

MICROBIOLOGISCHE DIAGNOSTIEK VAN SYNOVIALE INFECTIES BIJ HET PAARD

F. Pille, A. Martens, F. Gasthuys, C. De Baere

Vakgroep Heelkunde en Anesthesie van de Huisdieren, UG,
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke
frederik.pille@UGent.be

SAMENVATTING

De diagnose van een synoviale infectie kan slechts met zekerheid bevestigd worden wanneer de aanwezigheid van (levende) bacteriën wordt aangetoond in het synoviaal vocht. Bacteriologisch onderzoek van synoviaal vocht geeft echter vaak vals-negatieve resultaten door de aanwezigheid van groei-inhiberende stoffen die daarom niet noodzakelijk antibiotica hoeven te zijn. De cultuurresultaten kunnen in belangrijke mate worden verbeterd door het synoviaal vocht te incuberen in speciale vloeibare media die ook gebruikt worden voor het maken van bloedculturen. Dankzij vernieuwende moleculaire technieken kan bacterieel DNA rechtstreeks worden opgespoord in synoviaal vocht. Meestal wordt gebruik gemaakt van de polymerase kettingreactie (PCR) met primers specifiek voor de typisch prokaryotische sequentie van het 16S ribosomaal RNA-gen. Talrijke klinische studies evalueerden het gebruik van deze techniek bij de diagnostiek van artritis bij de mens. Bij het paard is tot nu toe slechts een enkele in vitro studie beschikbaar. Mits verder onderzoek naar de sensitiviteit en specificiteit zal 16S PCR naar alle waarschijnlijkheid in de toekomst zijn belang hebben bij het routinematig detecteren van bacteriën in synoviaal vocht. Potentiële toepassingen voor reverse (reversibele ?) transcriptase-PCR en in situ hybridisatie worden summier besproken.

INLEIDING

De diagnose van synoviale infecties bij het paard is gebaseerd op zowel de klinische symptomen als op de analyse van synoviaal vocht. Routinematig worden hierbij het totaal aantal witte bloedcellen, het percentage neutrofielen en mononucleairen en het totaal eiwitgehalte bepaald. De invloed van een infectie op de evolutie van deze parameters werd onder andere beschreven door Tulamo *et al.* (1989) na experimentele inoculatie van gewrichten met *Staphylococcus aureus*. Echter, bij de klinische patiënt is een toename in het synoviaal vocht van het aantal ontstekingscellen en -eiwitten op zich weinig specifiek omdat deze geen informatie verschaft over de oorzaak van de ontsteking. Bovendien kan de evolutie van deze parameters door talrijke factoren worden beïnvloed zodat uiteindelijk enkel het aantonen van de aanwezigheid van bacteriën de diagnose van infectieuze artritis of tenosynovitis kan bevestigen. Schneider *et al.* (1992) en Madison *et al.* (1991) vermelden echter in respectievelijk 26% en 48% van de gevallen negatieve resultaten bij het in cultuur brengen van synoviaal vocht dat als geïnfecteerd wordt

beschouwd. Zelfs na experimentele inoculatie van gewrichten met een gekende hoeveelheid *Staphylococcus aureus* kon slechts in 79% van de gevallen de bacterie uit het gewrichtsvocht worden geïsoleerd op agarbodem (Tulamo *et al.*, 1989), hoewel alle dieren vrij waren van antibiotica.

In de hoop het probleem van vals-negatieve culturen te kunnen omzeilen, werden in de humane geneeskunde vernieuwende moleculaire technieken ontwikkeld voor de detectie van bacteriële nucleïnezuren in synoviaal vocht (Hoeffel *et al.*, 1999). Het best gekend is de polymerase kettingreactie (PCR) waarbij men in het synoviaal vocht typisch bacteriële 16S rRNA-gensequenties opspoorde (Louie en Liebling, 1998). De techniek werd in verscheidene klinische studies bij de mens geëvalueerd (Levine *et al.*, 1995; Mariani *et al.*, 1996; Canvin *et al.*, 1997; Mariani en Tuan, 1998; Van Der Heijden *et al.*, 1999). Bij het paard beschrijft slechts één enkele in vitro studie het gebruik van 16S PCR voor de detectie van bacterieel DNA in gewrichtsvocht (Crabill *et al.*, 1996).

In dit artikel wordt een overzicht gegeven van de verschillende methoden waarmee micro-organismen kunnen worden opgespoord in synoviaal vocht. De voor- en nadelen van de verschillende technieken worden vergeleken en de sensitiviteit en specificiteit van hun respectievelijke resultaten worden besproken. In dit overzicht wordt het gebruik van moleculaire technieken bij de diagnostiek van artritis bij de mens besproken met het oog op de publicatie van parallelle studies bij het paard.

BACTERIOLOGIE

Biopten of synoviaal vocht?

Bacteriologisch onderzoek bij infectieuze synovitis richt zich in eerste instantie op het opsporen van bacteriën in het synoviaal vocht. Gedurende lange tijd was men er echter van overtuigd dat bacteriën gemakkelijker konden worden geïsoleerd uit een synoviaal biopt. Deze gedachte was gebaseerd op de hypothese dat bacteriën zich bij infectieuze synovitis vooral zouden bevinden ter hoogte van de synoviale villi. Bertone *et al.* (1987) vergeleken de sensitiviteit van beide methoden bij het paard. Na inoculatie van het spronggewricht met *Staphylococcus aureus* gevolgd door een experimentele behandeling kon aan het einde van de studie zowel uit synoviaal vocht als uit synoviale biopten in 60 % van de gevallen *S. aureus* worden geïsoleerd. Wanneer de resultaten van de twee technieken werden gecombineerd dan kon in 70 % van de gevallen de aanwezigheid van *S. aureus* worden aangetoond. Uit de studie van Madison *et al.* (1991) blijkt dat bij klinische gevallen de sensitiviteit van een bacteriologisch onderzoek van een synoviaal biopt over het algemeen zelfs lager ligt dan deze van synoviaal vocht (respectievelijk 36 % en 52 %). Slechts bij 1 van de 17 cultuurpositieve patiënten (6%) waarbij simultaan een bacteriologisch onderzoek van synoviaal vocht en synoviaal biopt werden uitgevoerd, bleek enkel het synoviaal biopt bacteriologisch positief te zijn terwijl de cultuur van het synoviaal vocht negatief bleef. Omdat het uitvoeren van een biopsie relatief invasief is, lijkt het routinematig uitvoeren van bacteriologisch onderzoek op synoviale biopten niet aangewezen (Madison *et al.*, 1991).

Rechtstreeks microscopisch onderzoek

Direct lichtmicroscopisch visualiseren van bacteriën op een uitstrijkje van synoviaal vocht maakt deel

uit van een volledig bacteriologisch onderzoek. Wanneer bacteriën worden teruggevonden bij rechtstreeks microscopisch onderzoek gaat het echter niet noodzakelijk om levende pathogenen die metabool actief zijn. Madison *et al.* (1991) toonden aan dat lichtmicroscopische visualisatie van bacteriën in 77 % van de gevallen positief gecorreleerd was met het resultaat van bacteriologische cultuur. De sensitiviteit van rechtstreekse visualisatie van bacteriën is echter laag (58 %) en maakt de techniek dan ook weinig geschikt als diagnostische test (Madison *et al.*, 1991). Na experimentele inoculatie van het spronggewricht bij het paard met *S. aureus* bleek dat slechts op 40 % van de uitstrijkjes van synoviaal vocht bacteriën direct lichtmicroscopisch konden worden gevisualiseerd (Tulamo *et al.*, 1989).

Vals-positieve culturen

Een positieve cultuur van synoviaal vocht bevestigt uiteindelijk in de meeste gevallen het vermoeden van een synoviale infectie en maakt het bovendien mogelijk om een antibiogram aan te leggen. Vals-positieve resultaten komen echter voor. Meestal zijn zij het resultaat van contaminatie tijdens de staalname of tijdens het overbrengen van het staal in een cultuurmedium. Vooral wanneer voorafgaandelijk wordt aangerijkt op vloeibare media is het vaak moeilijk een onderscheid te maken tussen de groei van een contaminant en de eventuele groei van het etiologisch micro-organisme (von Essen, 1997). In de experimentele studie van Bertone *et al.* (1987) wordt een verrassend hoog aantal (25 %) vals-positieve culturen gerapporteerd na incubatie van niet-geïnfecteerd synoviaal vocht in vloeibare media. In recentere studies echter wordt de mogelijke impact van contaminatie bij de incubatie van synoviaal vocht in speciale vloeibare media als relatief weinig belangrijk afgedaan (Yagupsky en Press, 1997; von Essen, 1997). In het onderzoek van Hughes *et al.* (2001) was het aantal contaminanten na inoculatie van synoviaal vocht op plaat zelfs veel hoger dan wanneer werd geïncubeerd in een bloedcultuurmedium.

Vals-negatieve culturen

Vals-negatieve resultaten bij het in cultuur brengen van synoviaal vocht komen echter veel vaker voor. De wijze van transport van het synoviaal vocht naar het labo blijkt in elk geval van ondergeschikt belang te zijn. Onder klinische omstandigheden werd het verschil in het aantal positieve culturen tussen stalen

getransporteerd hetzij in steriele buizen, hetzij in een transportmedium, hetzij in anticoagulans sodium poly-anethosulfonaat (SPS), als statistisch niet-significant beschouwd (Madison *et al.*, 1991). Bij de reeds vermelde experimentele inoculatie van het spronggewricht bij het paard met *Staphylococcus aureus*, waarbij de cultuur op plaat in 21 % van de gevallen negatief was, bleken na aanrijking in een vloeibaar medium op één na alle monsters positief. De incubatie van synoviaal vocht in een vloeibaar medium met het oog op het beperken van het aantal vals-negatieve culturen werd bij herhaling positief geëvalueerd (von Essen en Hölttä, 1986; Montgomery *et al.*, 1989; von Essen, 1997; Hughes *et al.*, 2001). Na experimentele inoculatie van gewrichten bij de hond met *Staphylococcus intermedius* kon het micro-organisme in meer dan de helft van de gevallen pas na aanrijking in een bloedcultuurmedium worden geïsoleerd (Montgomery *et al.*, 1989). Ook in de humane geneeskunde werd het gebruik van een bloedcultuurmedium voor het isoleren van bacteriën uit geïnfecteerd synoviaal vocht meerdere malen bestudeerd (von Essen en Hölttä, 1986; von Essen, 1997; Hughes *et al.*, 2001). Bij mensen met infectieuze artritis blijkt dat bij de helft van de patiënten die behandeld werden met antibiotica en bij een derde van de patiënten die nog niet werden behandeld, het gebruik van een bloedcultuurmedium essentieel is om micro-organismen te isoleren (von Essen, 1997). Het gebruik van een bloedcultuurmedium heeft als voordeel dat wanneer er weinig bacteriën aanwezig zijn, hiervoor gecompenseerd kan worden door inoculatie van een groot volume synoviaal vocht. Dat er in geïnfecteerd synoviaal vocht meestal weinig bacteriën aanwezig zijn, wordt geïllustreerd door het feit dat bij het uitenten op plaat vaak enkel een groei wordt geobserveerd op de plaats waar origineel een druppel synoviaal vocht werd aangebracht (von Essen en Hölttä, 1986). Soms wordt echter het tegenovergestelde waargenomen; er vormen zich kleine kolonies aan de rand van het primaire inoculum of althans enkel op de plaats waar dit reeds voldoende werd uitgedund. Dit laatste verschijnsel is suggestief voor de aanwezigheid van groei-inhiberende stoffen in synoviaal vocht die daarom niet noodzakelijk antibiotica hoeven te zijn. Bij gebruik van een bloedcultuurmedium wordt het inoculum verdund in een groot volume medium dat bovendien meestal een specifieke resine bevat dat groei-inhibitoren bindt. Hierdoor wordt het effect van eventueel in synoviaal vocht aanwezige exogene (antibiotica) en endogene kiemgroeiremmende stoffen grotendeels geneutraliseerd (von Essen en Hölttä,

1986). Yagupsky en Press (1997) veronderstelden dat actieve fagocytose van bacteriën door witte bloedcellen mee verantwoordelijk is voor het belangrijk aantal vals-negatieve resultaten bij het in cultuur brengen van synoviaal vocht op plaat. Daarom evalueerden deze onderzoekers het effect van het voorafgaandelijk incuberen van geïnfecteerd synoviaal vocht in een commercieel medium dat in hoofdzaak cellyserende agentia bevat (Isolator 1.5 microbial tube, Wampole Laboratories, Cranbury, N.J.). Naast het verhogen van de sensitiviteit met ongeveer 29 % ten opzichte van de conventionele cultuur, resulteerde de voorafgaande lyse in een significant groter aantal kolonies bij het uitenten op plaat. Dit laatste bevestigt mogelijk dat er bij incubatie van synoviaal vocht in aanwezigheid van cellyserende agentia effectief gefagocyteerde micro-organismen worden vrijgesteld uit de witte bloedcellen. Deze bacteriën blijken bovendien nog voldoende levensvatbaar te zijn om opnieuw te vermenigvuldigen (Yagupski en Press, 1997). De meeste courante bloedcultuurmedia bevatten eveneens cellyserende agentia, zoals saponine (Hughes *et al.*, 2001).

Blijvende problemen

Voor zover de toename in het aantal positieve culturen na aanrijking in vloeibare media niet wordt veroorzaakt door contaminatie, vertegenwoordigt deze rechtstreeks de fractie vals-negatieve resultaten na het enten op plaat. Vermoedelijk is daarmee echter het probleem van de vals-negatieve bacteriologie niet opgelost. Hoewel na experimentele besmetting van gewrichten bij het paard en de hond quasi geen vals-negatieve culturen meer werden bekomen na incubatie van synoviaal vocht in vloeibare media, blijft het de vraag of ook in klinische situaties bij patiënten een quasi 100 % sensitiviteit van de techniek mag worden verondersteld. Immers, mocht met de komst van nieuwe moleculaire technieken blijken dat, wanneer infectieuze artritis vermoed wordt en ondanks een negatieve bloedcultuur, er toch bacteriën kunnen worden aangetoond in synoviaal vocht, dan zal de gevoeligheid van het bacteriologisch onderzoek opnieuw moeten worden gerelativeerd. Tot het tegendeel bewezen is, wordt het best elke synovitis die gepaard gaat met erg manken en met een duidelijke lokale stijging van het aantal neutrofielen en het totaal aan eiwit, behandeld als zijnde infectieus, zelfs als het bacteriologisch onderzoek negatief is (Madison *et al.*, 1991).

MOLECULAIRE TECHNIEKEN

Principe

De moleculaire diagnostiek in geval van infectie omvat het geheel van testen die tot doel hebben pathogeenspecifieke macromoleculen op te sporen en te identificeren (Hoeffel *et al.*, 1999). De meest gebruikte techniek is ongetwijfeld PCR met als target molecule het DNA dat codeert voor het ribosomaal RNA (rRNA) van de 16S subunit (Fig. 2). De DNA-sequenties van het 16S rRNA-gen zijn typisch bacterieel en zijn tijdens de evolutie grotendeels goed geconserveerd en uniform gebleven. Daardoor kan middels het gebruik van een universeel primerpaar of een probe voor om het even welke bacteriële infectie gescreend worden. Dit maakt universele 16S PCR echter uitermate gevoelig voor contaminatie en vals-positieve resultaten. Binnen het 16S rRNA-gen komen anderzijds kleine genus- en speciesspecifieke variaties voor die toelaten unieke primers en probes te ontwerpen waarmee de belangrijkste pathogene genera of species specifiek kunnen worden opgespoord. Het gebruik van dergelijke primers of probes vergemakkelijkt de volledige identificatie van het infecterend organisme, maar verhoogt de kans op vals-negatieve resultaten in die gevallen waar het staal pathogenen bevat waarvoor niet specifiek wordt gescreend.

Bij PCR dient het DNA te worden geamplificeerd vooraleer het kan worden gedetecteerd. Het geamplificeerd DNA (het zogenaamd PCR-product) wordt meestal elektroforetisch gescheiden op een agarose gel die ethidiumbromide bevat en wordt vervolgens gevisualiseerd door belichting met UV. Soms wordt gebruik gemaakt van hybridisatietechnieken waarbij het PCR-product na hybridisatie met universele probes of genus- of speciesspecifieke (oligonucleotide) probes gevisualiseerd wordt via radiolabeling, chemiluminescentie of chemiefluorescentie. Dergelijke hybridisatietechnieken kunnen ook worden toegepast om zonder amplificatie de aanwezigheid van een specifieke DNA- of RNA-sequentie rechtstreeks aan te tonen. Dit gebeurt onder andere bij in situ hybridisatie. In situ hybridisatie werd uitgevoerd om obli-gaat intracellulaire bacteriën op te sporen in synoviale biopten bij de mens (Berlau *et al.*, 1998). Het gebruik van in situ hybridisatie om eventuele gefagocyteerde bacteriën op te sporen in synoviaal vocht werd nog niet beschreven.

Ervaringen bij de mens

In de humane geneeskunde werd de 16S PCR-techniek in eerste instantie ontwikkeld om bij complicaties na het plaatsen van een gewrichtsprothese artritis veroorzaakt door iatrogene infectie te kunnen onderscheiden van artritis eventueel veroorzaakt door het biomechanisch falen van het implantaat (Levine *et al.*, 1995; Mariani *et al.*, 1996; Mariani en Tuan, 1998). Omdat in dergelijke gevallen de patiënten meestal postoperatief langdurig worden behandeld met antibiotica, is standaard bacteriologisch onderzoek onvoldoende gevoelig. In de studie van Mariani *et al.* (1996) hadden 32 van de 50 stalen die verdacht werden van infectie na het plaatsen van een knieprothese, een positieve PCR-test, terwijl slechts 15 van de stalen een positief cultuurresultaat vertoonden. Er werden geen vals-positieve PCR-resultaten waargenomen bij de analyse van de negatieve controles (Mariani *et al.*, 1996). Dit laatste moet echter gerelativeerd worden omdat de auteurs hun resultaten semi-kwantitatief interpreteerden. Bij 6 van de 21 negatieve controles werd wel een PCR-sig-naal opgemerkt, doch dit was duidelijk zwakker dan het signaal van de 32 positieve klinische stalen. Mariani en Tuan (1998) beschouwen een vals-positief resultaat veel-er als een probleem van interpretatie dan als een technisch probleem. Bacteriële PCR werd eveneens gebruikt om het effect van een behandeling met antibiotica te evalueren bij mensen met infectieuze artritis (Canvin *et al.*, 1997; Van Der Heijden *et al.*, 1999). Middels 16S PCR kan bacterieel DNA meestal gedurende enkele weken worden aangetoond in synoviaal vocht terwijl de resultaten van een standaard bacteriologisch onderzoek vaak reeds enkele dagen na de aanvang van de behandeling negatief zijn. De betekenis van een positief PCR-sig-naal enkele weken na de aanvang van de antibioticabehandeling bij een negatief cultuurresultaat is onduidelijk. Ofwel wordt dit veroorzaakt door de aanwezigheid van debris van dode micro-organismen, ofwel zijn er effectief nog steeds levende bacteriën aanwezig die in hun groei worden geremd door de continue toediening van antibiotica (Canvin *et al.*, 1997; Van Der Heijden *et al.*, 1999). Het al dan niet levend of metabool actief zijn van bacteriën is theoretisch beter gecorreleerd met de aanwezigheid van bacterieel RNA, dat via reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) kan worden opgespoord (Kempsell *et al.*, 2000; Keer en Birch, 2003). RT-PCR is echter complex en geeft gemakkelijk aanleiding tot onbetrouwbare resultaten. Bovendien is de degradatie van DNA en RNA afhankelijk van

talrijke factoren waardoor het verband tussen de aanwezigheid van een bepaalde hoeveelheid DNA en RNA enerzijds en het al dan niet levend of metabool actief zijn van bacteriën anderzijds moeilijk te kwantificeren valt (Keer en Birch, 2003). Verdere ontwikkelingen in de moleculaire diagnostiek zullen er mogelijk toch toe leiden dat de periode gedurende dewelke antibiotica moeten worden toegediend aan patiënten met infectieuze artritis exacter zal kunnen worden bepaald, en dit afhankelijk van het (RT-)PCR resultaat. Na eradicatie van de bacteriën zal men zonder meer de behandeling kunnen focussen op het bestrijden van een eventueel uit de hand gelopen synoviale ontstekingsreactie. Dit is op heden echter meer een hypothese dan een klinische realiteit (Van Der Heijden *et al.*, 1999). Sinds het op punt stellen van de universele 16S PCR voor het opsporen van bacterieel DNA in synoviaal vocht werd deze techniek ook aangewend in het fundamenteel onderzoek naar andere artritiden bij de mens, zoals reumatoïde, immuungemedieerde en reactieve artritis (Braun *et al.*, 1997; Wilbrink *et al.*, 1998; Louie en Liebling, 1998; Wilkinson *et al.*, 1999; Van Der Heijden *et al.*, 2000; Kempell *et al.*, 2000). Hoewel deze artritiden primair niet infectieus van aard zijn, heeft men door middel van (RT-)PCR in een groot aantal gevallen toch bacterieel DNA (of RNA) kunnen aantonen, hetzij in het synoviaal vocht, hetzij ter hoogte van het synoviaal vlies. De betekenis van deze bevinding en de rol van bacterieel DNA in de pathogenese van deze specifieke artritiden blijven tot op heden onduidelijk en zijn voorwerp van verder onderzoek.

Ervaringen bij het paard

Bij het paard zijn er geen publicaties voorhanden die het gebruik van PCR beschrijven voor het rechtstreeks opsporen van bacterieel DNA in synoviaal vocht van klinische gevallen met infectieuze artritis of die ervan verdacht zijn. Slechts één enkele studie evalueerde de sensitiviteit van 16S PCR voor het opsporen van bacterieel DNA in synoviaal vocht aspiraten waaraan achteraf in vitro een gekende hoeveelheid bacteriën werd toegevoegd (Crabill *et al.*, 1996). Voorafgaand aan de PCR werd het kunstmatig geïnfecteerd gewrichtsvocht echter gedurende 24 uur geïncubeerd in een cultuurmedium. De PCR werd dus uitgevoerd op een volgroeid cultuurmedium en dus niet rechtstreeks op synoviaal vocht. Teneinde de gevoeligheid van de PCR-test te kunnen vergelijken met de gevoeligheid van het bacteriologisch onderzoek werd vanuit het cultuurmedium eveneens over-

geënt op plaat. Zoals verwacht, was de sensitiviteit van beide testen gelijkwaardig (Crabill *et al.*, 1996). Deze manier van werken blijkt dus weinig zinvol.

Rechtstreekse detectie en identificatie van bacterieel DNA in cultuurpositieve aspiraten van synoviaal vocht van paarden met infectieuze synovitis zijn nochtans mogelijk (nog niet gepubliceerde gegevens). Het moet echter nog onderzocht worden of 16S PCR gevoeliger is dan het bacteriologisch onderzoek bij paarden verdacht van infectieuze artritis. Tot op heden zijn er bij het paard geen indicaties voor de betrokkenheid van bacteriën of bacterieel DNA in de pathogenese van primair niet-infectieuze artritiden. Typische reumatoïde en reactieve artritis zoals men die kent bij de mens komt bij paarden immers niet voor en niet-infectieuze artritis is quasi steeds post-traumatisch van aard. De eventuele aanwezigheid van bacterieel DNA in synoviaal vocht van veulens met immuungemedieerde polysynovitis na een veralgemeende (*Rhodococcus*) infectie werd nog niet onderzocht (Madison and Scarratt, 1988; Kenney *et al.*, 1994).

Vooruitzichten

Van alle moleculaire technieken lijkt vooral PCR met universele primers voor het 16S rRNA-gen een plaats te verwerven in het arsenaal van diagnostische middelen die ons ter beschikking staan om musculoskeletale infecties op te sporen. Wil deze techniek echter het vertrouwen winnen van de klinici, dan zal open kaart moeten worden gespeeld met betrekking tot de tekortkomingen van de techniek. De huidige literatuur betreffende het gebruik van 16S PCR bij synoviale infecties bij de mens blijft vaag wanneer het gaat over de betrouwbaarheid van de test. Hoeffel *et al.* (1999) zijn erin geslaagd om in hun overzichtsartikel uit de vaak weinig overzichtelijke resultaten de sensitiviteit en specificiteit samen te vatten voor de verschillende klinische studies die tot op heden werden uitgevoerd. Hun conclusie is genuanceerd. De sensitiviteit en specificiteit van 16S PCR zijn ontoereikend bij het screenen op prothese-infecties. De resultaten van de techniek in de diagnostiek van infectieuze artritis zijn echter veelbelovend. Mits verder onderzoek zal 16S PCR naar alle waarschijnlijkheid in de toekomst zijn belang hebben bij het routinematig isoleren en identificeren van bacteriën bij musculoskeletale infecties (Hoeffel *et al.*, 1999). Een belangrijk nadeel van de moleculaire technieken in vergelijking met standaard bacteriologisch onderzoek blijft het feit dat dergelijke testen geen directe

informatie verschaffen betreffende resistentie en gevoeligheid van het infecterend organisme ten opzichte van een welbepaald antibioticum. Dit kan gedeeltelijk worden gecompenseerd door gebruik te maken van gegevens uit retrospectieve studies waarin voor talrijke isolaten afkomstig van musculoskeletale infecties de effectiviteit van de verschillende antibiotica geëvalueerd werd (Moore *et al.*, 1992).

DANKBETUIGING

De auteurs danken Em. Prof. Dr. A. De Moor voor het kritisch nalezen van het manuscript.

LITERATUUR

- Berlau J., Junker U., Groh A., Straube E. (1998). In situ hybridisation and direct fluorescence antibodies for the detection of *Chlamydia trachomatis* in synovial tissue from patients with reactive arthritis. *Journal of Clinical Pathology* 51, 803-806.
- Bertone A.L., McIlwraith C.W., Jones R.L., Norrdin R.W., Radin M.J., Lebel J.L. (1987). Comparison of various treatments for experimentally induced equine infectious arthritis. *American Journal of Veterinary Research* 48, 519-529.
- Braun J., Tuszewski M., Eggens U., Mertz A., Schauer-Petrowskaja C., Döring E., Laitko S., Distler A., Sieper J., Ehlers S. (1997). Nested polymerase chain reaction strategy simultaneously targeting DNA sequences of multiple bacterial species in inflammatory joint diseases. I. Screening of synovial fluid samples of patients with spondyloarthropathies and other arthritides. *The Journal of Rheumatology* 24, 1092-1100.
- Canvin J.M.G., Goutcher S.C., Hagig M., Gemmell C.G., Sturrock R.D. (1997). Persistence of *Staphylococcus aureus* as detected by polymerase chain reaction in the synovial fluid of a patient with septic arthritis. *British Journal of Rheumatology* 36, 203-206.
- Crabill M.R., Cohen N.D., Martin L.J., Simpson R.B., Burney N. (1996). Detection of bacteria in equine synovial fluid by use of the polymerase chain reaction. *Veterinary Surgery* 25, 195-198.
- Hoeffel D.P., Hinrichs S.H., Garvin K.L. (1999). Molecular Diagnostics for the detection of musculoskeletal infection. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 360, 37-46.
- Hughes J.G., Vetter E.A., Patel R., Schleck C.D., Harmsen S., Turgeant L.T., Cockerill III F.R. (2001). Culture with BACTEC Peds Plus/F Bottle compared with conventional methods for detection of bacteria in synovial fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 4468-4471.
- Keer J.T., Birch L. (2003). Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiological Methods* 53, 175-183.
- Kempell K.E., Cox C.J., Hurlle M., Wong A., Wilkie S., Zanders E.D., Gaston J.S.H., Crowe J.S. (2000). Reverse Transcriptase-PCR analysis of bacterial rRNA for detection and characterization of bacterial species in arthritis synovial tissue. *Infection and Immunity* 68, 6012-6026.
- Kenney D.G., Robbins S.C., Prescott J.F., Kaushik A., Baird J.D. (1994). Development of reactive arthritis and resistance to erythromycin and rifampin in a foal during treatment for *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Veterinary Journal* 25, 246-248.
- Levine M.J., Mariani B.A., Tuan R.S., Booth R.E. (1995). Molecular genetic diagnosis of infected total joint arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty* 10, 93-94.
- Louie J.S., Liebling M.R. (1998). The polymerase chain reaction in infectious and post-infectious arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 24, 227-236.
- Madison J.B., Scarratt W.K. (1988). Immune-mediated polysynovitis in four foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 192, 1581-1584.
- Madison J.B., Sommer M., Spencer P.A. (1991). Relations among synovial membrane histopathologic findings, synovial fluid cytologic findings, and bacterial culture results in horses with suspected infectious arthritis: 64 cases (1979-1987). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 198, 1655-1661.
- Mariani B.D., Martin D.S., Levine M.J., Booth R.E., Tuan R.S. (1996). Polymerase chain reaction detection of bacterial infection in total knee arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 331, 11-22.
- Mariani B.D., Tuan R.S. (1998). Advances in diagnosis of infection in prosthetic joint implants. *Molecular Medicine Today* 4, 207-213.
- Montgomery R.D., Long I.R., Milton J.L., DiPinto M.N., Hunt J. (1989). Comparison of aerobic culturette, synovial membrane biopsy, and blood culture medium in detection of canine bacterial arthritis. *Veterinary Surgery* 18, 300-303.
- Moore R.M., Schneider R.K., Kowalski J., Bramlage L.R., Mecklenburg L.M., Kohn C.W. (1992). Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from 233 horses with musculoskeletal infection during 1979-1989. *Equine Veterinary Journal* 24, 450-456.
- Schneider R.K., Bramlage L.R., Moore R.M., Mecklenburg L.M., Kohn C.W., Gabel A.A. (1992). A retrospective study of 192 horses affected with septic arthritis/tenosynovitis. *Equine Veterinary Journal* 24, 436-442.
- Tulamo R.M., Bramlage L.R., Gabel A.A. (1989a). Sequential clinical and synovial fluid changes associated with acute infectious arthritis in the horse. *Equine Veterinary Journal* 21, 325-331.
- Van Der Heijden I.M., Wilbrink B., Vije A.E.M., Schouls L.M., Breedveld F.C., Tak P.P. (1999). Detection of bacterial DNA in serial synovial samples obtained during antibiotic treatment from patients with septic arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 42, 2198-2203.
- Van Der Heijden I.M., Wilbrink B., Tchetverikov I., Schrijver I.A., Schouls L.M., Hazenberg M.P., Breedveld F.C., Tak P.P. (2000). Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis and Rheumatism* 43, 593-598.

- Von Essen R., Hölttä A. (1986). Improved method of isolating bacteria from joint fluids by the use of blood culture bottles. *Annals of the Rheumatic Diseases* 45, 454-457.
- Von Essen R. (1997). Culture of joint specimens in bacterial arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 26, 293-300.
- Wilbrink B., Van Der Heijden I.M., Schouls L.M., Embden J.D.A., Hazes J.M.W., Breedveld F.C., Tak P.P. (1998). Detection of bacterial DNA in joint samples from patients with undifferentiated arthritis and reactive arthritis, using polymerase chain reaction with universal 16S ribosomal RNA primers. *Arthritis and Rheumatism* 41, 535-543.
- Wilkinson N.Z., Kingsley G.H., Jones H.W., Sieper J., Braun J., Ward M.E. (1999). The detection of DNA from a range of bacterial species in the joints of patients with a variety of arthritides using a nested, broad-range polymerase chain reaction. *Rheumatology* 38, 260-266.
- Yagupsky P., Press J. (1997). Use of the isolator 1.5 microbial tube for culture of synovial fluid from patients with septic arthritis. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 2410-2412.