

Analiza periprotetičnega punktata v diagnostiki okužbe umetnih sklepov

Analysis of periprosthetic aspirate in the diagnosis of prosthetic joint infection

Dunja Terčič, Rihard Trebše

Ortopedska bolnišnica
Valdoltra, Jadranska
cesta 31, 6280 Ankaran

Korespondenca/ Correspondence:

Dunja Terčič, univ. dipl.
kem., spec. med. biokem.,
Ortopedska bolnišnica
Valdoltra, Jadranska
cesta 31, 6280 Ankaran,
e-naslov: dunja.tercic@
ob-valdoltra.si

Ključne besede:

okužba sklepne proteze,
diagnoza, citološka
analiza obproteznega
punktata, citološka
merila za OSP,
številčna koncentracija
levkocitov, % nevtrofilnih
granulocitov

Key words:

prosthetic joint infection,
diagnosis, cytological
examination of joint
aspirate, cytologic criteria
for PJI

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn Supl 2009;
78: II-87–95

Prispelo: 22. maj 2009,
Sprejeto: 11. avg. 2009

Izvleček

Izhodišča: Neželeni zapleti pri artroplastiki so aseptično omajanje sklepne proteze (AOSP) in okužbe sklepne proteze (OSP). Ker se ravnanje pri OSP razlikuje od AOSP, je potrebno zgodnje razločevanje teh dveh pojavov. Priporoča se kombinacija različnih diagnostičnih postopkov. Idealno bi bilo postaviti diagnozo OSP ali jo izključiti že v predoperativni fazi.

V tej fazi temelji diagnostika na analizi obprotetičnega punktata, ki zajema kulturo obproteznega punktata za osamitev povzročitelja okužbe in citološko analizo obproteznega punktata za razlikovanje med AOSP in OSP.

Citološka analiza obproteznega punktata vključuje določitev številčne koncentracije levkocitov (število L) in diferenciacijo levkocitov iz obarvanega citološkega sedimenta z določitvijo deleža nevtrofilnih granulocitov (% Ne). Za oceno rezultatov in za razlikovanje med omajanjem proteze od okužbe proteze služijo postavljene mejne vrednosti za število L in % Ne, ki se razlikujejo od vrednosti za nativne sklepe.

Metode: Citološko analizo obproteznega punktata, odvzetega pred operacijo, opravimo v medicinskem laboratoriju pri večini bolnikov, ob sumu na okužbo proteze pa pri vseh. Citološko analizo obproteznega punktata, vzetega med operacijo pri menjavi proteze, opravimo pri večini bolnikov, pri vseh ob odstranitvi proteze zaradi okužbe in redko, kadar je povzročitelj že znan iz predoperativne kulture punktata. Pri tem ne raz-

likujemo bolnikov glede na vrsto umetnega sklepa.

Citološka analiza obproteznega punktata zajema določitev števila L in % Ne.

Vzorke punktata, odvzete v epruveto z anti-koagulantom EDTA, analiziramo v laboratoriju v 1 do 2 urah po odvzemu, pri medoperativno odvzetem punktatu pa takoj. Ocenimo izgled punktata in število celic z mikroskopiranjem na 400-kratni povečavi. Vse vzorce predhodno obdelamo z raztopino hialuronidaze. Levkocite preštujemo v komori s pomočjo reagenta za štetje L v krvi, % Ne določimo z diferenciacijo L iz obarvanega citološkega sedimenta pod imerzijo na 1000-kratni povečavi, tako da preštujemo in diferenciramo najmanj 200 celic.

Zaključki: Citološka analiza obproteznega punktata z določanjem števila L in % Ne se je v naši bolnišnici uveljavila kot dodatna in ustrezna diagnostična metoda pri razlikovanju OSP od AOSP v predoperativnem in medoperativnem diagnostičnem postopku ne glede na vrsto sklepne proteze. Pri tem uporabljamo naslednja citološka merila za oceno OSP: število L $> 1,7 \times 10^9/L$ in % Ne $> 65\%$.

Občutljivost metode je za L in % Ne 94 %, oz. 97 %, specifičnost je za L in % Ne 88 %, oz. 98 %. Zlati standard za dokaz okužbe in osamitev povzročitelja je medoperativna kultura obproteznega tkiva, ki ima občutljivost 65–94 % in specifičnost 97–100 %.

Metoda je hitra, enostavna in s postavljenimi merili za OSP dovolj natančna za razločevanje aseptičnega omajanja od okužbe proteze.

Ne glede na to, da so bila merila za OSP določena na podlagi analize sklepne tekočine kolenskih endoprotez pri bolnikih z gonartrozo, ugotavljamo, da so primerni tudi za ostale sklepne vsadke. Za natančnejšo določitev citoloških meril, njihove občutljivosti, specifičnosti, določitev negativne napovedne vrednosti in pozitivne napovedne vrednosti tudi ob upoštevanju vzrokov za primarno artroplastiko smo zasnovali študijo, ki še poteka.

Abstract

Background: Complications during the life span of an artificial implant in prosthesis joint implant surgery (arthroplasty) are aseptic biomechanical loosening (ABL) and prosthesis joint infection (PJI). Aseptic loosening is the most common cause of prosthetic joint failure, followed by infection. It is important to differentiate between these two entities because their management differs. Combination of pre- and peri-operative diagnostic methods is useful. It is ideal to diagnose or exclude PJI preoperatively to facilitate an appropriate surgical management and initial choice of systemic antimicrobial agents. At this point preoperative examination of a joint aspirate for cell count and differential as well as for microbiological culture is helpful for differentiating a septic from an aseptic process. The cut-off values for leukocyte count and differential for diagnosing PJI are established and differ from those applied for native joints.

Methods: The pre- and peri-operative cytological joint aspirate examination comprises

leukocyte count and differential with PMN % (polimorphonuclear leucocyte).

After synovial aspiration the sample is drawn into a lavender blood test tube containing K₂EDTA solid anticoagulant. The examination in the medical laboratory is completed in 1-2 hours. The gross appearance and a microscopic examination of the sample under 400x magnification is sought to assess the cells present in the sample. All samples for the cytological examination are first treated with hyaluronidase solution. The leukocytes are counted in the Neubauer's counting chamber using a leukocyte counting solution (2-3% aq.sol gentiana violet in acetic acid). The result is expressed in SI units (in 10⁹/L). The differential count is made from a stained smear according to Pappenheim and minimum 200 cells are differentiated. The result is expressed as a percentage of PMN and other types of white blood cells.

Conclusion: Pre- and peri-operative joint aspirate cytological examination with leukocyte count and differential is a valuable diagnostic tool for differentiating a prosthesis joint infection from an aseptic loosening. We presume that a reported joint aspirate leukocyte count of > 1.7 x 10⁹/L and differential of > 65% PMN have adequate specificity (88% and 98%) and sensitivity (94% and 97%) for diagnosing PJI regardless the type of implant. The exact values for these diagnostic modalities, defining also NPV (negative predictive value) and PPV (positive predictive value), will be possible after the completion of our study.

Uvod

Med najpogostejšimi neželenimi zapleti po artroplastiki sta aseptično omajanje sklepne proteze (AOSP) in okužba sklepne proteze (OSP). Kumulativno se ti zapleti razvijejo v manj kot 10 % primerov in praviloma zahtevajo ponovno operacijo.^{1,2} Klinični potek je lahko pri tihih, počasi potekajočih okužbah s slabo virulentnimi organizmi praktično enak kot pri AOSP.¹

Pogostost OSP je odvisna od vrste operativnega posega (vrste sklepa za implantacijo endoproteze), pogojev za izvedbo operativ-

nega posega ter drugih dejavnikov, kot so starost bolnika, spremljajoče bolezni, imunski status. Zaradi oboperativne antibiotične zaščite in nadzora okolja v operacijski dvorani je število okužb protez nizko (1-5 % pri primarnih vsadkih), večjo pogostost najdemo pri revizijskih posegih.^{1,2}

OSP je resen zaplet tako za bolnika kot za zdravnika. Zdravljenje je dolgotrajno, drago, neprijetno za bolnika in povezano s stranskimi učinki. Uspešnost zdravljenja OSP je odvisna od zgodnje in zanesljive diagnostike. Ker se ravnanje pri OSP močno razlikuje

od tistega pri AOSP, je izrednega pomena, da že s predoperativno diagnostiko v čim višjem odstotku bolnikov ločimo med OSP ali AOSP. S tem si omogočimo izbiro ustreznega operativnega posega in antibiotičnega zdravljenja, kadar je to potrebno.

Diagnostika OSP

Diagnostika OSP je v več pogledih zapletena. Idealne metode, ki bi bila dovolj specifična in občutljiva, zaenkrat nimamo, standardnih kliničnih in laboratorijskih meril za diagnosticiranje OSP pa ni. Razlog za težavno diagnostiko in tudi za uspešnost zdravljenja je posebnost mikrobov, da tvorijo biofilm na površini vsadka, kjer rastejo in so zaščiteni pred antimikrobnimi zdravili in diagnostičnimi orodji.^{1,2,3}

Pri diagnostiki OSP se poslužujemo kombinacij diagnostičnih postopkov, ki jih delimo na predoperativne in medoperativne. V pomoč so tudi različne slikovne tehnike in laboratorijske metode.^{1,2,3} Cilj je dokazati okužbo in po možnosti osamiti ali prepoznati povzročitelja ter določili njegov antibiotigram.

Laboratorijske preiskave

Biokemične in hematološke preiskave krvi ter urinske preiskave v medicinskem laboratoriju uporabljamo za oceno zdravstvenega stanja bolnika ob sprejemu v bolnišnico, za diferencialno diagnostiko bolnikovih spremljajočih boleznih in za spremljanje bolnika po operativnem posegu, zlasti če se pojavijo zapleti. Vnetni parametri, kot so število levkocitov z diferencialno krvno sliko, CRP (C-reaktivni protein) kot protein akutne faze ter hitrost sedimentacije eritrocitov (SR) so dobro poznani, znana je tudi njihova kinetika. Za izključevanje OSP so premalo specifični, vendar so ob izključitvi drugih boleznih in v kombinaciji z drugimi diagnostičnimi metodami lahko ustrezni kazalci možne okužbe.^{4,5}

Pri OSP je velikost porasta vnetnih parametrov odvisna od jakosti okužbe in od povzročitelja ter od splošnega stanja bolnika in njegovih spremljajočih boleznih. SR je večinoma pospešena, zvečana je koncentracija CRP,

prisotna je zmerna levkocitoza ($>10 \times 10^9/L$) z nevtrofilijo ali pa tudi ne. Pri odloženih ali t.i. »low grade« okužbah z nizko virulentnimi mikroorganizmi sta lahko SR in CRP v mejah normale ali le rahlo povečana, ne nujno oba hkrati, levkocitoze ponavadi ni, prisotna pa je lahko nevtrofilija.⁶ Blaga monocitoza je značilna za kronična vnetja in se običajno pojavi po okrevanju in zdravljenju z antimikrobnimi zdravili.

CRP je od navedenih parametrov vnetja najbolj specifičen in služi predvsem za spremljanje bolnika po operaciji ter za spremljanje učinka zdravljenja. Sintezo CRP v jetrih in porast koncentracije v plazmi 6 ur po začetni okužbi ali poškodbi tkiva sprožijo citokini.⁷ Pri ortopedskih operacijah ima CRP značilno amplitudo gibanja, ki je odvisna od obsežnosti in trajanja operativnega posega.⁸ Pooperativno normalno poraste in doseže najvišjo vrednost 2. do 3. dan po operaciji.⁸⁻¹⁴ Iz naših izkušenj in rezultatov naših meritev koncentracije CRP, ki so podobni rezultatom predhodnih študij omenjenih avtorjev, je maksimalen porast koncentracije CRP pri primarni protezi kolka pri večini bolnikov 3. pooperativni dan, pri primarni protezi kolena pa pri večini bolnikov 2. pooperativni dan.^{9,10} Značilno večje so koncentracije CRP pri kolenskih protezah in dosežejo v nekaterih primerih tudi 250–300 mg/L. Vzrok je večja poškodba tkiva in zahtevnejši poseg pri vstavitvi kolenske proteze. Podobne rezultate navaja tudi White s sod.⁹ Ob odsotnosti zapletov začne koncentracija CRP upadati 3. do 4. pooperativni dan, hitro upada v prvem tednu in se nato postopno normalizira v naslednjih nekaj tednih.^{1,8-11,13,15} Pri zapletih, kot so obsežni hematomi, pooperativne okužbe rane, sistemske okužbe in tromboza, ostaja koncentracija CRP zvečana ali pa ugotovimo ponoven porast po predhodnem znižanju.⁸ Zato je določanje CRP po operaciji uporaben parameter za ugotavljanje pooperativnih okužb in ostalih zapletov.^{8,9,14}

Pospešena SR je nespecifičen parameter vnetja. Odvisna je od starosti, spola, oblike in velikosti eritrocitov, hematokrita, prisotnosti povečane koncentracije imunoglobulinov v plazmi (zlasti monoklonalnih), ki niso reaktanti akutne faze, in imunskih kompleksov.¹⁸ Po operaciji SR postopoma narašča in po-

časneje upada kot CRP, tako da ostaja rahlo pospešena tudi potem, ko se CRP že normalizira.^{11,13,14,16-19}

Prokalcitonin (PCT) je označevalec bakterijskega, glivičnega vnetja in infestacije s paraziti ter aktivacije vnetnega odgovora zaradi razširitve okužbe-sepse ali pa razvoja večorganske odpovedi. Plazemska koncentracija je normalno zelo nizka (<0,5 µg/L), pri hudih okužbah poraste na >10-1000 µg/L. Uporaben je pri diagnostiki sepse in predvsem za spremljanje antimikrobnega zdravljenja pri hudih okužbah.²⁰

Mikrobiološka diagnostika

Mikrobiološka kultura obproteznega punktata je še vedno standardna diagnostična metoda za osamitev povzročitelja okužbe v *predoperativni fazi*, s katero dokazemo okužbo v 45-100%, vendar ima svoje pomanjkljivosti.^{1,2,4} Na rezultat iz mikrobiološkega laboratorija čakamo vsaj 24 ur, pri slabo rastočih organizmih pa lahko celo 14 dni. Kulture so lahko negativne zaradi predhodnega antibiotičnega zdravljenja ali premajhnega števila bakterij, ki se pretežno združujejo in rastejo v biofilmu, ki ga ustvarijo

na protezi in jih z vzorčenjem ne zajamemo zaradi neustreznega transportnega medija (anaerobi), gojišč, prisotnosti mikobakterij, ki ne rastejo v običajnih gojiščih, in drugih neznanih vzrokov.^{1,2,3}

Mikrobiološka kultura obproteznega tkiva, odvzetega *med operacijo*, je uspešna v 65-94 % primerov. Tkivna biopsija je najustreznejši vzorec za osamitev povzročitelja okužbe. Lažno negativno kulturo lahko dobimo zaradi predhodnega antibiotičnega zdravljenja in uvedbe antimikrobne zaščite pred odvzemom medoperativnih vzorcev.^{1,2,4}

Sonikacija potencialno okuženih vsadkov za osamitev in identifikacijo mikrobov iz biofilma² in molekularne metode, npr. za odkrivanje bakterijske 16S ribosomske DNA s PCR,³ postajajo vse pomembnejše in bodo najverjetneje kmalu med standardnimi orodji za ločevanje med OSP in AOSP.

Za hitro razlikovanje aseptičnega omajanja od okužbe proteze se je v naši bolnišnici uveljavila citološka analiza obproteznega punktata z določanjem števila levkocitov (L) v punktatu in % Ne iz obarvanega citološkega sedimenta. Za oceno rezultatov analize uporabljamo objavljena merila (mejne vre-

Tabela 1: Diferencialna merila za ST pri nativnih sklepkih.

	Normalna	Nevnetna (I)	Vnetna (II)	Septična (III)	Hemoragična
Volumen (mL)	< 3,5	> 3,5	do 80	> 3,5	> 3,5
Izgled	bistra, svetlo rumena	bistra, rumena	motna, mlečna	gnojna, motna, * rumenorjava, zelenorumena, sivorumena, mlečna	motna, krvava rdečerjava
Št.L 10 ⁹ /L	< 0,2	< 3	3-50	> 50	< 2
% Ne	< 25	< 25	> 70	> 90	< 50
Kristali	ne	ne	da/ne	ne /da **	ne
Kultura	neg	neg	neg	poz *** (bakterije, glive, mikobakterije)	neg
Asoc. bolezni		osteoartritis, osteohondritis, nevroatropatije	kristalni sinovitis (protin, psevdoprotin) RA, SLE itd.	septični artritis	travma, hemofilija, iztirjeno antikoagulantno zdravljenje

* Punktati se predstavljajo z različnimi barvami, ocena barve je subjektivna.

** Septični artritis in kristalni sinovitis se lahko pojavita hkrati.²⁶

*** Kultura pri septičnem izlivu je lahko po navedbah avtorjev različno občutljiva.^{6,27,28}

dnosti, »cutoff«) za OSP.^{2,21} Citološko analizo punktata izvajamo predoperativno in tudi pri medoperativni diagnostiki v kombinaciji s kulturo in histopatološko analizo obproteznega tkiva.

Analiza sinovialne tekočine pri nativnih sklepih

Analiza sinovialne tekočine (ST) nativnih sklepov je uporabna v diferencialni diagnostiki boleznih sklepov.

Rutinska analiza ST zajema oceno izgleda, viskoznosti, mikroskopski pregled nativnega vzorca glede prisotnosti kristalov ob uporabi polarizatorja, citološki pregled (število levkocitov in diferenciacija levkocitov iz obarvanega citološkega sedimenta) ter mikrobiološko kulturo za osamitev povzročitelja okužbe ob sumu na septični izliv. Nekateri biokemične preiskave (glukoza, laktat, LDH, sečna kislina) nimajo večjega diagnostičnega pomena, določanje citokinov, metaloproteinaze 3 in drugi specialni testi v ST so omejeni na specializirane imunološke laboratorije.^{22,23,24}

Merila za razvrščanje boleznih sklepov na podlagi analize ST

Na podlagi rezultatov analize ST, ki se opirajo na volumen in izgled punktata, število levkocitov, % Ne ter na prisotnost kristalov in prisotnost bakterij (kultura punktata), razvrščamo izlive v nevnetne, vnetne, septične in hemoragične.^{2,22-25}

Merila za vrednotenje OSP

Pri sklepih z vstavljenimi protezo merila za nativne sklepe niso uporabna. Za sklepe z vstavljenimi protezo so objavljena citološka merila, po katerih ocenjujemo, ali gre za omajanje ali za okužbo proteze in so bistveno nižja kot merila za septični artritis nativnega sklepa.^{1,3,4,21,29}

Optimalna citološka merila za izključitev OSP so avtorji v nekaj študijah postavili na podlagi določitve števila L in % Ne iz obproteznega punktata, odvzetega pred operacijo.

Omeniti velja, da so v raziskave pogosto zajeli samo bolnike z artrozo, ki so jim vstavili kolenske endoproteze, medtem ko so bili bolniki z vnetnimi boleznimi sklepov (s kristali povzročeni sinovitis, RA, psoriatični artritis, SLE in druge bolezni vezivnega tkiva) izključeni.^{1,2,3,21} Pri vnetnih boleznih sklepov imajo bolniki namreč že primarno zvečano število L in % Ne.^{4,29}

Malo je primerov ugotavljanja mejnih vrednosti za okužbo kolčne in drugih protez, tako predoperativno kot medoperativno.

Odvzem obproteznega punktata v predoperativni fazi

Artrocenteza se opravi pod sterilnimi pogoji s spinalno iglo 18 G in brizgo volumna 10 mL. Pri sklepih, pri katerih je pristop težji, se punkcija izvede vodeno s pomočjo slikovnih metod.

- Za citološko analizo punktata je potrebno prenesti punktata iz brizge v epruveto s suhim antikoagulantom EDTA vijoličaste barve (BD). S suhim antikoagulantom preprečimo razredčitev vzorca in koagu-

Tabela 2: Merila za oceno rezultatov analize obproteznega punktata pri okužbi proteze in primerjava s kulturo predoperativnega punktata ter medoperativno kulturo obproteznega tkiva.^{3,21}

	Rezultat	Občutljivost (%)	Specifičnost (%)
Število levkocitov (10 ⁹ /L)	> 1,7	94	88
% nevtrofilnih granulocitov	> 65	97	98
Kultura predop. punktata		45-100	88-100
Kultura medop. tkiva		65-94	97-100

lacijo vzorca, s čimer se izognemo napakam pri štetju L.

- Za mikrobiološko kulturo prenesemo punktata iz brizge v prenosno gojišče (Port-A-cul, BD) ali v pediatrično steklenico za hemokulturo. Transportno gojišče omogoča ohranjanje vitalnosti mikroorganizmov med prenosom v drugi laboratorij. Primerno je za anaerobne, fakultativne in aerobne mikroorganizme. Mikroorganizmi se v tem okolju na sobni temperaturi ohranijo do 72 ur. Sterilne epruvete so manj primerne v primeru anaerobov (takojšen prenos).
- Za kulturo na mikobakterije, ob sumu na okužbo z BK, prenesemo punktata iz brizge v epruveto z antikoagulantom Li-heparinat zelene barve ali Na-citrat 0,129 M črne barve (BD).
- Pri suhi punkciji se vbrizga fiziološka raztopina, ki se ponovno aspirira. V tem primeru vzorec ni primeren za citološko analizo zaradi razredčitve, pogojno za kulturo. Primes kontrasta lahko moti rast bakterij na gojišču.

Odvzem obproteznega punktata med operacijo

Po standardni pripravi operativnega polja najprej izvedemo operativni pristop na prizadetem sklepu in izprepariramo psevdokapsulo. Poiščemo področje stika obremenilnih površin, ker je tam običajno največja verjetnost, da pridemo do sklepne tekočine. Sledi izpiranje in skrbna hemostaza. Z debelejšo iglo punktiramo psevdosklep in v brizgo aspiriramo tekočino. Le v izjemno redkih primerih tekočine ne uspemo posesati ali pa je ni.

Izgled vzorca

Pri aspiriranju tekočine zdravnik oceni količino in izgled punktata: motnost, barvo, prisotnost gnoja.

Med operacijo oceni izgled okolnega mehkega tkiva.

Izgled punktata ocenimo tudi v laboratoriju. Ocena je subjektivna.

Vzorci obproteznega punktata imajo lahko zelo različen izgled (Slika 1).

Pri omajanju proteze so lahko vzorci bistri s primerno rumenkasto barvo, lahko so rahlo motni ali bolj ali manj krvavi. Pri nekaterih vzorcih že s prostim očesom opazimo obrabne delce, ki smo jih aspirirali iz sklepa po vbrizganju fiziološke raztopine ali kontrasta. Nekateri vzorci so temnosivi, »kovinski«, vidimo koščke kovine. Taki vzorci so značilni za pojav metaloze.

Gnojni vzorci so ponavadi motni, gosti, prepleteni s fibrinom, kepasti, so lahko mlečni ali obarvani v različnih odtenkih, npr. zelenkastorumen ali zelenkastosivo. Nekateri imajo značilen neprijeten vonj (Moraxella Morgani).

Izgled in barva lahko zavajata, predvsem pri vzorcih, ki izgledajo gnojni. Punktata je lahko mlečen in rumenkastosive barve s prisotnimi kosmiči in delci tkiva, kosti, proteze ali cementa.

Drugi vzorci so lahko belkasti, mlečni. V tem primeru lahko posumimo na prisotnost mikobakterij. Običajna kultura je negativna, lahko osamimo BK.

Citološka analiza obproteznega punktata

Citološko analizo je potrebno opraviti čimprej, v 1 uri, najkasneje pa v 2 urah po odvzemu.

Punktata pred analizo premešamo, najbolje na mešalu za epruvete.

Mikroskopski pregled nativnega vzorca

Služi za oceno števila celic ter za oceno in diferenciranje vzorcev, ki se predstavljajo kot gnojni.

Kapljo premešanega nativnega punktata kanemo na objektno steklo, pokrijemo s krovnim stekelcem in mikroskopiramo pod 400-kratno povečavo. Ocenimo število celic tako, da pregledamo vsaj 10 polj preparata. Oceno podamo opisno (na primer 2–6 L/400 x; > 50 L izrazimo kot številni ali zelo številni).

Pri kolčnih protezah s kovinsko-kovinskim obremenilnim sklopom ali kadar je iz kakšnega drugega razloga prišlo do trenja med dvema kovinama, v tkivih pogosto opa-

Slika 1: Primer obproteznega punktata.



zimo v nativnem preparatu punktata tvorbe, ki niso celice, debris (obrabni delci, delci cementa, maščobne kaplje), ki dajejo vzorcu gnojen izgled; prisotni so razpadli levkociti. Kultura takega punktata je ponavadi negativna, negativna je tudi kultura obproteznega tkiva, vzeteja ob menjavi, histopatološki izvid tkiva je negativen na nevtrofilne granulocite. Take primere imenujemo psevdookužbe.³⁰

Štetje levkocitov v komorici

Vsak vzorec punktata obdelamo z raztopino hialuronidaze v fosfatnem pufri (tip 1, Sigma), tako da 1 mL premešanega punktata dodamo 1 kapljico raztopine hialuronidaze (25 μ L). Vzorec premešamo in pustimo na sobni temperaturi 5–10 min. Tako pripravljen obdelani vzorec (vzorec H) uporabimo za štetje L v Neubauerjevi komorici. Način štetja je enak kot pri štetju L v krvnih vzorcih.^{31,32}

Vzorec H (25 μ L) prenesemo v komercialni reagent za štetje L (475 μ L raztopine gentiana violet v očetni kislini, Türkova raztopina; Kemika Zagreb). Preštejemo vse L v 4 velikih kvadratih komorice, pri računu upoštevamo razredčitev vzorca in dimenzije komorice (račun: prešteti L na 4 mm²/20). Številčno koncentracijo L izrazimo v SI enotah 10⁹/L. Delamo v dvojniku, pri čemer se število L v dveh štetjih ne sme razlikovati za več kot 20 %.

Gnojnih in kepastih vzorcev ter vzorcev z močnim debrisom ne moremo pripraviti za štetje L, ker jih je nemogoče zajeti s kapalko. V takih primerih naredimo razmaze iz citološkega sedimenta za diferenciacijo celic. Rezultat podamo v % Ne z opisno oceno izgleda vzorca in števila celic. Tekoče gnojne vzorce z visokim številom celic obdelamo z raztopino hialuronidaze, kot je opisano zgoraj, nato jih redčimo s fiziološko raztopino v razmerju 1:10 in postopamo, kot je opisano za štetje L. Razredčitev vzorca s fiziološko raztopino upoštevamo v izračunu.

Diferenciacija levkocitov iz obarvanega citološkega sedimenta (% Ne)

S hialuronidazo obdelani vzorec punktata (vzorec H) centrifugiramo pri 500g/20 min; vzorcev z visokim številom levkocitov ni potrebno centrifugirati. Citološki sediment lahko pripravimo s pomočjo citocentrifuge, kar je priporočljivo, da ne poškodujemo celic. Pripravimo 3 tanke razmaze, ki jih obarvamo po Pappenheimu (May Grunwald/Giemsa, Merck). Diferenciramo levkocite pod imerzijo v vseh treh preparatih, tako da preštejemo in diferenciramo najmanj 200 celic, ponavadi 500. Število posameznih levkocitov izrazimo v %.

Opišemo posebnosti, kot na primer v makrofagih prisotne fagocitirane delce ali celice, prisotnost razpadlih celic. Pri metalozah običajno opazimo v makrofagih in/ali v preparatu temno vijolične pike ali kristale. Pri gnojnih vzorcih lahko vidimo tudi bakterije, zlasti streptokoke v verižici in stafilokoke.

Krvavi vzorci

Periferna kri, prisotna v punktatu zaradi punkcije ali po vsrkanju znotraj sklepnega hematoma, vpliva na rezultat števila levkocitov in % Ne, zlasti pri mejnih vrednostih glede na merila za OSP. Priporočila se korekcija rezultata za število L in absolutnega števila Ne zaradi prisotne periferne krvi v močno krvavih punktatih po obrazcu:³³

$$\begin{aligned} L(\text{perif}) &= (L \text{ kri} / E \text{ kri}) \times E \text{ punkt} \\ L &: \text{levkociti v } 10^9/\text{L}; E: \text{eritrociti v } 10^{12}/\text{L} \\ L(\text{prava}) &= L(\text{prešteti}) - L(\text{perif}) \end{aligned}$$

Za izračun potrebujemo hematološki izvid bolnika s številom L in E, narejen isti dan kot artrocenteza sklepa ali dan pred operacijo.

Število eritrocitov določimo iz vzorca H s štetjem v komorici ali na hematološkem števci. Za štetje v Neubauerjevi komorici prenesemo 25 µL vzorca H v 475 µL fiziološke raztopine in preštejemo eritrocite na površini 0,2 mm² (5 najmanjših kvadratkov). Pri tem razredčenju je račun za eritrocite naslednji: preštetih E/1000 v 10¹²/L. Delamo v dvojniku.^{20,21}

Vzorci punktatov največkrat niso homogeni, vsebujejo kosmiče in koagule, ki lahko zamašijo občutljive dele naprave, zato moramo biti pri upravljanju s takimi vzorci na napravi pazljivi oziroma se štetju na napravi raje izogibamo. Poleg tega pa štetje celic v napravi motijo artefakti v vzorcu punktata. V koagulih se zadržujejo tako levkociti kot eritrociti.

Število L v krvi se lahko hitro spreminja in je podvrženo dnevnemu ritmu. Za optimalno izvedbo korekcije bi bilo v primerih travmatične punkcije pravilno določiti krvno sliko bolnika tik pred artrocentezo oz. pred operacijo, kar največkrat ni izvedljivo.

Zaključek

Pri sumu na okužbo je kultiviranje mikroorganizmov še vedno najpomembnejša diagnostična metoda, ki pa je lahko tako lažno pozitivna kot tudi lažno negativna. V teh primerih je citološka preiskava sklepnega punktata nenadomestljiva. Število levkocitov in % nevtrofilnih granulocitov v predoperativnem in medoperativnem obdobju je ob postavljenih mejnih vrednostih hitra, enostavna in dovolj občutljiva metoda za razlikovanje aseptičnega omajanja proteze od okužbe. V mnogih primerih, ko je klinična slika sumljiva za okužbo, ki pa je za laboratorijskimi testi in kultivacijo ne moremo potrditi ali izključiti, se na podlagi citološke analize medoperativno odvzete sklepne tekočine odločimo za odstranitev ali zamenjavo endoproteze ali drugega kostnega vsadka.

Merila so sicer razvili pri bolnikih z ume-tnim kolonom po artrozi, vendar menimo,

da lahko posplošimo mejne vrednosti tudi na druge umetne sklepe, če so bili vstavljeni zaradi nevnetnega dogajanja, torej artroze. Mejne vrednosti za te sklepe še preučujemo.

Pri vnetnih boleznih sklepov, za katere velja, da je prisotno večje število L in večji % Ne v sinovialni tekočini pred primarno vstavitvijo umetnega sklepa, omenjena merila morda nimajo iste specifičnosti in občutljivosti kot pri nevnetnih.

Literatura

1. Trampuž A, Zimmerli W. Prosthesis joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med WKLY* 2005; 135: 243-51.
2. Trampuž A, Kavčič M, Košnik-Grmek I, Trebše R. Comparison of culture of synovial fluid, periprosthetic tissue and prosthesis sonicate for the diagnosis of knee prosthesis infection. *Zdrav Vestn* 2003; 72: 117-25.
3. Trampuž A, Osmon DR, Franklin R, Cockerill III, Steckelberg JM, Patel R. Advances in the laboratory diagnosis of Prosthetic joint infection. *Reviews in Medical Microbiology* 2003; 14: 1-14.
4. Ghanem E, Parvizi J, Burnett Stephen RJ, Sharkey PF, Keshavarzi N, Aggarwal A. Cell Count and Differential of Aspirated Fluid in the Diagnosis of Infection at the Site of Total Knee Arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 2008; 90:1637-43.
5. Schinsky MF, Della Valle CJ, Sporer SM, Pappas WG. Perioperative tersting for joint infection in patients undergoing revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 90: 1869-75.
6. Trampuž A, Pavlovčič V, Nemeč B. Okužbe v ortopediji. Ljubljana: Ortopedska klinika 2001.
7. Whicher J. C-reactive protein (CRP). In: *Clinical Laboratory Diagnostics*. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998: 700-6.
8. Niskanen RO, Korkala O, Pammo H. Serum C-reactive protein levels after total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br* 1996; 78(3): 431-3.
9. White J, Kelly M, Dunsmuir R. C-reactive protein level after total hip and total knee replacement. *J Bone Joint Surg Br* 1998; 80(5): 909-11.
10. Larsson S, Thelander U, Friberg S. C-reactive protein (CRP) levels after elective orthopedic surgery. *Clin Orthop* 1992; 275: 237-42.
11. Giehl JP, Kluba T, Leberz C. The course of inflammatory mediators after elective orthopedic interventions. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2000; 138(2): 181-4.

12. Yoon SI, Lim SS, Rha JD, Kim YH, Kang JS, Baek GH, et al. The C-reactive protein (CRP) in patients with long bone fractures and after arthroplasty. *Int Orthop* 1993; 17(3): 198-201.
13. Aalto K, Osterman K, Peltola H, Rasanen J. Changes in erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein after total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 1984; 184: 118-20.
14. Shih LY, Wu JJ, Yang DJ. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein values in patients with total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 1987; 225: 238-46.
15. Herman S, Herman S. Zdravljenje okužb kolenski endoprotez. *Zdrav Vestn* 2002; 71: 161-6.
16. Okafor B, MacLellan G. Postoperative changes of erythrocyte sedimentation rate, plasma viscosity and C-reactive protein levels after hip surgery. *Acta Orthop Belg* 1998;64(1):52-6.
17. Kolstad K, Levander H. Inflammatory tests after joint replacement surgery. *Ups J Med Sci* 1995; 100(3): 243-8.
18. Bohinjec J. Hitrost sedimentacije in njen diagnostični pomen. *Zdrav Vestn* 1993; 62: 397-400.
19. Spangehl MJ, Masri BA, O'Connell JX, Duncan CP. Prospective analysis of preoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg* 1999; 81(5): 672-83.
20. Gabršček L, Voga G, Krivec B, Skale R, Parežnik R, Podbregar M. Pomen prokalcitonina pri prepoznavanju bakterijske okužbe. *Zdrav Vestn* 2001; 70: I-11-5.
21. Trampuž A, Hanssen AD, Osmon DR, Mandrekar J, Steckelberg JM, Patel R. Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. *Am J Med* 2004; 117: 556-61.
22. Terčič D, Božič B. The basis of the synovial fluid analysis. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39 (12): 1221-26.
23. N.A. Brunzel. Synovial Fluid Analysis. In: *Fundamentals of urine and body fluid analysis*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994: 386-96.
24. Thomas L. Synovial fluid analysis. In: *Clinical Laboratory Diagnostics*. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998: 1381-91.
25. McCarty DJ. Synovial fluid. In: Koopman WJ eds. *Arthritis and allied conditions: a text book of rheumatology*. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2001: 83-104.
26. Shah K, Spear J, Nathanson LA, McCauley J, Edlow JA. Does the presence of crystal arthritis rule out septic arthritis? *J Emerg Med* 2007; 32 (1): 23-6
27. Coutlakis PJ, Roberts W. Neal, Wise CM. Another look at SF leukocytosis and infection. *JRC* April 2002; 8 (2): 67-71
28. Lyon RM, Evanich JD. Culture-negative septic arthritis in children. *J Pediatr Orthop* 1999; 19 (5): 655-9
29. Kersey R, Benjamin J, Marson B. White blood cell counts and differential in synovial fluid of aseptically failed total knee arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty* 2000; 15 (3): 301-4.
30. Mikhael MM, Hansen AD, Sierra RJ. Failure of Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty Mimicking Hip Infection. A Report of Two Cases. *J Bone Joint Surg Am*. 2009; 91: 443-6.
31. Dacie JV, Lewis SW, editors. *Practical haematology*, 8ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994: 48-82
32. Jesenovec N. Odredivanje brojačne koncentracije leukocita u krvi pomoću komore. V: *Izbrani postupci analiza u kliničko biohemijskim laboratorijima I*. 1988.
33. Ghanem E, Houssock C, Pulido L, Seongbeom H, Fereidoon M, Jaber, Parvizi J. Determining »True Leukocytosis in Bloody Joint Aspiration. *J Arthroplasty* 2008; 23 (2): 182-7.