

**CAT**  
**Critically Appraised Topic**

**De rol van 16S rRNA gen PCR in de diagnose van gewrichtsprothese-infecties**

Author: Dorien Van den Bossche

Supervisor: Dr. M. Boudewijns

Search/methodology verified by: Dr. M. Boudewijns

Date: 05/05/2015

**CLINICAL BOTTOM LINE**

---

Gewrichtsprothese-infecties (PJI) ontwikkelen zich bij een kleine minderheid van de patiënten die een gewrichtsprothese laten implanteren. Deze infecties hebben echter een grote impact. Langdurige hospitalisatie en revisie van het prothesegewricht zijn meestal het gevolg (4). Een snelle microbiologische diagnose is gewenst, om een adequate antibioticatherapie en een chirurgische behandelingsstrategie in te stellen (4,5). In werkelijkheid is geen enkele test 100% accuraat om PJI vast te stellen (4). De diagnose berust meestal op basis van klinische, radiologische, microbiologische en biochemische criteria. Ook in de definitie van PJI bestaat nog geen volledige consensus (4,17, 18).

De microbiologische diagnose van PJI berust in de huidige praktijk meestal op cultuur van periprosthetische weefselstalen. De gerapporteerde sensitiviteit van deze conventionele methode is echter variabel (65-94%) (5). Er wordt om deze reden steeds aangeraden om minimum vijf intra-operatieve stalen te collecteren (18). In een poging om de sensitiviteit van cultuur te verbeteren, werden in de literatuur ook protocollen voorgeschreven die gebruik maken van sonicatie met als doel het verwijderen en analyseren van de biofilm van de prothese.

In deze CAT werd door middel van een literatuurstudie de rol van 16S rRNA gen PCR in de diagnose van PJI onderzocht. Tegenstrijdige evidenties omtrent de performantiekarakteristieken werden in de literatuur gerapporteerd. In een meta-analyse werd de gepoolde sensitiviteit en specificiteit geschat op 86% en 91%, respectievelijk (35). De meeste studies raden een restrictief gebruik van 16S rRNA gen PCR aan in de diagnose van PJI. Deze test kan waardevol zijn in specifieke settings zoals de aanwezigheid van negatieve culturen in patiënten met een sterk vermoeden van PJI, die al dan niet antibiotica

krijgen toegediend. Kosten-effectiviteitsstudies omtrent deze moleculair diagnostische testen in de diagnose van PJI werden tot op heden nog niet gepubliceerd.

## **CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO**

Implantatie van een nieuwe gewrichtsprothese zorgt jaarlijks bij miljoenen patiënten voor een herstel van de gewrichtsfunctie. Hierbij kunnen zij opnieuw onafhankelijk gaan leven van derden en bovendien zorgt deze ingreep voor een duidelijke verbetering in hun levenskwaliteit. Terwijl de meeste patiënten een pijnvrije functie van hun nieuw gewricht ervaren, zal een kleine minderheid van hen een gewrichtsprothese infectie (Prosthetic Joint Infection, PJI) ontwikkelen. Een snelle herkenning en een geschikte behandelingsstrategie zijn van primordiaal belang om de gewrichtsfunctie te behouden en/of te herstellen (4).

## **Epidemiologie**

Jaarlijks stijgt het aantal geïmplanteerde gewrichtsprothesen (4). De dynamiek van de incidentie van PJI is echter onduidelijk. Enerzijds verhoogt het aantal patiënten met risicofactoren voor infectie, anderzijds ziet men een verbetering in de toegepaste aseptische procedures, chirurgische technieken en infectie preventie- en controlemaatregelen, wat een stabiliteit in de incidentie doet vermoeden. Het absoluut aantal PJI-gevallen zal echter steeds toenemen, gezien het aantal uitgevoerde implantaties alsmaar blijft stijgen (4). Verschillende studiegroepen rapporteren een incidentie van PJI in 0,8-1,9 % van de knie- en 0,3-1,7 % van de heupprothesen (17). Het risico op infectie is het hoogst in de eerste twee jaren na implantatie van het prothesegewricht (60-70% van de ontwikkelde PJI's), maar blijft bestaan gedurende het gehele leven van de prothese (3,4). De economische last verbonden aan PJI is zeer omvangrijk. Patiënten worden gedurende lange periodes gehospitaliseerd en ondergaan dure ingrepen (4).

## **Risicofactoren en klinische presentatie van PJI**

Risicofactoren voor de ontwikkeling van PJI zijn onder andere bacteriemische infecties, complicaties in de postoperatieve wondheling, maligniteiten en een geschiedenis van voorafgaande implantatie-infecties (3,4,5). De klinische manifestaties variëren volgens de virulentie van het etiologisch micro-organisme, de introductie van de infectie, de immuunrespons van de gastheer en het betrokken gewricht (4). Pijn, roodheid, zwelling, erythema, en koorts kunnen tekens zijn van PJI, maar deze kunnen ook ontbreken (4,5,17). Naargelang het type PJI kunnen meerdere klinische tekens en symptomen aan of afwezig zijn. De aanwezigheid van een fistel die in communicatie staat met het prothesegewricht is een

specifiek teken voor PJI. Dit kenmerk wordt dan ook geïmplementeerd in de definitie van PJI (3,4,19).

### **PJI classificatie**

Verschillende nuttige classificatieschema's zijn beschikbaar voor de indeling van gewrichtsprothese infecties (3,4). Eén schema richt zich voornamelijk op het tijdstip van het ontstaan van de infectie. PJI wordt op deze manier geclassificeerd als “early”, “delayed ” of “late onset” infectie. Een “early onset” infectie treedt op binnen de drie maanden na de laatste ingreep. Dit type PJI wordt voornamelijk veroorzaakt door hoog virulente micro-organismen (Vb. *S. aureus*, Gramnegatieve bacillen,...), die tijdens de ingreep op het prothesemateriaal worden aangebracht. “Delayed onset” infecties treden op tussen de drie en 12 tot 14 maanden na implantatie van het prothesemateriaal. Ook bij dit type infectie worden de micro-organismen vermoedelijk vanuit een exogene bron in het lichaam binnengebracht. Minder virulente micro-organismen (Vb. coagulase-negatieve stafylokokken, *Propionibacterium acnes*) vormen hier hoofdzakelijk de causatieve verwekkers. Tot slot kan een PJI ook ingedeeld worden bij “late onset” PJI, wanneer de infectie optreedt meer dan 12 tot 24 maanden na de ingreep. Dit laatste type infectie is vaak het gevolg van een hematogene disseminatie van micro-organismen. De frequentste bronnen van bacteriëmie zijn huid-en-weke-delen-infecties, respiratoire en urineweginfecties (5). Ook een traag ontwikkelende infectie, die geïntroduceerd werd op het tijdstip van chirurgie, kan oorzaak zijn van een “late onset” PJI (3,4,5).

**Table 2** Novel classification of periprosthetic joint infection (PJI) [27]

Type of PJI	Characteristics
Acute haematogenous	Infection with a duration of symptoms of 3 weeks or less after an uneventful postoperative period
Early postinterventional	Infection that manifests within 1 month after an invasive procedure such as surgery or arthrocentesis
Chronic	Infection with symptoms that persist for more than 3 weeks, beyond the early postinterventional period

*Figuur 1 Nieuwe classificatie van PJI (3)*

Deze classificatie draagt echter niet bij tot de behandelingsstrategie in PJI (3). Een andere classificatie, die wel rekening houdt met de chirurgische behandelingsconcepten is de volgende. PJI wordt in dit schema ingedeeld als: Acute hematogene PJI (duur symptomen < 3 weken), vroege postinterventionele PJI (< 1 maand na implantatie) en chronische PJI (Cfr. Fig. 1). Algemeen kan een acute hematogene PJI behandeld met retentie van het

prothesegewricht. Bij een chronische PJI daarentegen kan het implantaat niet worden behouden, waarbij het chirurgisch verwijderen en vervangen van het implantaat zich opdringt om eradicatie van de infectie te bekomen (3).

## **Pathogenese**

Lichaamsvreemd materiaal is zeer gevoelig aan de ontwikkeling van bacteriële en fungale infecties (3). Bacteriën kunnen zich hechten aan het prothesemateriaal, waarbij ze microkolonies zullen vormen. Een biofilm wordt gevormd (17). De micro-organismen organiseren zich in een extracellulaire polymere matrix en ontwikkelen zich tot een georganiseerde complexe community (5). In de biofilm worden de micro-organismen beschermd tegen antimicrobiële middelen en de immuunrespons van de gastheer als gevolg van o.a. een verminderde penetratie en “frustrated fagocytosis” (3,5). Bijgevolg vertonen bacteriën die leven in een biofilm een hogere resistentie tegen antibiotica ten opzichte van de planktonische vormen. Deze resistentie kan ook gerelateerd worden aan een tragere groeisnelheid van biofilm-bacteriën (5). De aanwezigheid van deze biofilm heeft daarom niet alleen aanzienlijke implicaties op de gebruikte behandelingsstrategie, maar ook de diagnostische aanpak wordt hierdoor beïnvloed. *S. aureus* en coagulase-negatieve stafylokokken (CNST) worden beschouwd als de belangrijkste verwekkers van PJI (4,5). Ook streptokokken, enterokokken, Gramnegatieve bacillen en anaeroben kunnen PJI veroorzaken. Daarnaast worden polymicrobiële infecties beschreven. *Propionibacterium acnes* zou voornamelijk een rol spelen in schouder gewrichtsprothese-infecties (4,17).

## **Definitie PJI**

Een eenduidige definitie van PJI heeft tot doel om een duidelijke diagnose te kunnen stellen (19). Daarnaast speelt de definitie ook een belangrijke rol in de beoordeling van onder andere de performantie van diagnostische testen. De gebruikte definitie heeft immers invloed op de sensitiviteit en specificiteit van de testmethode (17). In 2011 werd door de werkgroep van de Musculosketale Infection Society (MSIS) een nieuwe definitie voorgesteld (19). Voorheen baseerde men zich op volgende verschillende criteria om een diagnose te kunnen stellen. (I) Visuele aantoonbaarheid van purulentie in synoviaal vocht en in het weefsel rondom de prothese. (II) Acute inflammatie vastgesteld met histopathologisch onderzoek. (III) Aanwezigheid van een fistel die in communicatie staat met het prothesemateriaal. (IV) Groei van hetzelfde micro-organisme in cultuur van meer dan één staal afkomstig van een gewrichtsaspiraat of periprosthetisch weefsel. MSIS heeft een nieuwe

definitie ontwikkeld met als doel het vaststellen van een “gouden standaard definitie” die door alle klinici en anderen betrokken personen in het management van PJI kan worden gebruikt. De nieuwe definitie beroept zich op de criteria weergegeven in Figuur 2 om PJI vast te stellen (19).

### Definition of Periprosthetic Joint Infection

Based on the proposed criteria, definite PJI exists when:

- (1) There is a sinus tract communicating with the prosthesis; or
- (2) A pathogen is isolated by culture from at least two separate tissue or fluid samples obtained from the affected prosthetic joint; or
- (3) Four of the following six criteria exist:
  - (a) Elevated serum erythrocyte sedimentation rate (ESR) and serum C-reactive protein (CRP) concentration,
  - (b) Elevated synovial leukocyte count,
  - (c) Elevated synovial neutrophil percentage (PMN%),
  - (d) Presence of purulence in the affected joint,
  - (e) Isolation of a microorganism in one culture of periprosthetic tissue or fluid, or
  - (f) Greater than five neutrophils per high-power field in five high-power fields observed from histologic analysis of periprosthetic tissue at  $\times 400$  magnification.

PJI may be present if fewer than four of these criteria are met.

*Figuur 2 Nieuwe definitie voorgesteld door MSIS (19)*

Deze definitie is gelijkaardig aan deze voorgesteld door de Infectious Disease Society of America (IDSA)-guidelines (3). De IDSA definitie van PJI maakt echter geen gebruik van inflammatoire markers (4).

**Table 1** Diagnostic criteria for periprosthetic joint infection (PJI)<sup>a</sup> [19]

• Presence of a sinus tract communicating with the prosthetic joint
• Presence of purulence without another known aetiology surrounding the prosthetic device
• Acute inflammation consistent with infection on histopathological examination of periprosthetic tissue
• Elevated leukocyte count in the synovial fluid and/or predominance of neutrophils [24–26]
• Growth of identical microorganisms in at least two intraoperative cultures or a combination of preoperative aspiration and intraoperative cultures in the case of a microorganism of low virulence (e.g. coagulase-negative staphylococci, <i>Propionibacterium acnes</i> ). In the case of a virulent microorganism (e.g. <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> ), growth in a single specimen from synovial fluid, periprosthetic tissue and/or sonication fluid may also represent PJI. However, if there is growth only in one single specimen, other criteria for infection must be present [19].

<sup>a</sup>At least one of the five criteria is required for the diagnosis of PJI.

*Figuur 3 Definitie PJI door IDSA-guidelines (3)*

## Diagnostiek PJI

Indien een patiënt met een gewrichtsprothese dysfunctie zich presenteert bij de clinicus, moet een differentieel diagnose gemaakt worden tussen het aseptisch falen van het prothesegewricht en een gewrichtsprothese infectie (17). Deze differentiatie is van groot belang gezien de behandelingsstrategieën van beide condities van elkaar verschillen (4,45). Een accurate diagnose is daarom essentieel om een goede klinische outcome van de patiënt te kunnen verzekeren.

Bij een aantal patiënten kan er op basis van de klinische presentatie een sterk vermoeden van infectie aanwezig zijn. Andere casussen vereisen een uitgebreide laboratoriumdiagnostiek om aanwezigheid van infectie te bevestigen (17). Indien virulente kiemen, zoals *S. aureus*, de oorzakelijke verwekkers zijn van PJI, is de klinische presentatie meestal acuut (3,4,5,17). De typische symptomen die hiermee gepaard gaan zijn: koorts, warmte, erytheem en pijn gelokaliseerd ter hoogte van het gewricht (4,17). Coagulase-negatieve stafylokokken zullen eerder subacute of chronische infecties veroorzaken, die zich minder laten kenmerken door aanwezigheid van typische symptomen (17). Deze vorm van PJI gaat veelal gepaard met pijn en functieverlies van de prothese zonder corresponderende ontstekingsymptomen.

Aangezien tot op heden geen enkele test 100% accuraat is voor de diagnose van PJI, berust de diagnose op een combinatie van klinisch, biochemisch, histopathologisch en microbiologisch onderzoek (4,17). Ook beeldvorming kan hierbij niet ontbreken. In de preoperatieve evaluatie wordt een bepaling uitgevoerd van de Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) en het C-reactive proteïne (CRP) (17). Als drempelwaarden worden respectievelijk 30 mm/h en 10 mg/dl voorgesteld. Bij normale waarden voor beide parameters, is de waarschijnlijkheid van PJI klein (45). Hierbij moet worden opgemerkt dat deze infectie- en ontstekingsmerkers verhoogd kunnen blijven 30 tot 60 dagen na de ingreep (5, 19). De onderstaande beslissingsboom (Cfr. Fig. 4) is een schematisch overzicht van de diagnosestelling van PJI.

Het microbiologisch onderzoek is essentieel in de diagnose van PJI. Dit onderzoek bestaat uit een Gramkleuring en cultuur. De gramkleuring van periprosthetische weefselstalen kan nuttige informatie voortbrengen, al is de sensitiviteit van deze techniek meestal laag (0-27%) (2,4,18). Om deze reden is cultuur de hoeksteen in het microbiologisch onderzoek. Aan de hand van de identificatie van het etiologisch micro-organisme en zijn antibiogram kan een adequate antimicrobiële therapie worden ingesteld (18). In de preoperatieve evaluatie, wordt

aangeraden om een arthrocentesis uit te voeren. De analyse van synoviaal vocht moet bestaan uit celtelling, celdifferentiatie en cultuur (1). De IDSA-guidelines raden aan om een aerobe hemocultuurflles te inoculeren met een aliquot van het gewrichtsaspiraat (2). Culturen van zowel fistels als oppervlakkige wissers moeten worden vermeden, gezien hun lage predictieve waarden in de identificatie van de PJI-pathogeen (2,4). Aanwezigheid van *S. aureus* in cultuur afkomstig van een wisser afgenomen ter hoogte van de fistel zou wel gecorreleerd zijn met de PJI-pathogeen, al wordt dit in een aantal studies ook weer tegengesproken (4).

Intra-operatieve culturen moeten worden uitgevoerd op representatieve weefselstalen, die afgenomen worden rond het prothesemateriaal (1,2,4). In de praktijk, worden frequent intra-operatieve wissers afgenomen. E-swabs zouden een hogere opbrengst aan colony forming units (CFU) voortbrengen ten opzichte van andere swab-systemen (45), al is deze methode niet gevalideerd in de PJI-setting. De IDSA-guidelines raden hoe dan ook de cultuur van swabs af (2).

De detectie van bacteriën met conventionele cultuur op periprosthetische weefselstalen heeft een variabele sensitiviteit (65-94%) (5). Deze variabele sensitiviteit kan worden verklaard aan de hand van verschillende factoren. Eerst en vooral concentreren bacteriën zich voornamelijk op het oppervlak van het prothesemateriaal, waarbij de concentratie in de omliggende weefsels beperkt blijft (18). Dit type infectie wordt ook gekenmerkt door een lage bacteriële load (5). Bovendien vertonen bacteriën in de biofilm ook een vertraagde groeisnelheid (5). Daarnaast kan toediening van antibiotica tijdens de drie maanden voorafgaand aan de revisie, leiden tot negatieve weefselculturen en zodus tot een variabele en lage sensitiviteit (18). De IDSA-guidelines raden aan om de antimicrobiële therapie minstens twee weken voor de geplande revisie te stoppen, zodat een hogere graad van microbiële recovery wordt bereikt (1). Een niet-homogene verspreiding van bacteriën in de omliggende weefsels, maakt afname van meerdere weefselstalen noodzakelijk (30). Minstens drie tot zes weefselstalen moeten worden geïncubeerd om de sensitiviteit te verbeteren (2). De incubatieduur moet worden verlengd om fastidious bacteriën en biofilm-bacteriën met een vertraagde groeisnelheid in kweek te brengen (18). Tot op heden bestaat er geen consensus over de optimale incubatieduur (4). Een potentieel nadeel verbonden aan een verlengde incubatieduur is het in kweek brengen van contaminanten, met mogelijks vals positieve resultaten tot gevolg (4,18). Deze contaminanten benadelen de specificiteit van de conventionele cultuur. Vanzelfsprekend kunnen pre-analytische factoren zowel de

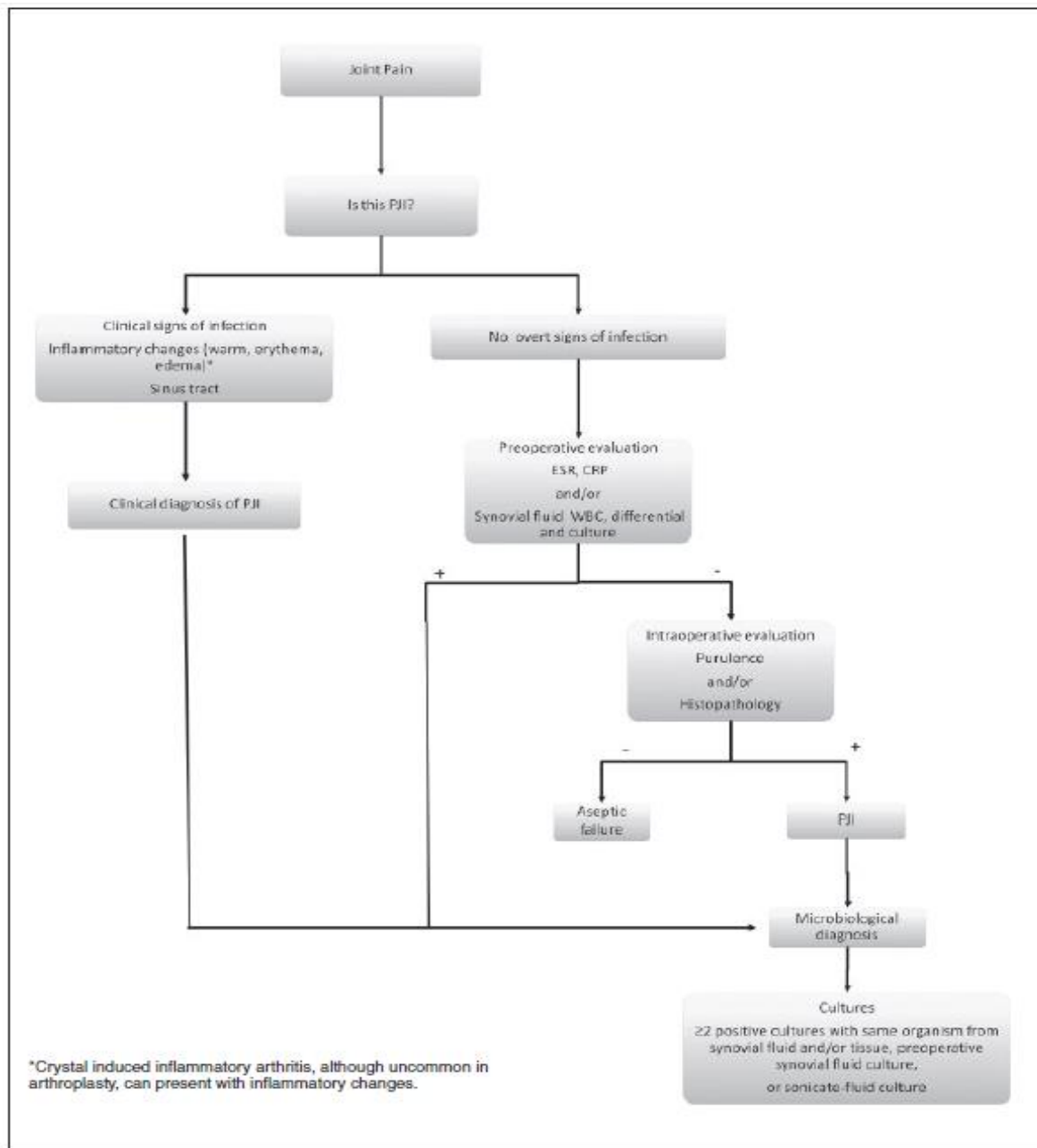
sensitiviteit als specificiteit beïnvloeden. Tijdens de afname, het transport, bewaring en bij manipulaties van het staal kan contaminatie optreden. Swab-culturen zouden hierbij blootgesteld worden een hoger contaminatierisico (18). In de IDSA-guidelines wordt aangeraden om een nieuwe steriele scalpel te gebruiken na de initiële incisie om het contaminatierisico bij afname te beperken (2). De MSIS gaat hier nog dieper op in en raadt aan om elk weefselstaal af te nemen met een nieuwe, steriele scalpel (19). Vals positieve resultaten kunnen immers leiden tot een bemoeilijkte interpretatie van de klinische significantie. Vooral laag virulente micro-organismen, die tevens deel kunnen uitmaken van de commensale huidflora, vormen hierbij een probleem. Om de interpretatie te vereenvoudigen worden volgende cutoff-waarden voorgesteld. Indien in de cultuur van minstens twee weefselstalen een fenotypisch identiek micro-organisme wordt vastgesteld, wanneer vijf weefselstalen werden afgenomen, moet deze groei als klinisch significant worden beschouwd (18). Wanneer echter een virulente kiem zoals *S. aureus* wordt geïsoleerd in één cultuur van één weefselstaal, moet deze ook als significant worden beschouwd (4).

Om de sensitiviteit van conventionele cultuur te verbeteren, werd onderzoek gedaan naar nieuwe benaderingen. Hiervoor werd teruggegrepen naar de pathogenese van de infectie. Aangezien bacteriën zich in een biofilm concentreren ter hoogte van het prothesemateriaal, kan het losmaken en in cultuur brengen van deze biofilm een hogere sensitiviteit opbrengen. Hiervoor werd een sonicatie-procedure voorgesteld (18, 45). Ultrasonische golven worden gegenereerd in een vloeibaar medium waarbij microscopische luchtballen zich zullen vormen. Deze luchtballen zullen vervolgens openbarsten waarbij energie vrijkomt die verantwoordelijk is voor het openbreken van de biofilm. Een afzonderlijke cutoff voor culturen van gesoniceerde vloeistof werd voorgesteld (4,18). Ook sonicatie zou omwille van zijn verschillende behandelingsstappen een hoger risico op contaminatie lopen (6). Een andere benadering om de sensitiviteit te verbeteren is het gebruik van een bead mill om stalen afkomstig van de verwijderde prothese te homogeniseren met als doel pathogenen in de biofilm te kunnen detecteren (2).

Aangezien de microbiologische diagnose met conventionele cultuur nog steeds haar beperkingen heeft, worden nu ook niet-cultuur gebaseerde methoden onderzocht om de diagnose van PJI te kunnen vast stellen. Binnen dit kader situeert zich de opkomst van moleculaire methoden in de diagnose van PJI. Identificatie van de oorzakelijke kiem blijft immers essentieel in de diagnose van PJI zodat een adequate behandelingsstrategie kan



worden uitgekozen. In deze CAT zal de bijdrage van breed spectrum 16S rRNA PCR in de diagnostiek van PJI worden onderzocht.



Figuur 4 Beslissingsboom in de diagnostiek van PJI (17)

## QUESTION(S)

---

- 1) Wat is de waarde van 16S rRNA gen PCR en sequentie-analyse in de diagnose van gewrichtsprothese-infectie (Prosthetic Joint Infection, PJI)?

## SEARCH TERMS

---

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: "Prosthetic Joint Infection" AND "Molecular diagnostics" AND "16S rRNA Polymerase Chain reaction"
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters "Prosthetic Joint infection" (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)
- 3) Pubmed (Medline; from 1966), "Prosthetic Joint Infection", "Molecular diagnostics", "PCR", "16S rRNA",
- 4) UpToDate Online (2015) "Prosthetic Joint infection"

## RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

---

- *Guidelines and Recommendations:*
  1. Infectious Diseases Society of America. Diagnosis and management of Prosthetic Joint infection. *Clinical Infectious Diseases* 2013;56
  2. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clinical Infectious Diseases* 2013;57: e22-121
- *Reviews*
  3. Zimmerli W. Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. *J Intern Med* 2014; 276: 111-119
  4. Tande A.J., Patel R. Prosthetic Joint Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014, 27(2):302
  5. Zimmerli W., Trampuz A., Ochsner P.E. Prosthetic-Joint Infections. *N Engl J Med* 2004; 351: 1645-54
  6. Saeed K. Diagnostics in prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother* 2014, 69 Suppl 1: i11-i19
  7. Hartley J., Harris K. Molecular techniques for diagnosing prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother* 2014, 69 Suppl 1: i21-i24

8. Sontakke S., Cadenas M., Maggi R., Diniz P., Breitschwerdt E., Use of Broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology
  9. Levy P-Y., Fenollar F. The role of molecular diagnostics in implant-associated bone and joint infection. *Clin Microbiol Infect* 2012, 18: 1168-1175
  10. Janda J.M., Abott S.A., Culture-independent diagnostic testing: have we opened Pandora's box for good? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2014, 80: 171-176
  11. Esteban J., Sorli L, et al. Conventional and molecular diagnostic strategies for prosthetic joint infections. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2014: 14, 83-96
- *Original Articles*
    12. Lleo M., Ghidini V., Tafi M., Castellani F. et al, Detecting the presence of bacterial DNA by PCR can be useful in diagnosing culture-negative cases of infection, especially in patients with suspected infection and antibiotic therapy. *FEMS Microbiol Lett* 2014, 354: 153-160
    13. Rampini S., Bloemberg F., Keller P., et al. Broad-Range 16S rRNA Gene Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Culture-Negative Bacterial Infections. *CID* 2011, 53: 1245-51
    14. Jensen K., Dargis R., Ribosomal PCR and DNA sequencing for detection and identification of bacteria: experience from 6 years of routine analysis of patient samples. *APMIS* 2014; 122: 248-255
    15. Edwards K., Logan J., Langham S. et al, Utility of real-time amplification of selected 16S rRNA gene sequences as a tool for detection and identification of microbial signatures directly from clinical samples. *Journal of Medical Microbiology* 2012, 61: 645-652
    16. Kommedal O., Lekang K., Langeland N., Wiker H., et al. Characterization of polybacterial clinical samples using a set of group-specific broad-range primers targeting the 16S rRNA gene followed by DNA sequencing and RipSeq Analysis. *Journal of Medical Microbiology*, 2011: 60, 927-936
    17. Gomez E., Patel R., Laboratory Diagnosis of Prosthetic Joint Infection, Part I, *Clinical Microbiology Newsletter* 2011, 33:8
    18. Gomez E., Patel R., Laboratory Diagnosis of Prosthetic Joint Infection, Part II, *Clinical Microbiology Newsletter* 2011, 33:9
    19. Parvizi J., Zmistowski B., Berbari E., et al. New Definition of Periprosthetic Joint Infection. *Clin Orthop Relat Res* 2011, 496:2992-2994
    20. Grif K., Heller I., Prodinger W., Lechleitner K., Lass-Flörl, Orth D. Improvement of Detection of Bacterial Pathogens in Normally Sterile Body Sites with a Focus on Orthopedic Samples by Use of a Commercial 16S rRNA Broad-Range PCR and Sequence Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50 (7): 2250

21. Plouzeau C., Bémer P., Valentin A.S., et al. First Experience of a Multicenter External Quality Assessment of Molecular 16S rRNA Gene Detection in Bone and Joint infections. *J. Clin. Microbiol.* 2014, 53: 419-424
22. Bémer P., Plouzeau C., Tande D., et al. Evaluation of 16S rRNA Gene PCR sensitivity and Specificity for Diagnosis of Prosthetic Joint Infection: a Prospective Multicenter Cross-Sectional Study. *J. Clin. Microbiol.* 2014, 52: 3583-3589
23. Vandercam B., Jeumont S., Cornu O., et al. Amplification-Based DNA Analysis in the diagnosis of Prosthetic Joint Infection. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2008, 10
24. Panousis K., Grigoris P., Butcher I., et al. Poor predictive value of broad-range PCR for the detection of arthroplasty infection in 92 cases. *Acta Orthopaedica* 2005; 76 (3°): 341-346
25. Fihman V., Hannouche D., Bousson V., et al. Improved diagnosis specificity in bone and joint infections using molecular techniques. *Journal of Infection* 2007; 55, 510-517
26. De Man F.H.R., Graber P., Lüem M, et al. Broad-Range PCR in Selected Episodes of Prosthetic Joint Infection. *Infection* 2009; 37: 292-294
27. Fenollar F., Roux V., Stein A., et al. Analysis of 525 Samples To Determine the Usefulness of PCR Amplification and Sequencing of the 16S rRNA Gene for Diagnosis of Bone and Joint Infections. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44: 1018-1028
28. Marin M., Garcia-Lechuz J.M., Alonso P., et al. Role of Universal 16S rRNA Gene PCR and Sequencing in Diagnosis of Prosthetic Joint Infection. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50: 583
29. Gomez E., Cazanave C., Cunningham S., et al. Prosthetic Joint Infection Diagnosis Using Broad-Range PCR of Biofilms Dislodged from Knee and Hip Arthroplasty Surfaces Using Sonication. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50: 3501
30. Bjerkan G., Witso E., Nor A., et al. A comprehensive microbiological evaluation of fifty-four patients undergoing revision surgery due to prosthetic joint loosening. *Journal of Medical Microbiology* 2012, 61: 572-581
31. Cazanave C., Greenwood-Quaintance K., et al. Rapid Molecular Microbiologic Diagnosis of Prosthetic Joint Infection. *J. Clin. Microbiol* 2013, 51: 2280
32. Suda A., Kommerell M., Geiss H., et al. Prosthetic Infection: improvement of diagnostic procedures using 16S ribosomal deoxyribonucleic acid polymerase chain reaction. *International Orthopaedics* 2013, 37: 2515-2521
33. Ryu S., Greenwood-Quaintance K., Hanssens A., et al. Low sensitivity of periprosthetic tissue PCR for prosthetic knee infection diagnosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2014, 79: 448-453
34. Haag H., Locher F., Nolte O. Molecular diagnosis of microbial aetiologies using SepsiT<sup>TM</sup> in the daily routine of a diagnostic laboratory. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013, 76: 413-418

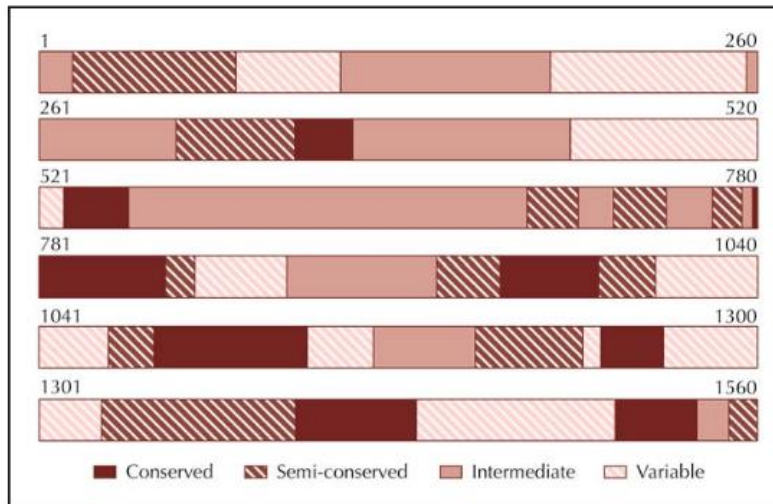
35. Qu X., Zhai Z., Li H. et al. PCR-Based diagnosis of Prosthetic Joint Infection. *J. Clin. Microbiol* 2013, 51: 2742
  36. Li Z., Yu A., Diagnostic Value of a PCR-Based Technique for Prosthetic Joint Infection. *J. Clin. Microbiol* 2014, 52: 2281
  37. Zhai Z., Qu X., Dai K., Reply to “Diagnostic Value of a PCR-Based Technique for Prosthetic Joint Infection”. *J. Clin. Microbiol* 2014, 52: 2283
  38. Bereza P., Ekiel A., Augusciak-Duma A., et al. Identification of silent prosthetic joint infection: preliminary report of a prospective controlled study. *International Orthopaedics* 2013, 37: 2037-2043
  39. Dempsey K., Riggio M., Lennon A., et al. Identification of bacteria on the surface of clinically infected and non-infected prosthetic hip joints removed during revision arthroplasties by 16S rRNA gene sequencing and by microbiological culture. *Arthritis Research & Therapy* 2007, 9: R46
  40. Levy P-Y, Fournier P.E., Fenolloar F., Raoult D., Systematic PCR Detection in Culture-negative Osteoarticular Infections. *The American Journal of Medicine* 2013, 126: 1143.e25-1143.e33
  41. Rak M., Barlic-Maganja D., Kavcic M., et al. Comparison of molecular and culture method in diagnosis of prosthetic joint infection. *FEMS Microbiol Lett.* 2013, 343: 42-48
- Reference Works, Handbooks and Databases
    42. Baddour L.M., Berbari E., et al. Treatment of Prosthetic Joint Infections. UpToDate version 19.0
    43. Baddour L.M., Berbari E., et al. Clinical Manifestations and Diagnosis of Prosthetic Joint Infections. UpToDate version 19.0
    44. Van Pelt-Verkuil E., Van Leeuwen W.B., Moleculaire Diagnostiek, *Heron-reeks*.
  - Posters, “grey literature”, presentations
    45. Verhaegen J., Diagnosis of prosthetic Joint infection, *Presentatie*
    46. Claeys, G., Evidence-based aanpak van nieuwe ontwikkelingen en resultaten van gewrichtsarthroplastiek. Diagnostiek van periprothetische infecties: wat is de gouden standaard? *Presentatie Postgraduaat Klinische Biologie, 28 januari 2014.*
    47. Lagrou K., Broad range PCR tests for the detection of microorganisms: opportunities and limitations. *Presentatie VAKB-symposium, 5 februari 2015*
    48. [www.molzymb.com](http://www.molzymb.com) [Geraadpleegd op 2 februari 2015]

### **I. Wat is de waarde van 16S rRNA gen PCR en sequentie-analyse in de diagnose van gewrichtsprothese-infecties?**

#### **I.1 Is er een plaats voor 16S rRNA gen PCR in de directe detectie van bacteriële pathogenen in klinische stalen?**

Niet-cultuur gebonden methoden zijn erg aantrekkelijk in casussen, waarbij de conventionele microbiologische methoden er niet in slagen om de etiologische verwekker te isoleren ondanks een sterk vermoeden van infectie (Cfr. Supra diagnostiek PJI) (8,13). Tot de niet-cultuur gebonden methoden behoort onder andere de moleculaire diagnostiek (9). Binnen de moleculaire diagnostiek kan men een onderscheid maken tussen enerzijds multiparameter testing met behulp van micro-arrays en anderzijds polymerase chain reaction-technieken (PCR) (47). Voor het identificeren van micro-organismen rechtstreeks op klinische stalen kunnen verschillende PCR-technieken worden aangewend (9). Deze includeren pathogeen-specifieke PCR-assays, multiplex PCR-assays en broad-range PCR-assays (20). De klinische bruikbaarheid van pathogeen-specifieke technieken wordt gelimiteerd door het groot aantal pathogenen die potentieel geassocieerd zijn met infectie (20). Deze techniek vertoont wel een hogere sensitiviteit en specificiteit ten opzichte van broad-range PCR wanneer het uitgevoerd wordt in een gesloten systeem. Een nadeel van deze techniek is zijn mogelijkheid om slechts één bacterieel species te detecteren (9). Deze pathogeen-specifieke PCR kan wel nuttig zijn om de resultaten van broad-range PCR te confirmeren (9). Multiplex real-time PCR maakt een snelle identificatie van verschillende bacteriën mogelijk door gebruik te maken van een panel van verschillende primers gericht tegen verschillende bacteriële species. Micro-organismen die niet als target worden gebruikt in de analyse, kunnen bijgevolg ook niet met deze techniek gedetecteerd worden. Broad-range 16S ribosomaal RNA (rRNA) PCR gevolgd door sequentie-analyse, laat potentieel de directe detectie toe van alle kweekbare en niet-kweekbare bacteriën in klinische stalen (12,13,15). Het eubacteriële 16S rRNA gen bevat zowel variabele fragmenten als sterk geconserveerde fragmenten. Deze laatste zijn aanwezig in een wijde distributie van bacteriële species (Figuur 5). Dit gen, met een lengte van ongeveer 1,5 kb, wordt regelmatig als target gebruikt in de moleculaire diagnostiek om de identiteit van een bacterie te achterhalen (14).

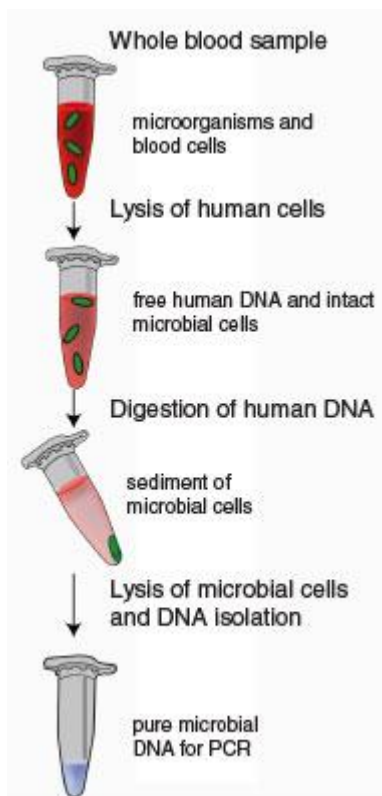
*Figuur 5 Eubacterieel 16S rRNA gen (47)*



**Figure 1.** Schematic representation of conserved and variable regions in bacterial 16S ribosomal DNA (1560 bp) based on the alignment of DNA sequences from *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Abitrophia*, *Listeria*, *Coxiella*, *Legionella*, *Bartonella*, *Brucella*, and *Francisella* spp. Level of homology: Conserved,  $\geq 95\%$  conserved; semi-conserved, 80%–94% conserved; intermediate, 20%–79% conserved; and variable,  $< 20\%$  conserved. Nucleotide numbers are indicated at the horizontal bars at the ends of each stretch of sequence.

Om bacteriën in een klinisch staal met behulp van PCR te detecteren, wordt eerst het bacterieel DNA geëxtraheerd en opgezuiverd. Omwille van een sterke aanwezigheid van humaan cellulair materiaal, proteïnes en/of fibreus materiaal in het staal, wordt een voorbehandelingsstap aangeraden om een optimale kwaliteit van het bacterieel DNA-extract te bekomen (9). Een proteïnase (vb. proteïnase K) en/of een lysisbuffer kan hiervoor worden gebruikt (9). Verschillende extractie- en purificatie-protocollen werden in de literatuur beschreven. Aangezien verscheidene geconserveerde regio's in het eubacteriële 16S rRNA gen aanwezig zijn, kunnen verschillende primersequenties worden ontwikkeld (8). Met de verkregen DNA-sequentie kan similariteit met andere DNA-sequenties worden nagegaan in een publieke sequentie database (genbank) die gebruikt maakt van het BLAST-algoritme, waarbij tot een identificatie op genus en/of species niveau wordt gekomen. Bij aanwezigheid van een polymicrobiële infectie, bemoeilijkt een gemengd chromatogram het identificatieproces (9). RipSeq Mixed (iSentio) is een ander algoritme dat wel in staat zou zijn om gemengde chromatogrammen van maximum drie verschillende bacteriële species te interpreteren (16).

Het gebruik van 16S rRNA gen PCR gaat echter ook gepaard met een aantal bronnen van onzekerheid. Een eerste bron van onzekerheid kan gerelateerd worden aan de extractiemethode. In het staal is het humaan DNA in overmaat aanwezig ten opzichte van het bacterieel DNA. Hierdoor kunnen onspecifieke PCR-signalen veroorzaakt worden. Dit heeft een vermindering van de sensitiviteit tot gevolg (9,48). Zowel in house extractie-protocollen als commerciële protocollen werden beschreven. Deze verschillende methoden zorgen tevens voor een bron van variatie. Een commerciële kit van Molzym (Duitsland), de Universal Microbe Detection™-kit, maakt gebruik van een gepatenteerde technologie,



Figuur 6 MolYsis-extractie (48)

MolYsis, waarbij het humaan DNA wordt verwijderd, met een aanrijking van het bacterieel DNA tot gevolg (Cfr. Fig.6) (48).

De keuze van de primersets vormt een tweede bron van onzekerheid. Verschillende 16S rRNA-primers kunnen worden ontwikkeld, aangezien verschillende geconserveerde regio's in het 16S rRNA gen aanwezig zijn. Ondanks dat een breed spectrum van bacteriën kan geïdentificeerd worden met behulp van deze primers, is het onwaarschijnlijk dat elke primerset alle bacteriën kan amplificeren (8). Daarnaast zal de lengte van de primer een invloed hebben op de sensitiviteit van de analyse en de identificatie van het amplicon (8,15).

Een derde bron is de aanwezigheid van polymicrobiële infecties. De verschillende bacteriële nucleïnezuren, afkomstig van verschillende bacteriële species in het staal, staan in

competitie ten opzichte van elkaar voor dezelfde reagentia. Diegene die in lagere concentratie aanwezig zijn lopen risico om niet gedetecteerd te worden. Bovendien vormen de gemengde chromatogrammen een bron van interpretatie-moeilijkheden. Deze kunnen gedeeltelijk worden opgelost, door gebruik te maken van de RipSeq analyse (16). De Universal Microbe Detection™-kit van Molzym, beperkt gemengde chromatogrammen door in de DNA-sequentie analyse 16S rRNA-primerssets te gebruiken, die gericht zijn op enerzijds Grampositieve en anderzijds op Gramnegatieve bacteriën en dit in gescheiden reactiemilieus. Een andere benadering om tot een identificatie van de verschillende aanwezige bacteriële species te komen, is door middel van klonering procedures. Dit is echter een tijd rovende methode en weinig geschikt als routine-toepassing (9).

Het gebruik van een publieke of een commerciële databank kan een vierde bron van onzekerheid vormen. De gebruikte databank heeft immers een invloed op de identificatie van de bacterie. Het genus en species identificatie wordt als correct beschouwd indien een sequentie-similariteit van respectievelijk  $\geq 97\%$  en  $\geq 99\%$  met de referentie sequenties van stammen uit de database wordt bereikt (20).



Tot slot is PCR ook in staat om bacterieel DNA van niet levensvatbare cellen te detecteren. In de literatuur werd gerapporteerd dat in een aantal casussen van infectieuze endocarditis, het bacterieel DNA van de causatieve verwekker maanden tot jaren na de therapie aanwezig bleef. Of er ook bij PJI een link aanwezig is tussen de huidige episode en het geamplificeerde DNA moet nog verder worden geëvalueerd. Momenteel is er geen data uit studies beschikbaar voor dit potentieel diagnostisch probleem (9).

Naast bovenstaande bronnen van onzekerheden, kampt de 16S rRNA gen PCR analyse ook met een contaminatierisico (8,9). Regelmatig worden kiemen uit de omgevingsflora gedetecteerd, waarbij de interpretatie wordt bemoeilijkt. Deze vals positieve resultaten kunnen worden gegenereerd, als gevolg van contaminanten aanwezig in reagentia of in het staal. Contaminatie kan immers optreden tijdens de staalcollectie, DNA-extractie en PCR-analyse. Gebruik van RNA-/DNA-vrije reagentia, RNA-/DNA-vrije pipettips en aanwezigheid van een aangepaste infrastructuur met gescheiden pre-PCR-, PCR- en post-PCR-ruimtes, zijn in deze setting onontbeerlijk (8). Onderstaande beslissingsboom kan een hulp zijn in de interpretatie van de klinische relevantie van de geïdentificeerde kiem (8). Bovendien moeten aangepaste controles aan het analyseproces worden toegevoegd om vals positieve resultaten op te pikken en te verwerpen (8,9). Niet alleen negatieve controles, maar ook positieve controles moeten worden geïmplementeerd in elke run. Een negatieve controle kan bestaan uit nucleasevrij water. Positieve controles kunnen bijvoorbeeld bestaan uit enerzijds een matrix die gespiket wordt met een gekende hoeveelheid *E. coli*-cellen om de efficaciteit van het extractie- en purificatieprotocol na te gaan. Anderzijds, kan een positieve controle ook samengesteld worden uit een matrix waaraan opgezuiverd *E. coli*-DNA werd toegevoegd, om de efficiëntie van het PCR-proces te controleren. Ook een interne controle die de aanwezigheid van PCR-inhibitoren in het staal controleert, moet in de PCR-analyse worden geïmplementeerd. Deze interne controle heeft meestal het humaan beta-globin als target (9,12). De interne controle van de Molzym-kit bestaat uit een niet gespecificeerde DNA-sequentie waaraan een aliquot van het staalextract wordt toegevoegd. Indien het amplicon wordt gegenereerd, zijn er geen PCR-inhibitoren in het staalextract aanwezig.

Of het gebruik van 16S rRNA gen PCR-analyse op een klinisch staal een invloed heeft op de outcome van de patiënt, is voorlopig nog niet gekend. Hieromtrent werden nog geen studies uitgevoerd. De PCR-analyse kan bij een positief resultaat de aanwezigheid van een infectieus proces ondersteunen. Daarnaast kan het PCR-resultaat de antibiotica-keuze beïnvloeden, al kunnen geen gevoeligheidsbepalingen worden uitgevoerd met een PCR-analyse.

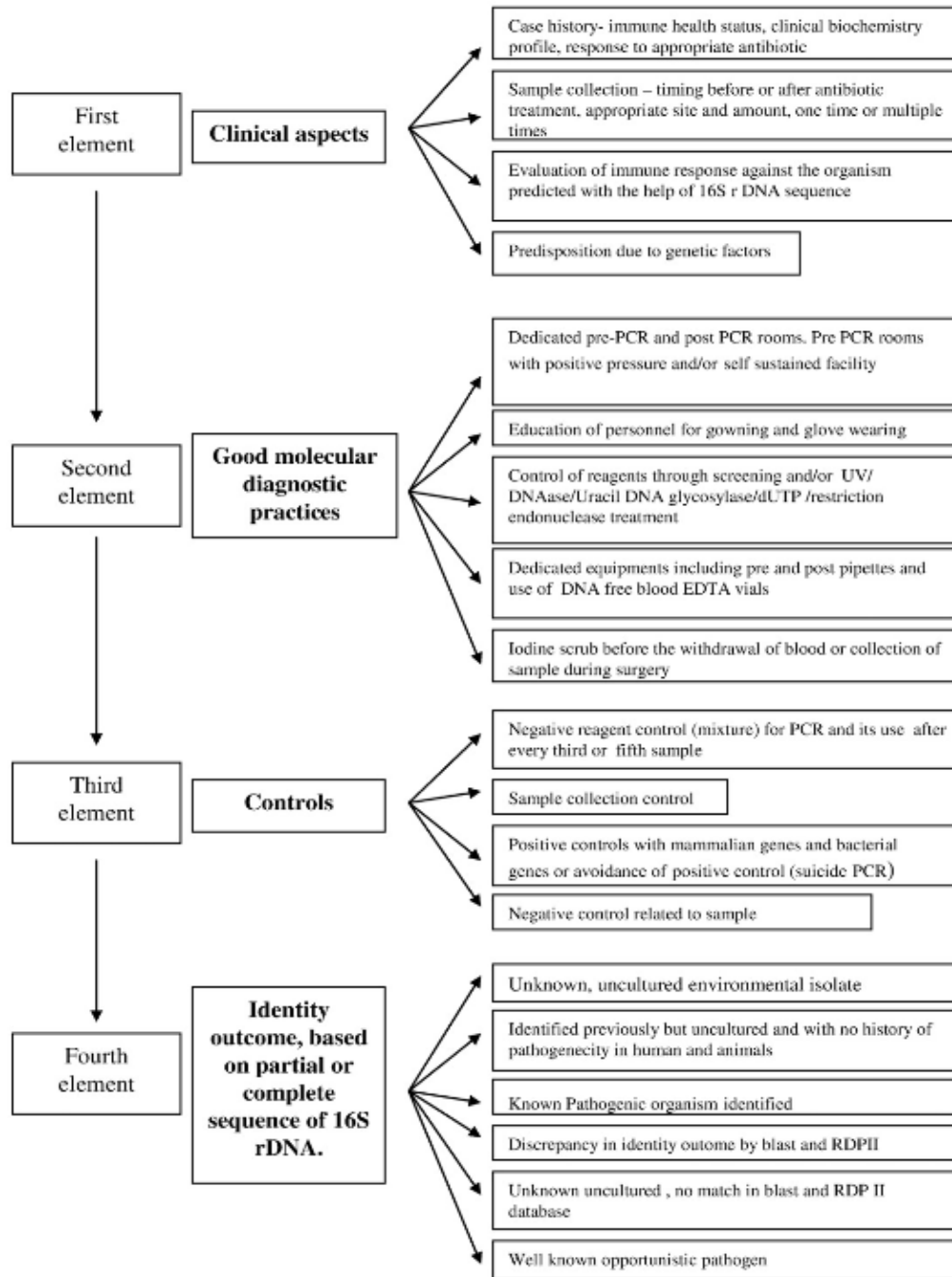


Fig. 1. Decision making tree for the determination of likelihood of identified organism as a contaminant or pathogen.

Figuur 6 Beslissingsboom (8)

1.2 Welke pre-analytische factoren moeten in acht worden genomen bij het uitvoeren van 16S rRNA gen PCR en sequentie-analyse ?

### 1.2.1 Hoeveel en welk type stalen dienen afgenomen te worden om een goede testperformantie te bereiken?

In de standaard diagnostische aanpak voor het vaststellen van de etiologische verwekker van PJI moeten een aantal intra-operatieve stalen worden gecollecteerd voor cultuur (1,2,4). Er wordt steeds aangeraden om naast synoviaal vocht (17), tevens drie tot zes weefselbiopten te collecteren (2). Deze biopten kunnen afkomstig zijn van het gewrichtskapsel en de interface membraan. Dit laatste is de membraan tussen de prothese en het bot. De interface membraan zou een hogere bacteriële lading bevatten ten opzichte van het gewrichtskapsel, waardoor een voorkeur voor dit type staal voor cultuur wordt verkozen (30). Naast periprosthetische weefselstalen, zou ook het gebruik van sonicatie van prothesen tot een betere sensitiviteit van cultuur leiden (4,18,45). In de literatuur wordt er weinig beschreven over het staaltipe en het aantal stalen dat het best wordt aangewend om een PCR-analyse op uit te voeren.

Marin et al. (2011) stelde vast dat 16S rRNA gen PCR meer specifiek is dan cultuur (28). In deze studie werden per patiënt (n=122) meerdere weefselbiopten en intra-operatief gecollecteerd synoviaal vocht parallel onderzocht met cultuur en PCR. Deze onderzoeksgroep bestudeerde daarnaast het aantal positieve stalen die nodig zijn om een optimale correlatie met de aan- of afwezigheid van infectie te verkrijgen. Hierbij kwam men tot het besluit dat één positief 16S rRNA PCR-resultaat voldoende specificiteit (96.3%) en een goede positieve predictieve waarde (91.7%) heeft om PJI vast te stellen. Dit in tegenstelling tot cultuur waar groei van hetzelfde micro-organisme in minimum twee stalen nodig is om PJI te kunnen diagnosticeren. De sensitiviteit van cultuur zou in deze studie beter zijn dan voor 16S rRNA PCR, al is de specificiteit van PCR hier superieur aan deze van cultuur. Daarnaast onderzocht Marin et al. ook hoeveel stalen idealiter dienen afgenomen te worden voor cultuur enerzijds, en 16S rRNA PCR anderzijds. Isolatie van hetzelfde micro-organisme in drie of meer culturen afkomstig van vijf stalen vertoont de beste sensitiviteit (80%) en specificiteit (96.8%). De beste combinatie van resultaten met breed spectrum PCR werden verkregen indien vijf stalen werden gecollecteerd en minstens twee van hen positief werden bevonden (sensitiviteit 94% en specificiteit 100%). Eén 16S rRNA PCR positief resultaat is echter zeer suggestief voor de aanwezigheid van PJI, zelfs wanneer een laag aantal stalen werden geanalyseerd (Cfr. Fig. 7).

TABLE 5 Probability of PJI considering results of culture or 16SPCR for 1 to 7 samples analyzed

Sensitivity		Specificity							LR														
Test and no. of positive samples	Probability for the following no. of samples analyzed:							Test and no. of positive samples	Probability for the following no. of samples analyzed:														
	1	2	3	4	5	6	7		1	2	3	4	5	6	7								
<b>Culture</b>																							
≥1	0.67	0.89	0.96	0.99	1	1	1	≥1	0.84	0.7056	0.5927	0.4979	0.4182	0.3513	0.2951	All negative	0.39	0.15	0.06	0.02	0.01	0	0
≥2		0.45	0.75	0.89	0.96	0.98	0.99	≥2		0.97	0.93	0.88	0.82	0.75	0.69	1 positive	4.19	1.65	0.65	0.25	0.1	0.04	0.02
≥3			0.3	0.6	0.8	0.9	0.96	≥3				0.986	0.968	0.944	0.913	2 positive		17.54	6.89	2.71	1.06	0.42	0.16
																≥3 positive		73.43	41.51	25.03	16.12	11.04	
<b>16S PCR</b>																							
≥1	0.64	0.87	0.95	0.98	0.99	1	1	≥1	0.98	0.97	0.95	0.93	0.92	0.9	0.89	All negative	0.37	0.13	0.05	0.02	0.01	0	0
≥2		0.41	0.7	0.86	0.94	0.97	0.99	≥2		1	1	1	1	1	0.99	1 positive	37.65	13.79	5.05	1.85	0.68	0.25	0.09
≥3			0.26	0.55	0.75	0.87	0.94	≥3			1	1	1	0.9999	0.9998	2 positive		1417.3	519.05	190.09	69.62	25.5	9.34
																≥3 positive		53,357.2	28,104.1	15,643.6	9,216.14	5,738.49	

Figuur 7 Probabiliteit van PJI (28)

In een studie van Ryu S. et al (2014), werd vastgesteld dat de sensitiviteit van PCR (16%) op periprosthetische weefselstalen veel lager was dan de sensitiviteit van PCR op gesoniceerde vloeistof (78%). Bovendien was de sensitiviteit van cultuur op weefstalen (69%), synoviaal vocht (77%) en gesoniceerde vloeistof (77%) duidelijk hoger. Bij deze studie moeten enkele kanttekeningen worden gemaakt. Er werd geen gebruik gemaakt van 16S rRNA gen PCR, maar van multiplex PCR waarbij een panel van primers met als target bacteriën die frequent geassocieerd worden met PJI, werd gebruikt. Bovendien werden twee weefselstalen geïncubeerd voor cultuur en een afzonderlijk weefselstaal geïncubeerd voor PCR. Aangezien bacteriën in lage concentraties aanwezig zijn in het omliggende weefsel en daarin niet-homogeen verdeeld zijn, kan deze sampling strategie invloed hebben op de verkregen resultaten. Daarnaast werden slechts kleine volumes weefselstaal geanalyseerd met PCR. Deze factoren kunnen leiden tot een “sampling error”. Tot slot waren de stalen voor cultuur en PCR in deze studie enkel afkomstig van knieprothesen. Ryu S. et al kon in deze studie geen meerwaarde van PCR ten opzichte van cultuur in de diagnose van PJI aantonen.

Qu X. et al (2013) voerde een meta-analyse uit waarin 14 studies werden geïncludeerd en in totaal drie staaltypes werden bestudeerd: weefselstalen, synoviaal vocht en gesoniceerde vloeistof afkomstig van prothesen. In 11 studies werd het 16S rRNA gen als target gen gebruikt. 8 studies werden prospectief uitgevoerd. In een subgroep-analyse werd vastgesteld dat het gebruik van weefselstalen in PCR-analyses tot een verbeterde sensitiviteit van PCR leidt.

Op basis van deze beperkte literatuur kunnen we concluderen dat PCR-analyse steeds naast conventionele cultuur moet worden uitgevoerd. Het is hierbij aangewezen om steeds vijf intra-operatieve stalen te collecteren en te analyseren (28). Verder is het nog onduidelijk of PCR-analyse op gesoniceerde vloeistof een meerwaarde heeft ten opzichte van weefselstalen. Als gevolg van beperkte data kunnen hierover geen conclusies worden

getrokken. In deze PJI-setting zijn geen studies omtrent het gebruik van intra-operatieve wissers of e-swabs in de PCR-analyse beschikbaar.

### 1.2.2 Welke maatregelen dienen genomen te worden om het contaminatierisico te beperken?

Een ander zeer belangrijk aspect in de pre-analytische fase van 16S rRNA gen PCR is het vermijden van contaminatie bij afname en transport van het staal. Contaminanten uit de omgevingsflora kunnen immers de oorzaak zijn van vals-positieve resultaten. PCR assay's mogen enkel worden uitgevoerd op vochten die verkregen werden door middel van naaldaspiratie en op periprosthetische weefselstalen die werden afgenomen met steriele instrumenten. De IDSA-guidelines schrijven voor om na de initiële incisie een nieuwe steriele scalpel te gebruiken voor de afname van de weefselstalen (2). De MSIS-werkgroep raadt zelfs aan om telkens een nieuwe steriele scalpel te gebruiken voor de afname van elk weefselstaal (19). De gecollecteerde stalen dienen in steriele recipiënten voor analyse onmiddellijk naar het laboratorium te worden gebracht. Ten slotte moet contaminatie tijdens het analyseproces worden beperkt door middel van een combinatie van controle-en preventiemaatregelen (Cfr. Fig. 8).

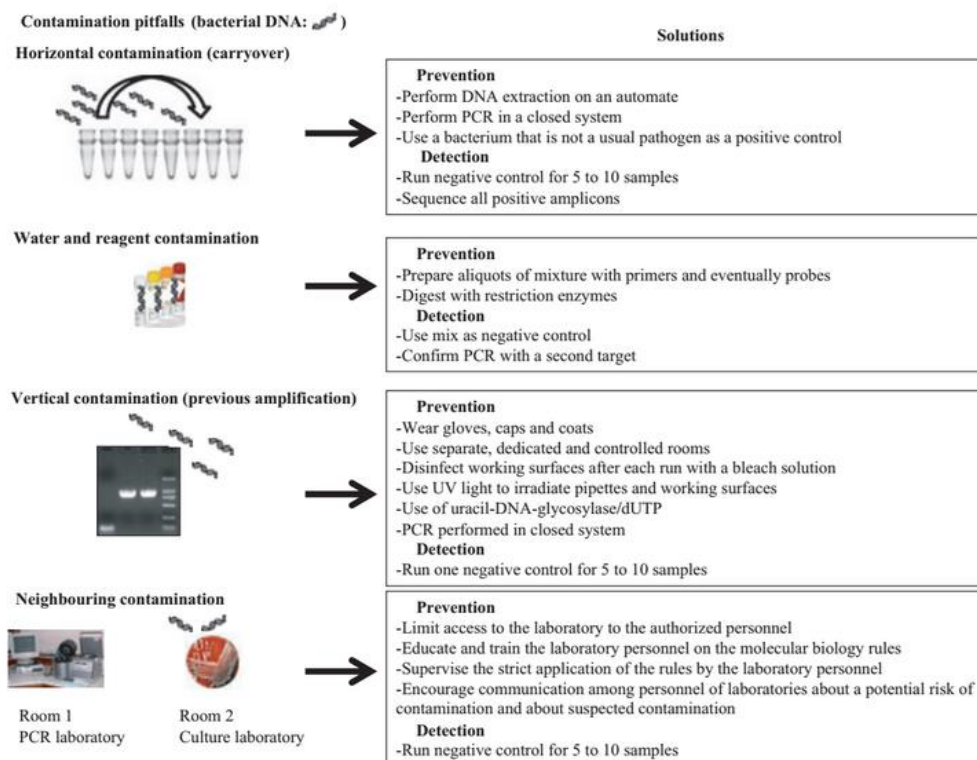


FIG. 1. The most frequent contamination pitfalls and the solutions for their prevention and detection.

Figuur 8 Controle en preventiemaatregelen om DNA-contaminatie te beperken

Verscheidende bronnen van contaminatie tijdens de PCR-analyse kunnen worden aangeduid. Contaminatie kan het gevolg zijn van carry-over, maar kan ook afkomstig zijn van het werkoppervlak, gebruikte proefbuizen en pipetten, haren en kledij van de medisch laboratorium technoloog (MLT) of van amplicons uit vorige PCR-assays die in de ruimte aanwezig zijn. Sonicatie van prothesemateriaal zou omwille van de verschillende behandelingsstappen een hoger risico op contaminatie lopen (6).

In verschillende reviews wordt het hoge contaminatierisico dat gepaard gaat met breedspectrum 16S rRNA gen PCR besproken. Desondanks ontbreken systematische data omtrent de contaminatierate in en de impact van de gebruikte preventie- en controlemaatregelen op de PCR-analyse.

### 1.3 Wat is de diagnostische performantie van 16S rRNA gen PCR en sequentie-analyse?

Er bestaat geen gouden standaardtest om PJI vast te stellen (4). De gebruikte definitie van PJI heeft bijgevolg een centrale plaats in de diagnose (17). Om deze reden heeft de toegepaste definitie een rechtstreekse invloed op de verkregen testkarakteristieken (sensitiviteit, specificiteit) (17). Ook een verschillend studiedesign, een verschillende studipopulatie en het gebruik van verschillende cutoff-waarden om een casus als positief te beschouwen zullen een invloed hebben op de performantie van de test (41).

Weinig studies beschrijven de analytische sensitiviteit (Limit of Detection, LOD) van hun gebruikte in-house protocollen in de PJI-setting. In een studie van Gomez et al werd de analytische sensitiviteit geschat tussen de  $10^3$  en  $10^4$  CFU/ml wanneer een CP (crossing point) van <26 cyclussen werd gehanteerd (29). Deze CP-waarde is het punt waarbij de DNA-amplificatie de fluorescentie drempelwaarde bereikt in een real-time PCR analyse. In deze studie werd een real-time-PCR-resultaat als positief beschouwd wanneer de CP-waarde lager was dan 26 cyclussen (29). Verder werden er geen data teruggevonden over de analytische sensitiviteit in 16S rRNA gen PCR-protocollen in de PJI-setting.

Moleculaire methoden hebben in theorie een hogere klinische sensitiviteit en specificiteit ten opzichte van cultuur (41). Deze methoden kunnen immers bacterieel DNA detecteren van fastidious, niet-cultiveerbare en traag groeiende bacteriën in de biofilm (9). Bovendien worden deze methoden minder beïnvloed door voorafgaand antibioticagebruik ten opzichte van cultuur (9).

In de praktijk publiceren verschillende studies tegenstrijdige evidenties. Een aantal studies rapporteren een hogere sensitiviteit, maar een lagere specificiteit ten opzichte van cultuur.

Panousis et al (2005) stelde een sensitiviteit van 92% en een specificiteit van 74% vast bij het gebruik van 16S rRNA gen PCR. Conventionele cultuur daarentegen had slechts een sensitiviteit van 75%, maar een specificiteit van 96%. De positieve predictieve waarde (PPV) van PCR bedroeg slechts 34%. In deze studie werden 91 patiënten, die een revisie ondergingen, geïncludeerd. Synoviaal vocht werd intra-operatief geïncubeerd en bestudeerd met behulp van breed spectrum PCR en cultuur. Hun advies luidt dat PCR niet aanbevolen kan worden voor routine gebruik in de diagnose van PJI. In deze studie wordt echter enkel synoviaal vocht geanalyseerd om de diagnose van PJI vast te stellen. Volgens de huidige richtlijnen (2) moeten minstens 3 tot 6 weefselstalen worden geanalyseerd, naast synoviaal vocht, om PJI te kunnen diagnosticeren. Bijgevolg kan de keuze van het te analyseren staal in deze studie als suboptimaal worden beschouwd. Een andere studie van Vandercam et al (2008) vertoonde eveneens een hogere sensitiviteit voor PCR (91.2%) ten opzichte van cultuur (64.7%). In deze studie werden drie tot zes stalen afgenomen per patiënt (n= 41 PJI, n=28 controle) van weefsels op verschillende plaatsen rondom de prothese. De intra-operatieve stalen bestonden uit weefselstalen, aspiraten en swabs. De PCR-analyse gebeurde onder strikte condities ter preventie van contaminatie.

Een hogere sensitiviteit van PCR in de diagnose van PJI, kan o.a. toegeschreven worden aan het gebruik van antibiotica voorafgaand aan de revisie van het prothesegewricht. Preoperatief gebruik van antibiotica kan een negatieve invloed hebben op de sensitiviteit van conventionele cultuur (18). Weinig studies spitsen zich echter toe op de concrete invloed van preoperatief antibioticagebruik op de performantie karakteristieken van conventionele cultuur in vergelijking met 16S rRNA gen PCR.

In tegenstelling tot bovenstaande gerapporteerde gegevens, beschrijven volgende studies een lagere sensitiviteit ten opzichte van conventionele cultuur. Fihman et al (2005) evalueerde het gebruik van 16S rRNA gen PCR in 76 stalen afkomstig van 51 patiënten met het vermoeden van orthopedische infecties (PJI n=15, spondylodiscitis n=7, acute septische artritis n=11, controlegroep n=18). Microbiologische cultuur werd uitgevoerd op 43 synoviale vochten, 10 CT-begeleide discovertebrale bipten en 23 weefselstalen. Het residueel materiaal werd bewaard bij -80°C voor moleculaire analyse. In deze retrospectieve studie werd een algemene sensitiviteit van 73,3% gerapporteerd. Voor de PJI-subgroep was de sensitiviteit slechts 53,8%. Een aantal kanttekeningen moeten bij deze studie worden gemaakt. Omwille van de retrospectieve aard van deze studie, werden een hoog aantal positieve culturen geïncludeerd. Dit gegeven kan een invloed hebben op de gemeten

sensitiviteit van PCR. Daarnaast werd in deze studie geen voorbehandelingsstap met een lysisbuffer of proteïnase ingebouwd. Dit kan bijgevolg een invloed hebben op de kwaliteit van het DNA-extract en zo ook op de gemeten sensitiviteit (25). Fenollar et al (2006) analyseerde prospectief 525 stalen (255 naaldaspiraten, 270 weefselstalen) om de bruikbaarheid van 16S rRNA gen PCR amplificatie en sequentie-analyse aan te tonen in de diagnose van bot- en gewrichtsinfecties. In deze studie werden 108 patiënten met een heupprothese en 47 patiënten met een knieprothese geïncludeerd. In 475 stalen waren cultuur en PCR concordant. Negen stalen bleven vals negatief met PCR. In drie stalen kon de aanwezigheid van PCR-inhibitoren worden aangetoond, aangezien het humaan beta-globin niet geamplificeerd werd. In vier andere stalen kon de aanwezigheid van een micro-organisme wel worden aangetoond indien het *rpoB* gen als target werd gebruikt. Deze studie concludeerde dat 16S rRNA gen PCR gevolgd door sequentie-analyse een aantal voordelen biedt wanneer het complementair gebruikt wordt aan cultuurresultaten. De auteurs van deze studie raden het gebruik van 16S rRNA gen PCR enkel aan in cultuur-negatieve casussen waarbij er een sterk vermoeden van infectie is op basis van klinische tekens en symptomen (27). In een kleine retrospectieve studie van De Man et al (2009) werd het gebruik van breedspectrum PCR geëvalueerd in de diagnose van PJI. De studie includeerde 26 patiënten, waarbij 29 episoden van mogelijke PJI werden onderzocht. De vooropgestelde criteria om PJI te diagnosticeren werden voldaan in 12 episoden. In deze studie werd PCR en cultuur uitgevoerd op synoviale vochten en weefselstalen. Het aantal geanalyseerde stalen verschilde echter per episode en per techniek (PCR/Cultuur). De sensitiviteit van PCR en cultuur bedroeg respectievelijk 50% en 58%. Aangezien er geen strikte pre-gedefinieerde criteria werden gehanteerd om PCR bij patiënten uit te voeren, kan deze studie beïnvloed zijn door een selectie bias (26). Zoals eerder werd vermeld (*Cfr. supra*), rapporteerde ook de studie van Marin et al (2011) een lagere sensitiviteit voor PCR ten opzichte van cultuur. De specificiteit van de PCR-analyse was echter hoger. In deze studie werden 176 intra-operatieve stalen afkomstig van 40 patiënten met PJI en 321 stalen afkomstig van 82 niet-geïnfecteerde patiënten bestudeerd. De intra-operatieve stalen bestonden enerzijds uit weefselbiopten, anderzijds uit synoviale vochten(28). Daarnaast onderzocht ook Bjerkan et al (2012) het gebruik van 16S rRNA gen real-time PCR in 54 patiënten die een revisie van het prothesegewricht ondergingen. In deze studie werd cultuur uitgevoerd op synoviaal vocht en weefselstalen (n=5/patiënt). PCR-analyse werd uitgevoerd op dezelfde weefselstalen en op gesoniceerde vloeistof afkomstig van het prothesegewricht. De



weefselstalen werden hierbij aseptisch in twee verdeeld om beide analyses op hetzelfde biopt te kunnen uitvoeren. De verlaagde sensitiviteit van PCR kan volgens deze studiegroep onder andere worden toegeschreven aan het gebruik van een kleiner staalvolume in de PCR-analyse ten opzichte van cultuur. Ook interferentie met humaan DNA, aanwezig in het weefselstaal, kan verantwoordelijk zijn voor deze verlaagde sensitiviteit (30). Ten slotte vermelden we nog de studie van Rak et al (2013), waarin de diagnostische accuraatheid van breedspectrum PCR en de cultuurtechniek werden geëvalueerd. De studie includeerde 50 patiënten met een heup- en 17 patiënten met een knieprothese. Met beide methoden werden in deze studie aliquots van intra-operatieve weefselstalen (n=6/patiënt) die door middel van een homogenisator vooraf werden gehomogeniseerd, geanalyseerd. Een lagere sensitiviteit voor PCR (75%) ten opzichte van cultuur (81,3%) werd gerapporteerd. Desondanks werd geen significant verschil tussen beide methodes beschreven (41).

Met betrekking tot sonicatie van prothesemateriaal kan de studie van Gomez et al (2012) worden vermeld. Deze studie bestudeerde het gebruik van 16S rRNA gen PCR in de analyse van een biofilm, die losgemaakt werd van de prothese door middel van vortexen en sonicatie. Gesoniceerde vloeistoffen afkomstig van prothesen met PJI (n=135) en aseptisch falen (n=231) werden bestudeerd. De sensitiviteit van gesoniceerde vloeistof PCR (70,4%) was gelijkaardig aan de sensitiviteit van cultuur van respectievelijk synoviaal vocht, weefselbiopt en gesoniceerde vloeistof (64,7%, 70,4% en 72,6%). Analoog was de specificiteit van PCR (97,8%) gelijkaardig aan deze van de cultuurmethoden. Combinatie van cultuur en PCR op gesoniceerde vloeistof leidde tot een hogere sensitiviteit (78,5%) ten opzichte van de sensitiviteit van elk van deze methoden afzonderlijk (29). Gomez et al kon geen meerwaarde van PCR op sonicatievloeistof aantonen. Een beperking van deze studie kan worden teruggevonden in de analysestrategie. PCR werd niet uitgevoerd op weefselstalen en synoviaal vocht, waardoor beide methoden niet met elkaar kunnen worden vergeleken.

Ook de studiegroep van Cazanave et al. (2013) voerde een PCR-analyse uit op gesoniceerde vloeistof afkomstig van heup (n=162) - en knieprothesen (n=272). Deze studie evalueerde het gebruik van een real-time multiplex PCR assay in een gesloten systeem. PCR had een sensitiviteit van 77,1% en een specificiteit van 97,9%. Cultuur van weefselstalen en gesoniceerde vloeistof vertoonde respectievelijk een sensitiviteit van 70,1% en 72,9% en een specificiteit van 97,9% en 98,3% (31). Deze studie maakt gebruik van een panel van primers met als target bacteriën die frequent geassocieerd worden met PJI. In deze literatuurstudie wensen we echter de diagnostische performantie van 16S rRNA gen PCR te onderzoeken.

In een meta-analyse (Qu X., Zhai Z., 2013) werd het gebruik van PCR assays voor de diagnose van PJI geëvalueerd. 14 studies werden in deze meta-analyse geïnccludeerd, waarbij 11 studies het 16S rRNA gen als target in de PCR-analyse gebruikten. De gepoolde sensitiviteit en specificiteit was respectievelijk 86% (95% CI: 77-92%) en 91% (95% CI: 81-96%) (35).

In een recente prospectieve multicenter studie, uitgevoerd door de studiegroep van Bémer et al (2014), vertoonde de 16S rRNA gen PCR analyse een gebrek aan sensitiviteit voor de diagnose van PJI. In deze studie werden 264 patiënten met een vermoeden van PJI geïnccludeerd. Daarnaast werden ook 35 controlepatiënten bestudeerd. In deze studie werden vijf perioperatieve weefselstalen per patiënt geïnccludeerd voor cultuur en 16S rRNA gen PCR analyse. Deze weefselstalen werden vooraf gehomogeniseerd door middel van een bead mill-procedure (22). PJI werd geïnccludeerd in 215 van de 264 vermoedelijke PJI-casussen, waarvan 192 casussen bacteriologisch werden gedocumenteerd. De 16S rRNA gen PCR-analyse was positief in 151 van de 215 geïnccludeerde PJI-casussen en in 2 van de 49 casussen waar PJI niet kon worden bevestigd (sensitiviteit, 73,3%; specificiteit, 95,5%). Dezelfde studiegroep zette voorafgaand een extern kwaliteitscontrole programma op. Met dit programma werd de performantie van de 16S rRNA gen real-time PCR analyse in de diagnose van gewrichts- en botinfecties in de verschillende deelnemende laboratoria geëvalueerd (21). Dit kwaliteitsprogramma toonde aan dat reproduceerbare resultaten kunnen worden verkregen in verschillende laboratoria die gebruik maken van een verschillende uitrusting (21). In deze multicenter studie kon omwille van een gebrek aan sensitiviteit een systematisch gebruik van 16S rRNA gen PCR niet aanbevolen worden in de diagnose van gewrichts- en botinfecties (22). Deze waardevolle studie is de enige die een groot aantal orthopedisch geïnccludeerde patiënten includeert en het gebruik van 16S rRNA gen PCR evalueert in verschillende centra. Bovendien werden gehomogeniseerde stalen parallel bestudeerd met cultuur en PCR.

Bovenstaande literatuurgegevens geven aan dat het zeer moeilijk is om conclusies te trekken over de performantiekarakteristieken van 16S rRNA gen PCR analyse in de diagnose van PJI. De oorzaak hiervan kan worden toegeschreven aan volgende factoren. Als eerste kritisch punt kan worden aangehaald dat de protocollen die worden gebruikt om het bacterieel DNA te detecteren van elkaar verschillen in de verschillende studies. Bovendien verschilt ook de uitvoering van conventionele cultuur van studie tot studie. De meeste studiegroepen maken gebruik van in house protocollen. Uitgebreide evaluaties van commerciële kits

ontbreken in de literatuur. Daarnaast hanteren verschillende studies verschillende criteria om PJI te definiëren. In het bijzonder maken de studies gebruik van andere cutoff-waarden voor de interpretatie van positieve resultaten. Tot slot variëren het aantal bestudeerde subjecten en het staaltje in de verschillende beschreven studies.

De auteurs van bovenstaande studies raden een systematisch gebruik van 16S rRNA gen PCR analyse in de diagnose van PJI af. Deze moleculaire techniek heeft als groot nadeel, dat een gevoeligheidsbepaling van de oorzakelijke kiem niet kan worden uitgevoerd. Deze techniek kan echter wel nuttig zijn, indien de cultuurresultaten negatief blijven in patiënten met een sterk vermoeden van PJI die al dan niet reeds antibiotica krijgen toegediend (9).

#### 1.4 Heeft 16S rRNA gen PCR en sequentie-analyse een snellere antwoordtijd dan conventionele cultuur?

Het finale microbiologisch rapport van cultuur in de diagnose van PJI is meestal slechts beschikbaar na zeven tot 14 dagen. Moleculaire methoden hebben als voordeel dat zij een finaal resultaat kunnen brengen, binnen een termijn van maximum twee dagen. Een negatief 16S rRNA gen PCR-resultaat kan mogelijks op dezelfde dag reeds worden gerapporteerd. Bij het uitvoeren van een sequentie-analyse wordt de turn around time verlengd (22). Alhoewel PCR een kortere antwoordtijd kan hebben ten opzichte van cultuur, zal in de praktijk PCR enkel worden uitgevoerd indien de cultuur negatief blijft. Bijgevolg zal het PCR-resultaat pas later beschikbaar zijn.

#### 1.5 Wat is de financiële impact bij het gebruik van 16S rRNA PCR in de diagnose van PJI?

In dit onderdeel wordt de kost berekend wanneer de moleculaire diagnostiek wordt aangewend in de microbiologische diagnose van PJI. Een kostenraming zal worden gemaakt voor conventionele cultuur enerzijds en voor moleculaire diagnostiek anderzijds. Enkel een financiële berekening van de “detectie” en “identificatie” van micro-organismen zal worden gemaakt. Hierbij wordt uitvoering van een gevoeligheidsbepaling buiten beschouwing gelaten, aangezien dit niet kan uitgevoerd worden met moleculaire diagnostiek. Belangrijk om op te merken is dat de rol van de moleculaire diagnostiek niet gelegen is in een “routinetoepassing”, maar dat deze techniek eerder een plaats heeft als “salvage” diagnostische toepassing, wanneer culturen van intra-operatieve stalen negatief blijven.

In de periode van maart 2014 tot maart 2015 werden in het laboratorium microbiologie van het AZ Groeninge te Kortrijk in totaal 100 stalen afkomstig van 16 patiënten met een vermoeden van PJI in ontvangst genomen. Deze stalen omvatten zowel punctievochten,

biopten, synoviale vochten als wondvochten en etters (e-swabs). In attachement I werden de reagens- en personeelskosten geraamd voor conventionele cultuur. Kosten gerelateerd aan toestellen (aankoop + onderhoudscontract + bijhorende reagentia), (o.a. Vitek MS, WASP) werden niet meegenomen in deze kostenraming, daar deze voor elk labo verschillend zijn. Aangezien stalen voor de diagnose van PJI standaard langer geïncubeerd worden (minimum zeven dagen), wordt de hands on time langer ingeschat ten opzichte van gewone culturen. Stalen worden immers ingezet op dag 0, afgelezen op dag 1, 2 en op dag 7. Ook tussendoor worden de stalen gecontroleerd op bacteriële groei. In 2013 bedroeg de gemiddelde personeelskost in het labo €38,82/u. De terugbetaling van het RIZIV werd weergegeven met de volledige B-waarde, in plaats van het forfaitair honorarium en de 25% van de B-waarde. Dit werd gedaan om een eenvoudige schets van de kosten mogelijk te maken. Een conventionele aerobe cultuur kost gemiddeld € 9,74 voor diepe stalen. Cultuur van oppervlakkige wissers en wondvochten kost gemiddeld €9,53. Nogmaals moet men er op attent gemaakt worden, dat verschillende kosten hierbij buiten beschouwing worden gelaten.

In het laboratorium van moleculaire biologie in het AZ Groeninge zou een 16S rRNA gen PCR en sequentie-analyse worden aangeboden indien PJI culturen negatief blijven en er sterke vermoedens voor infectie aanwezig zijn. Er werd gekozen voor de Universal Microbe Detection™-kit van Molzym (Duitsland). In een recente studie van Grif K. et al (2012) werd deze commercieel beschikbare test geëvalueerd voor de detectie en identificatie van bacteriën in de diagnose van bot en gewrichtsinfecties (20). 83 orthopedische stalen werden in deze studie geëvalueerd. Deze kit bereikte respectievelijk een sensitiviteit en specificiteit van 88,5% en 83,5% ten opzichte van cultuur. De Universal Microbe Detection™-kit kost in aankoopprijs 1512 euro voor 24 reacties (€ 63/reactie). De reagentia en buffers zijn verdeeld over verschillende recipiënten die afgestemd zijn op vier extracties per run. Naast het staal, moeten in elke run ook positieve en negatieve controles worden meegenomen, om de betrouwbaarheid van het analyseresultaat te kunnen verzekeren. Bijgevolg zal voor de uitvoering van één PCR-analyse van één staal, meerdere testreacties worden opgebruikt. Naast deze kit, moet ook de QIAquick® PCR Purification kit (Qiagen) worden aangekocht om het PCR-product verder op te zuiveren voor sequentie-analyse. Deze kit heeft een kostprijs van €131,89/ 50 testen (€2,64/ test). Voor de sequentie-analyse wordt de BigDye Terminator kit met een kostprijs van €1301,96/ 100 testen (€1,3/test) aangekocht. Kosten gerelateerd aan de gebruikte toestellen en infrastructuur worden ook hier buiten

beschouwing gelaten. Daarnaast heeft de uitvoering van de DNA-extractie ( $\pm 3u$ ), purificatie ( $\pm 1u$ ) en de uiteindelijke interpretatie ( $\pm 30$  minuten) een langere hands on time ten opzichte van cultuur. De personeelskost wordt hierbij geraamd op €174,69 per ingezette run. Zonder de volledige rekensom te maken, kan duidelijk worden weergegeven dat de kost verbonden aan moleculaire diagnostiek veel hoger is ten opzichte van conventionele cultuur. Bovendien is er geen RIZIV-terugbetaling voor dit soort van testen. Kosten/effectiviteitsstudies omtrent de moleculaire diagnostiek in PJI zijn nog niet in de literatuur verschenen.

## **Besluit**

In deze kritische testevaluatie werden de literatuurgegevens omtrent de moleculaire diagnostiek van PJI met behulp van breed spectrum 16S rRNA gen PCR diepgaand bestudeerd. Uiteenlopende waarden worden vastgesteld omtrent de klinische sensitiviteit en specificiteit van 16S rRNA gen PCR analyse. Een grote beperking van deze techniek is het ontbreken van teststandaardisatie. Vele studies benadrukken het potentiële nut van PCR in de diagnose van PJI, maar suggereren een restrictief gebruik van deze diagnostische test. Dit omwille van de hoge kostprijs en de in deze CAT aangehaalde beperkingen. Het gebruik wordt aanbevolen bij patiënten bij wie een sterk vermoeden van PJI aanwezig is, bij wie de intra-operatieve culturen negatief blijven en in het bijzonder bij patiënten onder (recente) antibioticatherapie.

## **TO DO/ACTIONS**

---

- 1) Opvolging van het gebruik van de Universal Microbe Detection™-kit bij vermoeden van infectie in cultuur negatieve patiënten.
- 2) Opvolging van het gebruik van de Universal Microbe Detection™-kit bij de diagnose van PJI in cultuur negatieve patiënten.
- 3) Opvolging van de literatuur omtrent het gebruik van breed spectrum PCR in de diagnose van PJI.

## ATTACHMENT I

Diagnostische procedure	Aantal/ jaar	Prijs/ staal (€)	Totale prijs (€)	Werkuren /staal (min)	Personeelskosten (€) /staal (min)	Personeelskosten (€) /jaar	Partiële kost /staal* (€)	RIZIV-Terugbetaling (€)
Conventionele <b>aerobe</b> cultuur biopt/punctievocht bij vermoeden PJI	38	1,33	50,54	13	8,41	319,62	9,74	13,05
Conventionele <b>aerobe</b> cultuur synoviaal vocht bij vermoeden PJI	20	1,33	26,6	13	8,41	168,22	9,74	13,05
Conventionele <b>aerobe</b> cultuur wondvocht /etter bij vermoeden PJI	41	1,12	45,92	13	8,41	344,85	9,53	13,05
Microscopisch onderzoek bij vermoeden PJI	100	/	/	5	3,24	323,50	3,24	2,94
Conventionele <b>anaerobe</b> cultuur biopt/ punctievocht bij vermoeden PJI	37	1,29	47,73	6	3,88	143,63	5,17	9,78
Conventionele <b>anaerobe</b> cultuur synoviaal vocht bij vermoeden PJI	18	1,29	23,22	6	3,88	69,88	5,17	9,78
Conventionele <b>anaerobe</b> cultuur wondvocht /etter bij vermoeden PJI	30	1,29	38,7	6	3,88	116,46	5,17	9,78
Identificatie van strikt anaerobe kiemen uit biopt/ punctievocht bij vermoeden PJI	5	/	/	3,5	2,26	11,32	2,26	19,57
Identificatie van strikt anaerobe kiemen uit Gewrichtsvocht bij vermoeden PJI	1	/	/	3,5	2,26	2,26	2,26	19,57
Identificatie van gisten bij vermoeden PJI	1	/	/	3	1,94	1,94	1,94	8,15
Kweek van gisten bij vermoeden PJI	27	1,93	52,11	2,5	1,62	43,67	3,55	€ 4,89

\*Partiële kost/staal = kosten afkomstig van reagentia + personeelskosten

## ATTACHMENT II

Studie	Aantal patiënten	Studiedesign	Staaltype	Plaats staalafname	Staalconditie	Definitie prothese-infectie	Target gene
Grif K. et al. 2012 (20)	84	PROSPECTIEF	n = 83 Orthopedische stalen (SF n=57; TS n=36); n = 21 stalen afkomstig uit steriel compartimenten (CSV, hartkleppen, peritoneaal vocht, lymfeknopen, hersenen, lever)	NA	FRESH	NA	16 S rRNA gen
Plouzeau C. et al 2014 (21)	168 verzonden QC's (8 QC's, 3x verzonden naar 7 laboratoria)	PROSPECTIEF QC Multicenter studie	4 bacteriële DNA-extracten + 4 bead mill-suspensies	Osteoarticulair	Frozen	NA	16 S rRNA gen
Bémer P. et al. 2014 (22)	299 (264 vermoeden PJI + 35 controle-patiënten)	PROSPECTIEF multicenter studie	5 perioperatieve TS per patiënt (gehomogeniseerd d.m.v. bead-mill procedure, aliquot voor PCR en cultuur)	Heup, knie, schouder, elleboog	FRESH	C, M, H, IOF	16S rRNA gen
Vandercam et al. 2008 (23)	41 vermoeden PJI, 28 controle patiënten	PROSPECTIEF	TS, swabs, SF	heup, knie	FRESH	C,M, IOF,H, R	Duplex specifieke amplificatie 16S rRNA gene PCR voor GR+ en GR-bacteriën, Bij GR+ signaal: Fem A gene; Mec A gene
Panousis K. et al. 2005 (24)	91	PROSPECTIEF	Intra-operatief SF voor PCR en cultuur, ten minste 3 intra-operatieve TS/patiënt voor cultuur en histologie	Knie, heup	FRESH	C, R, IOF, M	16S rRNA gen
Fihman V. et	51 (waarvan 18	RETROSPECTIEF	76 klinische gewrichts- en botstalen,	Niet gespecificeerd	FROZEN geen	C,R,H,M	16S rRNA gen

al. (2007) (25)	controlegroep)		voor microbiologische cultuur, residueel materiaal werd bewaard bij -80°C voor moleculaire analyse. 43 SF, 10 CT-begeleide discovertebrale biopten, 23 TS		voorbehandelings tap met proteinase K voor het vrijzetten bacteriën voor extractie..		
De Man F.H.R. et al. 2009 (26)	26	RETROSPECTIEF	SF, periprothetisch TS	Knie, heup	NA	C, IOF, H	16S rRNA gen
Fenollar F. et al. 2006 (27)	525	PROSPECTIEF	525 stalen: 255 naaldspiraten, 270 TS	196 heupen waarvan (108 met heupprothese), 176 knieën (waarvan 47 knieprotheses), 44 femurs, 36 tibias, 18 vertebrale kolom, 14 ellebogen, 7 schouders, 6 enkels, 5 humeri, 4 calcanei, 3 sleutelbenen, 3 voeten, 2 fibulas, 2 radii, 1 maxilla en 1 mandibula	FRESH	NA	16S rRNA gen
Marin M. et al. 2011 (28)	122 (40 PJI patiënten, 82 niet-geïnfecteerde patiënten)	PROSPECTIEF	176 stalen van patiënten met PJI (149 TS + 27 SF) en 321 van niet-geïnfecteerde patiënten (292 TS + 29 SF)	knie, heup, elleboog, schouder	FRESH	IOF, H	16S rRNA gen
Gomez E. et al. 2012 (29)	366 (135 PJI, 231 Aseptisch falen)	PROSPECTIEF	Cultuur: TS (min. 2/patiënt), SF, Sonicated PF PCR op Sonicated PF	Knie (n= 236), heup (n= 130)	FROZEN	IOF, H	16S rRNA gen
Bjerkan G. et al. 2011 (30)	54	PROSPECTIEF	SF (n = 1/patiënt) (cultuur), TS (n=5) afkomstig van het gewrichtskapsel en de interface membraan (cultuur + PCR), Sonicated PF (cultuur + PCR)	Knie (n= 7), heup (n=47)	FRESH	C, R, IOF, M, H	16S rRNA gen
Cazanave C. et al. 2013 (31)	434 (290 aseptisch falen + 144 PJI)	PROSPECTIEF	Cultuur op intra-operatieve TS + sonicated PF, SF. PCR op SF.	Knie (n=272), heup (n=162)	FRESH	H, IOF	Multiple targets



Suda A. et al. 2013 (32)	157 (37 patiënten met evidentie voor bacteriële infectie)	PROSPECTIEF	Cultuur: TS, geaspireerde punctievloeistof PCR: Biofilm afgeschraapt van het prothese-oppervlak met een chirurgisch mes	Heup (n= 91), Knie (n=49), schouder (n=9), enkelgewricht (n= 2), duim (n=2), vinger (n=2), elleboog (n=1), Unicondylar knee replacement (n=1)	FRESH	C, labo, IOF	16S rRNA gen
Ryu S. et al. 2014 (33)	95 (64 PJI, 31 aseptisch falen)	PROSPECTIEF	TS (min. 2 stalen voor cultuur, 1 staal voor histopathologie en 1 staal voor PCR), SF (n=89), Sonicated PF (cultuur n= 58, PCR n=36)	Knie	FROZEN	H, IOF, M	Multiple targets
Levy P.-Y. et al. 2013 (40)	2308 ( 1154 PJI)	PROSPECTIEF	3840 bot- en gewrichtsstalen (naaldaspiraten en TS)	Knie, heup, schouders	NA	C, IOF	16S rRNA gen
Rak M. Et al. 2013 (41)	67 + 7 controle patiënten	PROSPECTIEF	Intra-operatieve TS (n=6/patiënt). Aliquot van gehomogeniseerde intra-operatieve TS voor PCR.	heup (n= 50), knie (n= 17)	NA	IOF, H, M	16S rRNA gen

Afkortingen: SF, synoviaal vocht; Sonicated PF, gesoniceerde prothese vloeistof; TS, weefselstaal; C, klinische bevindingen; H, histologie; IOF, intra-operatieve bevindingen; M, microbiologie of laboratoriumonderzoek; R, radiologisch onderzoek; NA, not available