, 2] betragtes som værende dybt inficerede og skal behandles derefter. Fravær af sikre kriterier for dyb infektion kan desværre ikke frikende patienten for infektionsmistanken, da disse patienter ofte udviser potentielle kriterier for dyb infektion. Etablerede og historisk anvendte kliniske tegn på infektion som feber, varme, palpationsømhed, rødme, hævelse og funktionstab (calor, dolor, rubor, tumor og functio laesa) er alle potentielle kriterier for dyb infektion, som ikke fastslår dyb infektion, men blot sandsynliggør en dyb infektion [3].

I de tilfælde, hvor mistanken om infektion opstår, skal der foretages en omhyggelig objektiv undersøgelse med fokus på de klassiske inflammations- og infektionstegn, som efter behov suppleres med billeddiagnostik (røntgen, CT og MR-skanning samt nuklearmedicinske undersøgelser) og biokemi. Det skal dog understreges, at man ikke på baggrund af nogen af disse undersøgelser alene kan stille diagnosen med sikkerhed.

Manglende sikker diagnostik af dyb knogle- og/eller implantatassocieret infektion vanskeliggør også sikker kontrol af behandlingseffekten, hvorfor resultatet af behandlingen ofte beror på en klinisk vurdering af patienten i det postoperative forløb efter ophør af systemisk antibiotikabehandling. Nedenfor er listet parakliniske undersøgelser, som supplerer den kliniske vurdering af mulig infektion.

Inflammationsmarkører

De almindelige serologiske markører for inflammation og infektion omfatter CRP, sænkingsreaktion, leukocyt- og differentialetælling samt procalcitonin. Analyser af ledvæske omfatter målinger af leukocytter og forskellige biomarkører. Ingen af disse analyser har ideelle diagnostiske egenskaber, idet der er både falsk negative og falsk positive værdier for alle markører. Den aktuelle konsensus vedr. diagnostik af periprostetiske hofte- og

knæinfektioner giver et overblik over den aktuelle viden [4].

Mikrobiologisk undersøgelse af perkutant udtaget materiale

Denne diagnostiske metode anvendes oftest ved infektionssuspekterede led med eller uden protese eller dybereliggende abscesser, som kan nås UL-vejledt.

Mikroskopi, dyrkning og resistensundersøgelse af aspirat

Vækst af bakterier eller svampe i de udtagne vævsprøver eller aspirater kan opfattes som havende en patogen betydning, men det kan repræsentere en forurening, og tolkningen af det mikrobiologiske svar kan derfor være usikker.

Billeddiagnostik

Billedundersøgelser, der alene er baseret på røntgenstråling, viser primært røntgenstrålingens svækkelse gennem det undersøgte område. Svækkelsen afhænger hovedsageligt af vævets sammensætning, hvor højere atomnumre medfører højere svækkelse. I infektionssammenhæng kan osteolyse, sekvestre (område med avital knogle), involucrum (lagdelt periostalt knoglevæv på længerevarende inficeret knoglevæv), implantatløsning og manglende heling alt efter den kliniske sammenhæng bestyrke infektionsmistanken.

Ved MR-skanning vises hovedsageligt koncentrationen af brintkerner, og skanningen er derfor meget velegnet til påvisning af knogleødem, periostalt ødem og andre væskeansamlinger, der afhængigt af den kliniske sammenhæng kraftigt kan bestyrke den kliniske mistanke om infektion.

Der er fire nuklearmedicinske undersøgelser til udredning af knogleinfektion. Metoderne visualiserer forskellige dele af patofysiologien (Tabel 1).

TABEL 1 Beskrivelse af de fire nuklearmedicinske undersøgelser til udredning af knogleinfektioner.

Undersøgelse	Beskrivelse	Evaluering
Knoglescintigrafi: bone scan, bone SPECT	Visualiserer nydannet knogle ^a Som tracer anvendes simple bisfosfonater ^b Der er ikke interaktion med terapeutisk bisfosfonat ^c Traceroptagelsen er delvist afhængig af perfusion af knoglen, som evt. kan forsøges visualiseret med 3-faset undersøgelse Knoglenydannelse er øget ved traumer: fraktur og operation Ved indsættelse af alloplastik kan øget knoglenydannelse ses mange måneder postoperativt, desuden ses øget knoglenydannelse ved akut og i mindre grad ved kronisk, sløv osteomyelitis uden relation til traume eller operation	Knoglescintigrafi er meget sensitiv, men uspecifik Knoglescintigrafi kan anvendes som screening for ossøs infektion af atraumatiske patienter eller patienter længe efter operation, idet den negative prediktive værdi er meget høj
¹⁸ F-PET	Adskiller sig i teorien ikke væsentligt fra knoglescintigrafi, men er ikke undersøgt ved infektioner Kan anvendes på samme indikation som knoglescintigrafi	-
Leukocytsintigrafi/SPECT/CT: WBC scintigraphy, WBC scan	Visualiserer patientens autologe neutrofile leukocytter, som in vitro er mærket med ^{99m} Tc-HMPAO eller ¹¹¹ In-oxin og herefter reinjiceret i patienten Da leukocytterne også vandrer til lever, milt og rød knoglemarv, kan ophobning af leukocytter og ektopisk knoglemarv ikke adskilles på en leukocytsintigrafi Marvscintigrafi, som kun visualiserer rød knoglemarv, kan verificere en mistanke om evt. ektopisk marv	De mærkede leukocytter targeterer infektionen og migrerer til det afficerede område i skelettet: kemotaxi og diapedese, undersøgelsen er således meget specifik Leukocytsintigrafi er ikke velegnet til vertebral osteomyelitis pga. den fysiologisk høje optagelse i den røde knoglemarv Akut infektion er karakteriseret af ophobning af neutrofile leukocytter, leukocytsintigrafi er derfor i teorien 1. valg ved akut infektion i det perifere skelet
¹⁸ F-FDG-PET/CT	Skanning visualiserer det inflammatoriske respons på en infektion eller en aseptisk inflammatorisk tilstand og er ikke afhængig af leukocytmigration FDG er et meget lille molekyle og optagelsen af FDG er væsentligt påvirket af perfusion Inflammatoriske celler, både neutrofile leukocytter, monocytter, makrofager og lymfocytter har høj FDG-optagelse, derfor kan FDG-PET visualisere både akut og kronisk infektion, som er karakteriseret af hhv. migration af neutrofile leukocytter og tilstedeværelse af inflammatorisk respons med de øvrige inflammatoriske celler, særligt aktiverede makrofager	Undersøgelsen er sensitiv, men uspecifik FDG-PET kan ikke differentiere mellem akut og kronisk infektion eller aseptisk inflammation

FDG = fluorodeoxyglukose; HMPAO = hexamethylpropylenaminnoxim; SPECT = single photon-emissions-CT; WBC = white blood cell.

a) Indbygning af tracer i hydroxyapatitkrystallerne på overfladen af nydannet knogle.

b) Metylen, hydroxymetylen og hydroxymehylenbisfosfonat mærket med ^{99m}Tc.

c) medmindre scintigrafien udøres i umiddelbar tilslutning til i.v. indgift af f.eks. pamidronat.

Peroperativ udtagning af materiale

Kirurgen skal tage vævsprøver fra de steder, hvor han/hun klinisk finder den største sandsynlighed for identifikation af mikroorganismer. Prøverne skal tages så tidligt i operationen som muligt for at minimere risikoen for peroperativ forurening af vævet og dermed de udtagne prøver [5]. Kirurgen bør ved enhver prøvetagning udtage følgende materiale til mikrobiologisk undersøgelse.

Ledvæske opsuges med sprøjte og sendes til klinisk mikrobiologisk undersøgelse direkte i sterilt spidsglas samt inokuleret i en bloddyrkningsskolbe. Tilsvarende væskeprøver kan tages fra andre væskefyldte hulrum. Ved såkaldte dry taps kan der laves en lavage med sterilt isotonisk saltvand, og den opsamlede skyllevæske kan derefter sendes til undersøgelse.

Det skal bemærkes, at ledvæske også skal sendes til celledælling, hvor leukocytkoncentrationer > 3.000 celler/ μ l samt en andel af polymorfkernede celler > 80% betragtes som sikre infektionstegn [1].

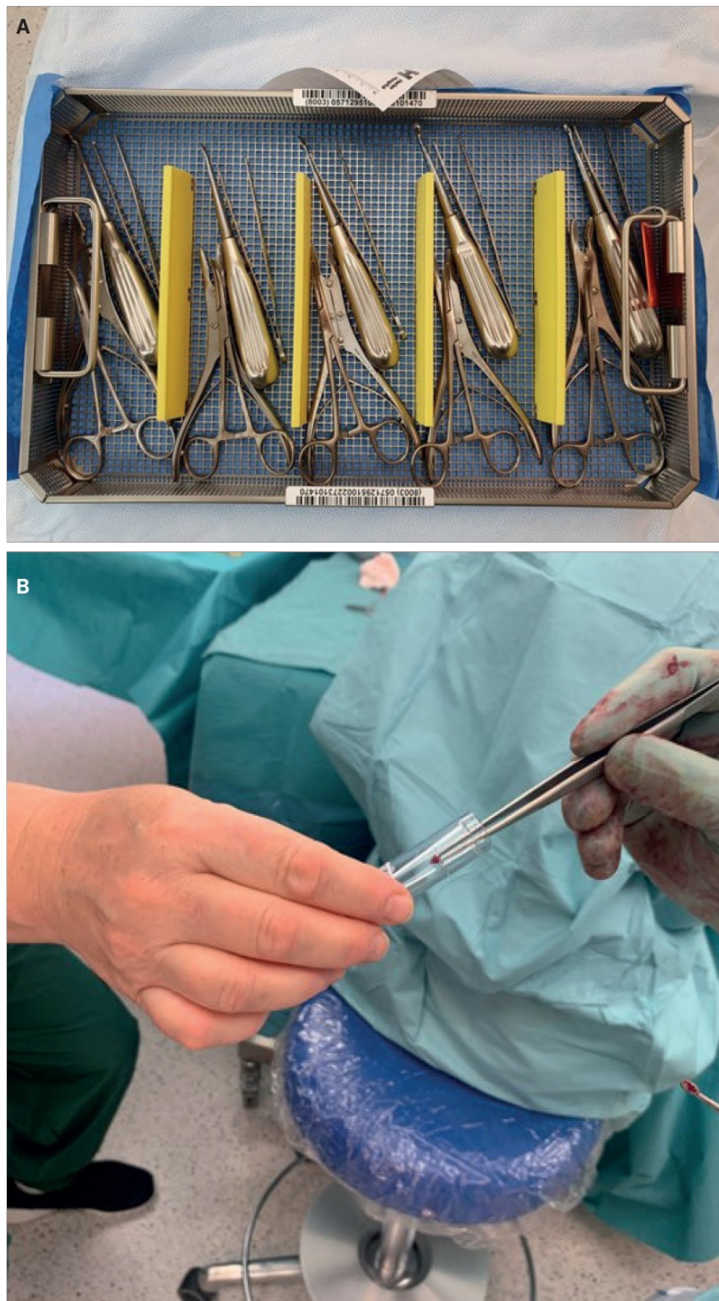
Der tages min. fem vævsprøver fra hvert infektionssuspekteret område. Ved revision af alloplastik tages prøverne primært fra ledhulens synovialis evt. suppleret med flere prøver fra andre infektionssuspekterede lokalisationer. Ved FRI og OM skal kirurgen så tidligt i revisionen som muligt tage prøver fra et udvalgt område, hvor bakterietilstedeværelsen vurderes størst, for at optimere identifikation af bakterierne eller svampene. Efter fjernelse af et implantat findes ofte membraner og avitalt, flæsket, blegt materiale mellem implantatet og

knoglen på både afskårne spongiøse knogleflader, intakte kompakte knogleoverflader og i marvrum, som alle er potentielle vækstområder for bakterier eller svampe. Vævsprøver udtages med nye sterile instrumenter til hver prøve for at undgå forurening af prøverne. Prøven overføres direkte fra patient til transportbeholder uden bord eller andre flader som mellemstation.

Alle udtagne elementer som protesedele eller osteosyntesemateriale, evt. knoglesekvestre, suturer eller cementstykker, lægges i en steril boks, som sendes til afdelingen for klinisk mikrobiologi mhp. sonikering for at frigøre mulige biofilmsklædte bakterier eller -svampe inden videre mikrobiologisk diagnostik.

Prøvetagningsværktøjet er placeret i sterile bakker, så der ikke er kommunikation mellem de forskellige stykker værktøj, og således at der kan tages forskellige typer værktøj til specifikke prøver, uden at der er risiko for at kontaminere endnu ikke anvendt værktøj (**Figur 1 A**).

FIGUR 1 A. Biopsi med et sterilt sæt instrumenter til hver prøve.
B. Prøven flyttes direkte fra patient til transportglasset.



Prøverne tages således, at der kun anvendes ét sterilt stykke værktøj til hver prøve, som kun håndteres i den ende af værktøjet, som ikke kommer i kontakt med patienten. Under prøvetagningen bruges værktøjet én gang til én prøve, hvorefter prøven overføres direkte fra patienten til en steril prøvebeholder. Prøverne sendes samlet til analyse på afdelingen for klinisk mikrobiologi (Figur 1 B).

Det er ofte beskrevet, at det er en forudsætning for en korrekt bakterieidentifikation ved dyrkning, at patienten ikke får antibiotika i min. 14 dage, før der tages peroperative knogleprøver. Dette dogme er dog underbelyst, og antibiotika skal kun seponeres inden prøvetagning og revision, hvis patientens tilstand tillader det. Hvis patienten behandles med antibiotika, kan det vanskeliggøre identifikationen ved dyrkning, men

molekylærdiagnostik samt forlænget dyrkning kan anvendes i disse tilfælde.

Den mikrobiologiske undersøgelse

Generelt skal biopsier, eksudater, proteser og lignende prøver til klinisk mikrobiologisk diagnostik sendes i sterile prøvebeholdere hurtigst muligt. En del mikroorganismer er følsomme for udtørring, og anaerobe bakterier kan være følsomme for ilt og dermed vanskelige at påvise ved dyrkning, især hvis transporttiden er lang. Tilsætning af væsker anbefales generelt ikke pga. risiko for kontaminering. Prøvetransporttiden er et område, det er muligt at forkorte for at undgå død af bakterierne eller overvækst af kontaminerende bakterier og dermed reduktion af hhv. falsk negative eller falsk positive prøvesvar. De prøver, der fremsendes fra operationsstuerne til de klinisk mikrobiologiske afdelinger, bliver undersøgt med metoderne beskrevet i **Tabel 2**. Oversigt over forslag til dyrkning, substrater og antal dages inkubation er beskrevet i **Tabel 3**. De klinisk mikrobiologiske afdelinger i Danmark har ikke vedtaget fælles retningslinjer for undersøgelse af ortopædkirurgiske prøver. På baggrund af EBJIS-definitionerne kunne det være en gevinst med ensretning.

TABEL 2 Oversigt over primære mikrobiologiske metoder og udsåning.

Metode	Beskrivelse
Mikroskopi	Alle vævsprøver og væsker undersøges ved lysmikroskopi efter fremstilling af mikroskopipræparater og gramfarvning og evt. metylenblåfarvning
D og R	D på agarplader under både aerobe og anaerobe forhold, thioglycolat og evt. bloddyrkningskolber Ved bakterie- eller svampevækst foretages R over for et udvalg af relevante antibiotika, samlet benævnes dette som D + R, og resultatet af undersøgelsen er en angivelse af de fremdyrkede bakterier eller svampe og deres følsomhed over for de testede antibiotika D er afhængig af levende mikroorganismer, der deler sig Der foretages sædvanligvis en vurdering af vækst efter 5 dage og igen efter 14 dage Der foretages ikke rutinemæssig dyrkning i > 14 dage, medmindre tb mistænkes Ved mistanke om infektion med tb eller atypiske mykobakterier kontaktes SSI mhp. diagnostik
Sonikering	Sonikering af prøvemateriale, herunder implantater og knoglesekestre Materialet i en steril beholder med sterilt PBS udsættes for mild UL-påvirkning i et bad, hvorved mikroorganismer, der er fastsiddende på overfladen af materialet, frigives til væsken i beholderen uden at dræbes Efterfølgende centrifugeres væsken, og supernatanten fjernes, mens pellet resuspenderes og udsås på dyrkningsmedier Den resuspenderede pellet kan desuden overføres til en bloddyrkningskolbe, som inkuberes Ved vækst i bloddyrkningskolben sås bakterierne ud til artsbestemmelse og R som vanligt
16S-sekventering	D kan efterfølges af identifikation af bakterier ved sekventering af en del af genet som koder for 16S rRNA Denne undersøgelse er især nyttig ved D-negative prøver, som kan skyldes antibiotikabehandling inden prøvetagning, lavt antal bakterier, ikkedelende bakterier eller svært dyrkningsbare bakterier

D = dyrkning; R = resistensbestemmelse; PBS = saltvand med fosfatbuffer; SSI = Statens Serum Institut; tb = tuberkulose.

TABEL 3 Oversigt over udsåning, substrater og antal dage^a.

Prøvekategori	Udsåning	Aflæsning efter udsåning, dage
Implantater/fremmedlegemer/ proteser	Anaerobplade, anaerobt	2 + 5
	Chokoladeplade, CO ₂	1 + 2
	Blodplade, CO ₂	1 + 2
	Blåplade: gramnegativ selektion, aerobt	1 + 2
	Thioglycolat, aerobt	1 + 2 + 5 + 14
	Serumbouillon, aerobt	1 + 2 + 5
	Sonikat, bloddykningskolbe, anaerobt	Op til 14
Knoglevæv	Anaerobplade, anaerobt	2 + 5
	Chokoladeplade, CO ₂	1 + 2
	Blodplade, CO ₂	1 + 2
	Blåplade: gramnegativ selektion, aerobt	1 + 2
	Thioglycolat, aerobt	1 + 2 + 5 + 14
	Serumbouillon, aerobt ^b	1 + 2 + 5
Væsker	Anaerobplade, anaerobt	2 + 5
	Chokoladeplade, CO ₂	1 + 2
	Blodplade, CO ₂	1 + 2
	Blåplade: gramnegativ selektion, aerobt	1 + 2
	Thioglycolat, aerobt	1 + 2 + 5 + 14
	Serumbouillon, aerobt	1 + 2 + 5

a) Tabel fra Afdeling for Klinisk Mikrobiologisk på Rigshospitalet, mindre variationer kan forekomme.

b) Knogle, der ikke kan skæres, sonikeres.

Konklusion

Målet med disse anbefalinger er et øget fokus på ensartet håndtering af patienter og deres prøvemateriale ved mistanke om PJI, FRI og OM samt et øget samarbejde mellem de ortopædkirurgiske og kliniske mikrobiologiske afdelinger i Danmark.

Ved den aktuelle manglende stringens i prøvetagning og prøvehåndtering opleves en kompromitterende hyppighed af falsk negative og falsk positive prøver. Det forventes, at man ved standardiserede procedurer kan minimere antallet af falske prøveresultater og dermed øge sikkerheden i tolkningen af prøvesvarene. Den peroperative prøvetagning er grundlaget for det kliniske samarbejde mellem kirurg og mikrobiolog. Kvaliteten af kirurgens prøvetagning optimerer mikrobiologens mulighed for at identificere agens og resistensmønster og dermed kunne anbefale en optimal postoperativ systemisk behandling af infektionen.

Vi håber, at der med tiden kan udarbejdes en konkret landsdækkende vejledning på baggrund af disse anbefalinger.

Korrespondance *Thomas Bjarnsholt*. E-mail: tbjarnsholt@sund.ku.dk

Antaget 24. april 2024

Publiceret på ugeskriftet.dk 10. juni 2024

Interessekonflikter Der er anført potentielle interessekonflikter. Forfatterens ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på ugeskriftet.dk

Referencer findes i artiklen publiceret på ugeskriftet.dk

Artikelreference Ugeskr Læger 2024;186:V07230439.

doi 10.61409/V07230439

Open Access under Creative Commons License [CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

SUMMARY

Sampling for the diagnosis of orthopaedic surgical infections

Orthopaedic surgical infections, in Denmark, are managed heterogeneously, both within the orthopaedic surgical and the clinical microbiological specialty. More uniform guidelines for sampling and clinical microbiological diagnostics for suspected orthopedic surgical infections would be appropriate. The purpose of this review is therefore to initiate a process aiming for consensus on sampling methods of tissue materials and fluids and clinical microbiological sample handling.

REFERENCER

1. McNally M, Sousa R, Wouthuyzen-Bakker M et al. The EBJIS definition of periprosthetic joint infection. *Bone Joint J.* 2021;103-B(1):18-25. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.103B1.BJJ-2020-1381.R1>.
2. McNally M, Govaert G, Dudareva M et al. Definition and diagnosis of fracture-related infection. *EFORT Open Rev.* 2020;5(10):614-619. <https://doi.org/10.1302/2058-5241.5.190072>
3. Gundtoft PH, Bue MH, Hansen RL et al. Frakturrelateret infektion. *Ugeskr Læger.* 2022;184:V01220061.
4. Parvizi J, Tan TL, Goswami K et al. The 2018 definition of periprosthetic hip and knee infection: an evidence-based and validated criteria. *J Arthroplasty.* 2018;33(5):1309-1314.e2. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2018.02.078>
5. Ignatiussen M, Rasmussen MB, Tengberg PT. Peroperativ vævsprøvetagning ved mistanke om infektioner relateret til osteosynteser og alloplastikker. <https://www.ortopaedi.dk/wp-content/uploads/2022/10/2022-KKR-Mikrobiologisk-proevetagning.pdf> 2. maj 2024).