

JOSÉ LUIS AMIM ZABEU

**Estudo comparativo da sonicação com as culturas intraoperatórias
para a identificação do agente microbiano nas artroplastias
infectadas dos membros inferiores**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Ortopedia e
Traumatologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lucia
Lei Munhoz Lima

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Zabeu, José Luis Amim

Estudo comparativo da sonicação com as culturas intraoperatórias para identificação do agente microbiano nas artroplastias infectadas dos membros inferiores / José Luis Amim Zabeu. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientadora: Ana Lucia Lei Munhoz Lima.

Descritores: 1.Sonicação 2.Artroplastia 3.Infecções relacionadas à prótese
4.Artroplastia de quadril 5.Artroplastia do joelho 6.Técnicas de cultura
7.Infecções bacterianas 8.Técnicas bacteriológicas 9.Estudo comparativo
10.Estudos prospectivos

USP/FM/DBD-196/16

À minha esposa Ondina, indispensável em todos os momentos.

Às minhas filhas Giovanna e Victoria, maiores razões de seguir em frente.

Aos meus pais, Plínio e Claudette, por sempre estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Olavo Pires de Camargo, Professor Titular de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e pelo apoio.

À Professora Doutora Ana Lúcia Lei Munhoz Lima, minha orientadora, pelo exemplo, pela objetividade e pelo rigor fundamentais neste tipo de trabalho.

Aos Grupos de Quadril e Joelho do IOT-HCFMUSP, pela ativa participação no encaminhamento dos pacientes e pelo auxílio na coleta das amostras, e, em especial, aos residentes destes grupos de 2014 e 2015.

À banca de qualificação, composta pelos Professores Doutores José Ricardo Pécora e José Ricardo Negreiros Vicente, e pelo Doutor Vladimir Cordeiro de Carvalho, pelas orientações e correções sugeridas.

À infectologista do IOT-HCFMUSP, Doutora Priscila Rosalba Domingos de Oliveira, pelo auxílio e pela disponibilidade.

À equipe do Laboratório de Microbiologia do HCFMUSP, em especial, a sua Responsável Técnica, Professora Doutora Flávia Rossi, a Farmacêutica Chefe Valéria Teixeira Alves Rosa e a Farmacêutica Encarregada Rosilaine Souza Arruda Teberges, fundamentais em todo o trabalho de recebimento e processamento das amostras, além da orientação detalhada em cada dúvida do processo de cultura microbiológica.

Às secretárias da pós-graduação do IOT-HCFMUSP Tânia Maria Borges e Rosana Costa, pelo suporte, pela eficiência e pela compreensão durante todo o programa de pós-graduação.

Ao Professor Doutor José Carlos Affonso Ferreira, meu mestre na formação ortopédica, e ao Doutor Wilson Mello Alves Jr., que me propiciou os primeiros contatos com minha orientadora.

À minha parceira e instrumentadora Nocélia Cristina Cunha Businari e a seu marido Marcos Giovani Businari, amigos e companheiros cujo trabalho e apoio se mostraram indispensáveis na realização deste projeto.

À bibliotecária Renata Ciol, pelo importante auxílio nas fases iniciais da pesquisa.

À Maria Cristina Emerick, responsável pelo apoio administrativo nos projetos de pesquisa da Comissão de Projetos do Conselho Diretor do IOT-HCFMUSP, cujo excelente trabalho junto à FAPESP foi fundamental nas soluções burocráticas do projeto.

À Valquíria Cristina Dias, pelo profissionalismo e pela correção nas orientações quanto à formatação desta tese.

Ao enfermeiro Wesley Orlandi Espinosa, do Núcleo de Estudos Ortopédicos de Campinas, pelo suporte e pela logística no transporte das amostras.

Aos colegas ortopedistas Mauro Bosi, Renato Segal, Marcelo Zavaloni Melotti, Rodrigo Pereira da Silva Nunes e Eduardo Gomes Machado, pela valiosa colaboração na indicação de pacientes.

Aos pacientes e a seus familiares, por terem concordado em participar deste estudo, e para quem nosso trabalho deverá sempre ser dedicado.

À minha família, pela paciência, pelo amor, pelo carinho, por tudo!

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 OBJETIVOS	4
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 Epidemiologia das artroplastias de joelho e quadril no Brasil e em outros países	6
2.2 Classificações das IPP	8
2.3 Biofilme	13
2.4 Diagnóstico da IPP	15
2.4.1 Testes sanguíneos.....	17
2.4.2 Exames de imagem	18
2.4.2.1 <i>Radiografia simples</i>	18
2.4.2.2 <i>Tomografia computadorizada</i>	18
2.4.2.3 <i>Ressonância magnética</i>	19
2.4.2.4 <i>Medicina nuclear</i>	19
2.4.3 Análise citológica do líquido sinovial.....	20
2.4.4 Análise histológica do tecido periprotético	21
2.5 Diagnóstico microbiológico	23
2.5.1 Cultura do líquido sinovial	24
2.5.2 Cultura de tecido periprotético	24
2.5.3 Sonicação do implante removido	27
2.5.4 Diagnóstico molecular.....	31
3 MÉTODOS	34
3.1 Desenho do estudo	34
3.2 Aprovação na comissão de ética e termo de consentimento	34
3.3 Financiamento do projeto	35

3.4 Critérios de seleção	35
3.4.1 Critérios de inclusão	35
3.4.2 Critérios de não inclusão.....	37
3.4.3 Critérios de exclusão	37
3.5 Características e locação do estudo	38
3.6 Inclusão e preenchimento da ficha de coleta de dados	38
3.7 Procedimentos para obtenção, transporte e processamento das amostras	39
3.7.1 Coleta do tecido periprotético	40
3.7.2 Coleta e sonicação do implante	42
3.7.3 Transporte das amostras	46
3.7.4 Processamento das amostras.....	46
3.7.4.1 <i>Cultura do tecido periprotético</i>	47
3.7.4.1.1 <i>Cultura aeróbia</i>	47
3.7.4.1.2 <i>Cultura anaeróbia</i>	52
3.7.4.1.3 <i>Cultura de fungos</i>	54
3.7.4.1.4 <i>Cultura de micobactérias</i>	55
3.7.4.2 <i>Cultura do líquido resultante da sonicação</i>	56
3.8 Análise estatística	58
4 RESULTADOS	61
4.1 Recrutamento	61
4.2 Caracterização da amostra	61
4.3 Sensibilidade do diagnóstico de infecção	63
4.3.1 Comparação entre a cultura do líquido de sonicação e a cultura do tecido periprotético.....	63
4.3.2 Comparação entre os diferentes sítios de coleta do tecido periprotético	63
4.4 Associação entre as características da amostra e o diagnóstico de infecção	64
4.5 Frequência de ocorrência de micro-organismos	65
5 DISCUSSÃO	68
5.1 Considerações sobre a epidemiologia das artroplastias no Brasil	68
5.2 Considerações sobre as classificações das IPP	69
5.3 Considerações sobre o diagnóstico da IPP	70

5.4 Considerações a respeito do diagnóstico microbiológico	73
5.5 Discussão dos resultados do estudo	76
5.5.1 Recrutamento	76
5.5.2 Perfil demográfico	77
5.5.3 Caracterização da amostra	78
5.5.4 Sensibilidade do diagnóstico de infecção	79
5.6 Limitações do estudo	81
6 CONCLUSÕES.....	84
7 ANEXOS.....	86
7.1 ANEXO A - Carta de aprovação do projeto pela comissão científica do IOT	86
7.2 ANEXO B - Carta de Aprovação do Estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisas da FMUSP	87
7.3 ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	88
7.4 ANEXO D - Ficha de coleta de dados do paciente	92
7 REFERÊNCIAS	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAOS	<i>American Academy of Orthopaedic Surgeons</i>
AIH	Autorização de Internação Hospitalar
ANS	Agência Nacional de Saúde Suplementar
ANTT	Agência Nacional de Transportes Terrestres
AS	Ágar Sangue
ASANA	Ágar Sangue para Anaeróbios
BAER	Frasco de Hemocultura BACTEC para Aeróbios
BANA	Frasco de Hemocultura BACTEC para Anaeróbios
CAER	Cultura para Micro-organismos Aeróbios
CANA	Cultura para Micro-organismos Anaeróbios
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFU	<i>Colony-Forming Unit</i>
CFUN	Cultura para Fungos
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CMIC	Cultura para Micobactérias
CO ₂	Gás Carbônico
COX	Ágar Chocolate
DAIR	<i>Debridement, Antibiotics and Implant Retention</i>
DATASUS	Departamento de Informática do SUS
DLC	Divisão do Laboratório Central
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EBJIS	<i>European Bone and Joint Infection Society</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDG	<i>Fluorodeoxyglucose</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HBD-3	β-Defensina Humana-3

HC	Hospital das Clínicas
HPF	<i>High-Power Field</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
IL-6	Interleucina-6
IOT	Instituto de Ortopedia e Traumatologia
IPP	Infecção periprotética
kHz	Quilohertz
LJ	<i>Löwenstein Jensen</i>
LL-37	Catelicidina LL-37
LM	Laboratório de Microbiologia
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
MC	Ágar MacConkey
ml	Mililitros
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
MSIS	<i>Musculoskeletal Infection Society</i>
MYCOF	Frasco de Hemocultura BACTEC para Fungos e Micobactérias
pCO ₂	Pressão Parcial de Gás Carbônico
PCR	Proteína C-Reativa
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PMN	Leucócitos Polimorfonucleares
PNB	Ácido Paranitrobenzoico
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
pO ₂	Pressão Parcial de Oxigênio
RCP	Reação em Cadeia da Polimerase
RG	Registro Geral
RH	Registro Hospitalar
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SAB	Sabouraud

SBOT	Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia
SCV	<i>Small-Colony Variants</i>
SF-36	<i>Short-Form 36</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TIO	Tioglicolato
VHS	Velocidade de Hemossedimentação
WOMAC	<i>Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação de Tsukayama para IPP	10
Tabela 2	Classificação de Trampuz e Zimmerli para IPP	11
Tabela 3	Riscos associados à presença de IPP – critérios da AAOS	36
Tabela 4	Características dos sujeitos estudados	62
Tabela 5	Comparação do diagnóstico de sensibilidade para infecção entre cultura do fluído de sonicação e cultura de diferentes tecidos.....	63
Tabela 6	Associação entre antibioticoterapia recente e diagnóstico de infecção por meio de cultura do fluído de sonicação	64
Tabela 7	Distribuição de micro-organismos detectados por Cultura do Fluído de Sonicação e Cultura de Tecido ^a	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Frasco com tioglicolato contendo amostras de tecido periprotético.....	41
Figura 2	Frascos com tecido periprotético no recipiente para transporte.....	41
Figura 3	Componentes da prótese no recipiente para sonicação.....	42
Figura 4	Recipiente com os implantes na bacia do sonicador.....	43
Figura 5	Sonicador Bransonic 5800.....	44
Figura 6	Frascos de hemocultura BD Bactec.....	45
Figura 7	Frasco de hemocultura com líquido da sonicação.....	45
Figura 8	Recebimento de amostras pelo laboratório de microbiologia.....	47
Figura 9	Placa de ágar sangue com crescimento de <i>Enterococcus sp</i>	49
Figura 10	Placa de ágar MacConkey com crescimento de <i>Escherichia coli</i>	49
Figura 11	Placa para colocação de amostras para uso no equipamento VITEK MS.....	50
Figura 12	Equipamento VITEK MS para identificação de micro-organismos.....	51
Figura 13	Equipamento VITEK 2 XL para testes de sensibilidade a antimicrobianos.....	52
Figura 14	Placa de ágar chocolate com crescimento de <i>Haemophilus influenzae</i>	53
Figura 15	Equipamento BD Bactec FX para processamento dos frascos de hemocultura contendo o líquido da sonicação.....	56

RESUMO

Zabeu JLA. *Estudo comparativo da sonicação com as culturas intraoperatórias para a identificação do agente microbiano nas artroplastias infectadas dos membros inferiores* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2016.

INTRODUÇÃO: O diagnóstico microbiológico das infecções em artroplastias é de fundamental importância para a definição da estratégia de uso dos antimicrobianos. As culturas microbiológicas convencionais apresentam elevados índices de falso-negativos, em especial, nas infecções crônicas, em que é frequente a presença do biofilme aderido ao implante. A utilização de amostras deste biofilme, viáveis à cultura, a partir de seu descolamento do implante pela técnica de sonicação, tem mostrado aumento da sensibilidade em publicações recentes. O objetivo deste estudo foi comparar os resultados das culturas microbiológicas de fragmentos de tecido periprotético, realizadas em meio sólido, àquelas obtidas pelo cultivo do líquido oriundo da sonicação do implante removido, semeado, inicialmente, em frascos de hemocultura e, posteriormente, em meio sólido. **MÉTODOS:** Neste estudo de análise descritiva, prospectivo e comparativo, 30 pacientes com diagnóstico de infecção em artroplastias de joelho ou quadril, com mais de 90 dias de história, tiveram seus implantes cirurgicamente removidos e foram coletadas seis amostras do tecido periprotético, de locais previamente determinados, para a realização de cultura microbiológica em meios sólidos. Simultaneamente, os implantes foram submetidos ao processo de sonicação e o material resultante foi injetado em frascos de hemocultura BD Bactec e submetidos ao processo de cultura automatizada. Todas as amostras foram pesquisadas quanto à presença de bactérias aeróbias, anaeróbias, micobactérias e fungos, e os resultados comparados por meio de análise estatística, em busca da superioridade de um método sobre o outro. Como objetivo secundário, buscou-se analisar quais os pontos de coleta do tecido periprotético teriam maior sensibilidade em suas culturas. **RESULTADOS:** Não houve diferenças estatisticamente significantes da amostra em relação ao gênero, patologia articular primária, tipo de artroplastia, localização do implante ou lateralidade. Em 17 casos (56,7%), houve uso de antimicrobianos no período de 15 dias que antecederam a retirada do implante. O método de cultura do fluido de sonicação mostrou sensibilidade de 86,7% e foi superior, de modo estatisticamente significativo ($P < 0,001$), em relação à cultura dos fragmentos periprotéticos, cujos resultados tiveram sensibilidades entre 26,7 e 53,3%. O uso de antibioticoterapia recente não interferiu de modo estatisticamente significativo na sensibilidade da cultura do líquido oriundo da sonicação. ($P = 0,113$). Quanto ao objetivo secundário, a coleta de fragmentos da membrana periprotética mostrou maior sensibilidade, estatisticamente significativa, na comparação com três dos

demais cinco pontos de coleta ($P < 0,05$). **CONCLUSÕES:** A cultura microbiológica do líquido obtido por sonicação dos implantes removidos de pacientes com diagnóstico de infecção periprotética e semeado inicialmente em frascos de hemocultura mostrou ter sensibilidade superior, estatisticamente significativa, à cultura convencional de fragmentos do tecido periprotético semeados em meios sólidos. A cultura microbiológica da membrana periprotética mostrou ter maior sensibilidade em relação à maioria dos outros sítios que tiveram fragmentos de tecido periprotético pesquisados.

Descritores: sonicação; infecção em artroplastia; infecção periprotética; artroplastia do quadril; artroplastia do joelho; diagnóstico microbiológico; cultura microbiológica; hemocultura; estudo comparativo; estudo prospectivo.

ABSTRACT

Zabeu JLA. *Comparative study of sonication and intraoperative cultures for identification of the microbial agent on infected lower limb arthroplasties*. [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2016.

INTRODUCTION: Microbiological diagnosis in periprosthetic infection is of fundamental importance to define the most appropriate antimicrobial strategies. Conventional microbiological cultures have high rates of false negatives, especially in chronic infections, in which there is often the presence of biofilm attached to the implant. The use of samples of viable culturable biofilm taken from the detachment of the implant by sonication technique has been shown to increase the sensitivity in recent studies. The objective of this study was to compare the results of microbiological cultures of periprosthetic tissue fragments, made in a solid medium, to those obtained through the cultivation of the liquid coming from the sonication of the removed implant initially seeded in blood culture bottles and later in solid medium. **METHODS:** Using descriptive, prospective and comparative analysis, thirty patients with a diagnosis of infected knee or hip arthroplasty, with more than ninety days of history, had their implants surgically removed. Six periprosthetic tissue samples, collected at predetermined places, were used for microbiological culture on solid media. Simultaneously, the implants were subjected to the sonication process, and the resulting material was injected into vials of BD Bactec blood cultures and subjected to an automated culture process. All samples were screened for the presence of aerobic bacteria, anaerobes, mycobacteria and fungi and the results compared by statistical analysis to find the superiority of one method over the other. As a secondary objective, this study sought to analyze which of the periprosthetic tissue collecting points would have greater sensitivity in their cultures. **RESULTS:** There were no statistically significant differences in the sample as related to gender, primary joint pathology, type of arthroplasty, implant location or laterality. In seventeen cases (56.7%), antimicrobials were used within the 15-day period leading up to the removal of the implant. The sonication culture fluid showed a sensitivity of 86.7% and was higher, statistically significant ($P < 0.001$) in relation to the culture of periprosthetic fragments, where results displayed sensitivities between 26.7 and 53.3%. The use of recent antibiotic therapy did not affect the sensitivity of the liquid coming from the sonication culture, which was not statistically significant ($P = 0.113$). As for the secondary objective, the collection of periprosthetic membrane fragments showed higher sensitivity, statistically significant ($P < 0.05$), as compared to three of the remaining five collecting points. **CONCLUSIONS:** The microbiological culture liquid obtained by sonication of the implants removed from patients with diagnosis of periprosthetic infection

and initially seeded in blood culture bottles was shown to have superior sensitivity, statistical significance, as compared to conventional culture of the periprosthetic tissue fragments seeded on solid media. The microbiological culture of the periprosthetic membrane seems to be more sensitive compared to most other sites that had periprosthetic tissue fragments surveyed.

Descriptors: sonication; arthroplasty infection; periprosthetic infection; hip arthroplasty; knee arthroplasty; microbiological diagnosis; microbiological culture; hemoculture; comparative study; prospective study.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A infecção periprotética (IPP) é considerada uma complicação devastadora da artroplastia total. Acarreta sofrimento ao seu portador, gastos significativos para sua família e ao sistema de saúde, e pode levar a sequelas definitivas, inclusive à morte do paciente. Mesmo ocorrendo em número reduzido em relação ao total de cirurgias de artroplastia, o rápido reconhecimento do quadro, do seu diagnóstico microbiológico, e a realização de ações visando à erradicação da infecção e à recuperação funcional do indivíduo são fundamentais.

A incidência de infecção em artroplastias primárias do joelho e quadril é estimada entre 1 e 5% dos casos, e pode atingir até 7% em cirurgias de revisão.^{1,2}

Em relação às endopróteses, realizadas após ressecção de tumores do esqueleto ou em grandes perdas ósseas, esta incidência chega a 15%.³

Outras articulações, como ombro, cotovelo e tornozelo, têm sido passíveis de substituição protética, com aumento progressivo do número de casos. A incidência de infecção na artroplastia do ombro se situa em torno de 1% dos casos, enquanto na artroplastia total do cotovelo a incidência se mostra mais elevada, em torno de 3,3%. Deve ser considerado que a maior indicação de artroplastia total de cotovelo é por doença reumatoide, o que explicaria uma incidência mais elevada de infecção, pelo perfil do paciente, mais frequentemente, imunodeprimido.^{4,5}

A ocorrência de infecção após a cirurgia de artroplastia está associada ao aumento da morbidade e mortalidade, e a custos elevados para seu diagnóstico e tratamento.

A queda dos parâmetros de qualidade de vida em pacientes com IPP de quadril e joelho, mensuráveis em questionários como o SF-36 ("Short-Form 36") e WOMAC ("Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index"), foi demonstrada em estudo de Cahill *et al.*, de 2008.

Neste trabalho, com casuística de 62 pacientes, foram comparados os resultados entre grupos com artroplastia total de quadril com a presença ou ausência do diagnóstico de infecção. Os dados do questionário WOMAC, que mede função, dor e rigidez articular por meio de pontuação que vai de zero a 96, sendo que os valores mais altos indicam piores resultados, resultaram no dobro dos pontos para o grupo com infecção. O SF-36, que avalia aspectos como função do membro submetido à cirurgia, presença de dor, sensação de vitalidade, aspectos da saúde mental, sociabilidade, limitações físicas e emocionais, os resultados para o grupo com infecção foram inferiores de modo estatisticamente significativo em 80% dos parâmetros avaliados, com $p < 0.0001$ em todos eles.^{6,7,8}

Do ponto de vista econômico, os custos da investigação diagnóstica, da realização de procedimentos cirúrgicos, como desbridamento ou troca do implante, as internações e o uso prolongado de antibióticos geram valores que excedem em, ao menos, três vezes o custo de uma prótese primária, e em, ao menos, 50% uma revisão por soltura asséptica.^{9,10}

Já o custo do tratamento ao se optar por revisão em dois tempos aumenta estes valores em seis vezes ou mais.¹¹

Os principais desafios no manuseio das IPP são referentes à confirmação do seu diagnóstico, à definição do patógeno por meio do correto diagnóstico microbiológico e à estratégia do tratamento. Estes itens são interligados, uma vez que a falha na identificação da soltura séptica de uma prótese tende a levar a maus resultados quando da revisão e colocação de novo implante, enquanto o diagnóstico equivocado de infecção, ou a não realização do diagnóstico microbiológico adequado, podem demandar uso desnecessário de antibioticoterapia prolongada e de amplo espectro, além de sucessivas intervenções cirúrgicas.

O índice de falso-negativo das culturas realizadas em pacientes com IPP varia entre sete e 39%, o que ocorre por questões como o uso de antibioticoterapia recente, erros na coleta e preservação das amostras no centro cirúrgico, falhas no transporte e processamento do material no laboratório de microbiologia ou, ainda, pela presença de organismos não

cultiváveis ou protegidos pelo biofilme.^{12,13}

Dentre as técnicas para se obter o diagnóstico microbiológico, a mais disponível é o cultivo, em meio sólido, do líquido sinovial obtido por artrocentese ou de amostras do tecido periprotético, retiradas quando da remoção do implante. A possibilidade de obter micro-organismos viáveis para cultura a partir da técnica da sonicação da prótese tem significado avanço considerável na busca pelo diagnóstico microbiológico. Esta técnica é ainda pouco utilizada em nosso país.

Outro método avançado na identificação do agente causador da infecção, realizado sem a necessidade de culturas, é a Reação em Cadeia da Polimerase, ou RCP (PCR "Polymerase Chain Reaction"), igualmente pouco disponível em nosso meio.¹⁴

No presente estudo, comparamos os resultados das culturas microbiológicas, em meio sólido, de fragmentos do tecido periprotético, com o cultivo, em frascos de hemocultura, do líquido oriundo da sonicação do implante removido. Trata-se de estudo prospectivo de análise descritiva a partir de casos diagnosticados como sendo de portadores de IPP. A hipótese do estudo é que o material advindo da sonicação permite maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico microbiológico das IPP.

1.1 Objetivos

O objetivo primário do presente estudo é comparar, em pacientes com diagnóstico de infecção periprotética, os resultados das culturas do tecido periprotético semeado em meio sólido com aqueles do líquido obtido após a sonicação do implante removido, cultivado em frascos de hemocultura e, posteriormente, em placas.

Como objetivo secundário, definir se é possível determinar quais são os pontos anatômicos mais adequados para a coleta do tecido periprotético para cultura microbiológica, visando à positividade do exame, quando da remoção do implante.

2 Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia das artroplastias de joelho e quadril no Brasil e em outros países

É importante que se conheça a real incidência de artroplastias para que se possa estimar o número de casos infectados e, a partir deste número, seja possível a implantação de medidas adequadas de prevenção, diagnóstico e tratamento.

Kiefer (2007) argumenta que, em diferentes países, a necessidade e oportunidade de se fazer uma artroplastia variam e cita, a partir de números fornecidos pelas autoridades de saúde de diversos países da Ásia e Europa, a incidência de 30 a 40 artroplastias para cada 100.000 habitantes na Coreia e no Japão, e de 210 a 220 por 100.000 na Áustria e Alemanha.¹⁵

Kurtz *et al.* (2010) analisam a incidência das artroplastias de quadril em países considerados economicamente desenvolvidos (sete da Europa Ocidental, acrescentados de Canadá e Estados Unidos) e afirmam serem cerca de 131 cirurgias anuais para cada 100.000 habitantes.¹⁶

Novamente, Kurtz *et al.* (2011), em estudo semelhante, envolvendo 17 países desenvolvidos, relatam a incidência de artroplastias de joelho, primárias e de revisão, da ordem de 159 cirurgias para cada 100.000 habitantes, anualmente.¹⁷

A soma das incidências de artroplastias de quadril e joelho leva ao número de, aproximadamente, 290 cirurgias para cada grupo de 100.000 habitantes nestes países.

Maradit Kremers *et al.* (2015) publicam estudo sobre a prevalência de habitantes dos Estados Unidos da América submetidos a estes tipos de artroplastia e concluem que o total foi de 2,3% da população em 2010, algo em torno de sete milhões de habitantes. Estimam que mais de um milhão de americanos são submetidos, anualmente, a cirurgias de substituição de joelho ou quadril, ou seja, incidência acima de 300 cirurgias por 100.000

habitantes.¹⁸

Gomes (2012) cita, em editorial, a inexistência de dados sobre a incidência de artroplastias de joelho e quadril no Brasil, e comenta sobre o projeto de implantação do Registro Nacional de Artroplastias iniciado 2007.¹⁹

No entanto, a Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia (SBOT), em sua página eletrônica, afirma que, até 2015, não havia um banco de dados disponível a respeito.²⁰

Pesquisa realizada para a elaboração deste trabalho nos arquivos eletrônicos do DATASUS, que fornece a estatística oficial dos atendimentos no Sistema Único de Saúde (SUS), mostrou que houve 38.330 guias de Autorização de Internação Hospitalar (AIH) para procedimentos de artroplastia de joelho ou quadril, de qualquer tipo, durante o ano de 2014. O número de internações para o mesmo tipo de cirurgia foi de 18.384, segundo o mesmo sistema. Portanto, não houve correlação entre estas autorizações e as internações para realização de artroplastias, pelos mesmos critérios de busca, ou seja, não se pode afirmar que a cirurgia com autorização tenha de fato sido realizada. Por hipótese, caso se utilize um número intermediário entre aqueles coletados junto ao DATASUS nas buscas citadas, é possível que existam entre 20 e 30 mil artroplastias de joelho ou quadril ao ano no Brasil, em pacientes atendidos unicamente pelo SUS.²¹

Dados da Pesquisa Nacional de Saúde realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (PNS do IBGE), em 2013, mostram que 147 milhões, ou 72%, dos cerca de 200 milhões de brasileiros são dependentes exclusivamente do SUS, enquanto que outros 58 milhões de brasileiros são usuários de planos de saúde, contratam um seguro de saúde na forma de reembolso ou se responsabilizam por suas despesas de saúde.²²

As artroplastias de joelho e quadril estão previstas no Rol de Procedimentos, referência básica para a cobertura mínima obrigatória dos planos de saúde privados no Brasil, e editado pela Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS). Pelo fato de haver maior disponibilidade para estas cirurgias aos usuários de planos de saúde, deve-se supor que o

número de procedimentos realizados nesta parcela da população tende a ser consideravelmente maior que naqueles que dependem exclusivamente do SUS.²³

De modo conservador, na hipótese de serem realizadas por volta de 100 cirurgias para cada 100.000 brasileiros portadores de planos de saúde, cerca de 57.000 pacientes estariam sendo submetidos a artroplastias de joelho e quadril anualmente.

Portanto, entre pacientes atendidos por planos de saúde e pelo SUS, é possível supor números próximos a 80.000 artroplastias de joelho e quadril ao ano. Destas, é possível que entre 800 e 4.000 recebam o diagnóstico de IPP anualmente, ao se considerar a incidência entre 1 e 5%. Deve-se considerar que, nos locais de menos recursos e com protocolos menos rígidos de prevenção à infecção hospitalar, estes números podem ser mais elevados.

2.2 Classificações das IPP

Anagnostakos *et al.* (2009) afirmam que o principal objetivo de um sistema de classificação para infecções articulares é possibilitar ao cirurgião ortopédico fazer a diferenciação entre uma infecção aguda ou crônica e poder prever a complexidade do tratamento a ser instituído, além de permitir a comparação futura de condutas entre casos identificados como sendo similares.²⁴

Em vista das diferentes formas de manifestação das IPP, diversos autores têm proposto classificações visando otimizar as opções terapêuticas, sendo a maioria baseada no estudo de Fitzgerald Jr. *et al.* (1977), que analisam 3.215 artroplastias totais de quadril e identificam a ocorrência de infecção periprotética, no plano subfascial, em 42 casos (1,3%). Tomando como parâmetros principais o momento do surgimento dos primeiros sinais clínicos de infecção e as manifestações clínicas dessas, os autores sugerem três diferentes estágios ou apresentações para as IPP:

1. Infecções agudas ou fulminantes, surgidas dentro dos três primeiros meses de pós-operatório, geralmente no primeiro mês, com presença de febre e secreção purulenta;
2. Infecções de aparecimento retardado, com manifestações progressivas de dor e aumento da velocidade de hemossedimentação (VHS), com pouca ou nenhuma reação inflamatória visível, de surgimento entre três e 24 meses após a cirurgia;
3. Infecções tardias, com surgimento após 24 meses da cirurgia, em pacientes que se mantiveram assintomáticos até então e que manifestaram dor aguda, febre e sinais inflamatórios após provável contaminação hematogênica da articulação.²⁵

A hipótese, defendida à época, é que as infecções agudas ocorreriam por contaminação de hematomas subfasciais ou pela progressão de infecções superficiais até os planos profundos, enquanto as infecções de surgimento retardado teriam etiologia variável, desde infecções articulares pré-existentes não diagnosticadas, a presença de cicatrizes e fibrose extensas de procedimentos prévios à artroplastia agindo como barreira insuficiente de proteção aos micro-organismos da pele, ou a contaminação do ambiente da prótese após injeções intramusculares próximas. As infecções tardias seriam compatíveis com contaminação hematogênica.

Tsukayama *et al.* (1996), em trabalho sobre infecção em artroplastia de quadril, afirmam que as propostas de classificação para IPP existentes até então não resultavam em orientação adequada para o tratamento, em especial, sobre a necessidade ou não da remoção do implante. Os autores propõem nova classificação, também baseada no momento do aparecimento dos primeiros sintomas, dividida em apresentação aguda, retardada ou tardia de origem hematogênica, e acrescentam um quarto grupo, aquele de pacientes com soltura diagnosticada no pré-operatório como sendo asséptica, mas cujas culturas intraoperatórias resultavam em resultado positivo. Os autores fazem análise da efetividade do tratamento empregado

em artroplastias totais de quadril para cada tipo de infecção. O diagnóstico foi baseado na presença de coleção purulenta intrarticular e na positividade de duas ou mais culturas microbiológicas para o mesmo micro-organismo ou os mesmos micro-organismos, com o mínimo de cinco amostras de tecido periprotético processadas.²⁶

McPherson *et al.* (2002) sugerem outro sistema de classificação, em que são considerados o fator tempo, que indica infecção aguda ou crônica, o grau de comprometimento local do membro portador do implante, como a presença de cicatrizes, insuficiência vascular, irradiação prévia ou múltiplas incisões, e a condição sistêmica do paciente, com maior gravidade naqueles com idade acima dos 80 anos, em uso de drogas imunossupressoras, etilistas, tabagistas, portadores de neoplasia maligna, desnutridos, diabéticos, entre outras características, de modo similar à classificação proposta por Cierny e Mader para o tratamento cirúrgico das osteomielites. Ao utilizar esta classificação, a estratégia do cirurgião seria direcionada por aspectos individualizados de cada paciente. Deste modo, os casos considerados como de grau A, sem maiores comprometimentos locais ou sistêmicos, permitiriam procedimentos reconstrutivos de maior porte, enquanto aqueles graduados como B, com comprometimento moderado, ou C, com alterações graves, seriam tratados com artroplastias de ressecção, amputações ou antibioticoterapia supressiva.^{27,28}

Tsukayama *et al.* (2003) discutem, novamente, sua classificação para IPP, nos mesmos moldes da sua classificação anterior, agora em estudo com artroplastias de joelho (Tabela 1).²⁹

Tabela 1 - Classificação de Tsukayama para IPP

Tipo de infecção	Características clínicas
I	culturas intraoperatórias positivas em revisão presumidamente asséptica infecção aguda (até 30 dias da cirurgia)
II	A - Superficial B - Profunda
III	Infecção aguda hematogênica
IV	Infecção crônica de aparecimento tardio (após 30 dias da cirurgia)

Trampuz e Zimmerli (2005) propõem uma classificação que agrega a via de contaminação e o momento do início dos sintomas, considerando como precoce ou aguda a infecção com surgimento em até 3 meses.³⁰

Tabela 2 - Classificação de Trampuz e Zimmerli para IPP

Classificação	Característica
Conforme a via de contaminação	
Perioperatório	Inoculação o micro-organismo na ferida cirúrgica durante a cirurgia ou imediatamente após
Hematogênica	Contaminação através da corrente sanguínea ou linfática, a partir de foco a distância
Por contiguidade	Contaminação por meio de foco de infecção adjacente (trauma penetrante, osteomielite prévia, lesões de pele ou partes moles)
Conforme o início dos sintomas após a colocação do implante	
infecção precoce (< 3 meses)	Adquirida durante a cirurgia ou nos primeiros 2 a 4 dias, causada por organismos de alta virulência, como <i>Staphylococcus aureus</i> ou bacilos gram-negativos
Infecção tardia ou de baixo grau (três a 24 meses após a cirurgia)	Adquirida durante a cirurgia e causada por agentes menos virulentos, como <i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> ou <i>Propionibacterium acnes</i>
Infecção tardia (> 24 meses)	Causada por via hematogênica a partir de foco a distância

Horan *et al.* (2008) divulgam os critérios do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC "Centers for Disease Control and Prevention"), agência federal que define normas e conceitos relacionados à saúde pública nos Estados Unidos da América, que restringem a um ano o período no qual, nas cirurgias em que há colocação de implante, a IPP deva ser considerada como tendo origem nosocomial, ou seja, a contaminação se deu à época da cirurgia e por micro-organismos da flora hospitalar.³¹

Este é o critério seguido atualmente pelo Serviço de Infectologia do Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Em publicação recente do CDC (2016), o critério de notificação para as infecções relacionadas a implantes teve seu prazo modificado de um ano para três meses.³²

Lima *et al.* (2013), em revisão, afirmam que, independentemente da classificação, tanto nos quadros agudos como nos tardios de surgimento até um ou dois anos, a maior probabilidade é que o agente infectante seja de origem nosocomial, com a contaminação ocorrendo no intraoperatório ou no pós-operatório imediato. No primeiro caso, de infecções surgidas nos primeiros três meses após a cirurgia, bactérias de maior virulência, como *Staphylococcus aureus*, são mais prevalentes. Nas infecções tardias, identificadas após três meses e antes de 12 ou 24 meses, há maior incidência de agentes de menor virulência e produtores de biofilme, com destaque às bactérias da flora normal da pele, como o *Staphylococcus epidermidis*. Nas infecções de origem hematogênica, o agente etiológico tende a ter origem na comunidade, e o local da infecção à distância sugere o tipo de bactéria causadora. Em infecções dentárias, haveria associação com bacteremia por *Streptococcus viridans* ou bactérias anaeróbias, enquanto infecções de pele estariam associadas ao *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus sp.* As infecções gastrointestinais e genitorurinárias teriam relação com *Enterobacteriaceae*.¹

Jahoda *et al.* (2007) fazem análise retrospectiva dos fatores que levaram à infecção tardia por via hematogênica em um grupo de 229 pacientes e propõem, visando, principalmente, ao médico generalista, que acompanha o paciente no longo prazo, estratégias para a profilaxia da bacteremia quando de procedimentos com risco para tal.³³

Entre os motivos para esta variabilidade da manifestação das IPP, estão a virulência do agente infectante, a resposta do hospedeiro a esse, o modo de contaminação, o local acometido e a formação progressiva de biofilme ao longo do tempo.

2.3 Biofilme

Costerton *et al.* (1994) definem o biofilme como “uma comunidade complexa e estruturada de bactérias imersas em matriz polimérica produzida pelos próprios micro-organismos e aderida a superfícies vivas ou inertes”. A presença de um implante e de micro-organismos na ferida operatória predispõe a formação do biofilme, que pode se formar a partir de um único tipo de micro-organismo ou de vários, ou, ainda, de subpopulações do mesmo agente inicial.³⁴

Zimmerli *et al.* (1982) definem que a presença de uma superfície em que a bactéria possa aderir e iniciar a formação de biofilme, como ocorre nas artroplastias, diminui fortemente a "dose mínima infectante", ou a quantidade do micro-organismo necessário para iniciar uma infecção, em níveis milhares de vezes menores, conforme foi demonstrado em relação ao *Staphylococcus aureus*.³⁵

Southwood *et al.* (1985) divulgam modelo experimental de prótese parcial de quadril em coelhos, em que menos de 10^2 Unidades Formadoras de Colônias (CFU "colony-forming unit") foram necessárias para desencadear a infecção, comparado com mais de 10^4 CFU quando não havia implantes.³⁶

Mukherjee *et al.* (2005), ao estudar o biofilme produzido por fungos, afirmam que, em, ao menos, 65% dos casos de IPP, sua presença influencia o resultado do tratamento. Somente nas infecções agudas sua importância pode ser considerada menor. É fator importante na falha do tratamento de infecções em artroplastias quando a opção do cirurgião é pela manutenção do implante.³⁷

Stewart e Costerton (2001), em artigo publicado na revista Lancet, afirmam que a resistência da bactéria aos antibióticos, quando no interior do biofilme, chega a ser mil vezes maior quando comparado à forma planctônica.³⁸

Donlan e Costerton (2002) afirmam que a dificuldade para se eliminar os micro-organismos imersos na matriz do biofilme é explicada pelo fato

desse se manterem parcialmente protegidos das defesas naturais do hospedeiro e da ação dos agentes antimicrobianos. Isto decorre das características da matriz, que impede a difusão de alguns tipos de antimicrobianos em planos mais profundos, em especial os aminoglicosídeos, e altera o microambiente por meio da diminuição do pH e da pressão parcial de oxigênio (pO_2), do aumento da pressão parcial de gás carbônico (pCO_2) e da diminuição da hidratação, fatores que interferem diretamente na ação dos medicamentos.³⁹

Del Pozo e Patel (2007), em estudo de revisão, acrescentam que também ocorrem alterações no próprio micro-organismo, que diminui seu metabolismo e sua capacidade de síntese de diversas moléculas, assim como altera seu formato, ou fenótipo, da forma livre, denominada planctônica, para a forma séssil. Isto implica em alterações na sua parede celular, o que impede a ação dos antibióticos que agem neste sítio, além da perda da eficiência de outros antimicrobianos que atuam no espaço intracelular, seja no bloqueio do metabolismo bacteriano citoplasmático seja na expressão de proteínas a partir do núcleo celular. Afirmam ainda que “a bactéria aparentemente prefere um estilo de vida sedentário, baseado em uma comunidade aderida a superfícies, a levar uma existência nômade” e citam que o volume total do biofilme é preenchido por 5 a 35% de bactérias, sendo o restante composto pela matriz extracelular.⁴⁰

Atalla *et al.* (2011) descrevem que, uma vez na forma séssil, surgem subgrupos do mesmo agente infectante, fenômeno denominado como Variantes de Pequenas Colônias (SCV "small-colony variants"). Estes subgrupos podem ser vistos como se formassem um organismo multicelular, atuando sinergicamente para se proteger, havendo, com frequência, a troca de genes através de canais de água, o que aumenta ainda mais sua resistência a antibióticos.⁴¹

Sendi *et al.* (2010) citam como exemplo deste mecanismo as variações da *Escherichia coli* encontradas nas IPP.⁴²

Lannergård *et al.* (2008) afirmam que as bactérias presentes na forma SCV são capazes de se manter em estado quiescente no ambiente intracelular, notadamente o *Staphylococcus aureus*.⁴³

2.4 Diagnóstico da IPP

Spangehl *et al.* (1999) divulgam análise prospectiva, em 202 revisões de artroplastia total de quadril, dos fatores que auxiliam no diagnóstico pré e intraoperatório de infecção periprotética. Concluem que o diagnóstico costuma ser de difícil confirmação, tanto pela variabilidade de seus sintomas como pela falta de consenso sobre critérios diagnósticos objetivos, e sugeriram a combinação de testes sanguíneos, da punção articular e do anatomopatológico por congelação no intraoperatório como diretrizes para este diagnóstico.⁴⁴

Parvizi *et al.* (2011) também afirmam, em estudo retrospectivo com 192 revisões de artroplastia total de joelho, que não há um teste isolado que defina a infecção, sendo necessária a combinação de achados clínicos, laboratoriais e de imagem para que se possa evidenciar. Além da confirmação da hipótese de infecção, é necessário, também, o diagnóstico microbiológico, ou seja, a identificação do micro-organismo causador da infecção, único ou múltiplo, e sua susceptibilidade à antibioticoterapia a ser empregada.¹³

Springer e Scuderi (2013) publicam revisão sobre artroplastia total de joelho infectada no qual relatam que os quadros de manifestação clínica aguda, em que estão presentes sinais inflamatórios, dor intensa, febre e secreção, permitem suspeita diagnóstica mais evidente, ao passo que as infecções com manifestações crônicas, em que a dor é insidiosa, não há febre e a presença de fístula é facultativa, geram maiores dificuldades.¹⁴

Parvizi e Gehrke (2013) divulgam os resultados do consenso internacional que envolveu diversos grupos que trabalham com infecção musculoesquelética, com propostas de critérios para o diagnóstico de IPP.

Entre estas organizações, destacam-se a Sociedade de Infecção Musculoesquelética (MSIS "Musculoskeletal Infection Society"), a Sociedade Europeia de Infecção Osteoarticular (EBJIS "European Bone and Joint Infection Society") e a Academia Americana de Cirurgiões Ortopédicos (AAOS "American Academy of Orthopaedic Surgeons"), tendo havido a participação de representantes da Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia.⁴⁵

Neste consenso, a IPP é definida quando:

- Duas culturas periprotéticas são positivas para organismos fenotipicamente idênticos OU
- Há trajeto fistuloso identificado OU
- Existem três dos seguintes critérios ditos "menores":
 - Aumento da Proteína C Reativa (PCR) e da Velocidade de Hemossedimentação (VHS),
 - Aumento da contagem de leucócitos no líquido sinovial,
 - Aumento da porcentagem de neutrófilos polimorfonucleares no líquido sinovial,
 - Um único resultado de cultura positiva obtido a partir do líquido sinovial.

No mesmo consenso internacional, no entanto, foi considerado que o julgamento clínico não deva ser desprezado, mesmo não havendo sinais objetivos de infecção. A possibilidade deste diagnóstico persiste no paciente com histórico de dor ou rigidez articular e onde um ou mais dos seguintes fatos seja(m) relatado(s) ou observado(s):

- Bacteremia recente,
- Cirurgias múltiplas na mesma articulação,
- Antecedente de IPP,
- Comorbidades associadas a imunodeficiências (diabetes mellitus, artropatias inflamatórias, desnutrição),

- Fatores de risco para bacteremia (uso de drogas endovenosas, psoríase, estase venosa crônica, úlcera de pele),
- Infecção superficial no local da cirurgia,
- Deiscência da ferida cirúrgica,
- Excesso de calor, vermelhidão ou edema na cirurgia,
- Sinais radiográficos de soltura do implante, osteólise, elevação subperiosteal ou evidência de trajetos fistulosos transcorticais.

Osmon *et al.* (2013) divulgam os critérios de outra entidade, a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA "Infectious Diseases Society of America"), cujos pontos divergem em alguns aspectos quando comparados aos do consenso citado. Um dos pontos não considerados pela IDSA é a contagem de células do líquido sinovial. Outra interpretação é considerar como critério maior a presença de pus intrarticular, o que foi removido pelo consenso internacional de 2013 após a constatação de que há outros motivos para a formação de líquido com aspecto purulento, como é a reação aos detritos provenientes da prótese com superfície metal-metal, mesmo em situação asséptica.⁴⁶

Mikhael *et al.* (2009) publicam relato de dois casos em que a presença de material com aspecto purulento no intraoperatório de revisão de prótese de quadril com superfície metal-metal se mostrou asséptico, e concluíram que se tratava de reação a partículas geradas pelo atrito na superfície de contato dos implantes.⁴⁷

2.4.1 Testes sanguíneos

Schinsky *et al.* (2008) divulgam estudo com 225 revisões de artroplastia total de quadril em que avaliam a eficácia de um algoritmo de triagem para os casos de infecção e concluem que os exames do sangue periférico são úteis na determinação da IPP. A contagem de células brancas tem baixa sensibilidade, ao redor de 45%, sendo de pouca valia, enquanto

que os exames de atividade inflamatória inespecífica Proteína C-Reativa e Velocidade de Hemossedimentação fazem parte da maioria dos algoritmos diagnósticos para IPP. São de custo baixo e ampla disponibilidade, e geram resultados em pouco tempo. Apresentam sensibilidade em torno de 85%, sendo o PCR um pouco mais sensível que o VHS. A especificidade de ambos gira ao redor dos 75%. No entanto, a associação de ambos apresenta valor preditivo negativo acima de 90%, o que os tornam exames significativos na tentativa de excluir o diagnóstico de infecção.⁴⁸

Berbari *et al.* (2010) relatam, em revisão sistemática, conclusões semelhantes sobre a validade das provas inflamatórias na detecção pré-operatória de IPP, e consideram que a dosagem sérica da interleucina-6 (IL-6) apresenta a maior acurácia diagnóstica, seguida da PCR e do VHS, embora ressalve que poucos estudos foram dedicados a este marcador.⁴⁹

2.4.2 Exames de imagem

2.4.2.1 Radiografia simples

Lima *et al.* (2013) afirmam que a radiografia simples é capaz de mostrar soltura ou osteólise em casos de IPP por meio do aumento da radiotransparência na interface cimento-osso (nas próteses cimentadas) ou na interface metal-osso (na prótese cimentada), embora não seja possível distinguir com precisão entre infecção e outras causas de soltura, como problemas mecânicos ou doenças granulomatosas.¹

2.4.2.2 Tomografia computadorizada

Cyteval e Bourdon (2012), em revisão, afirmam que a melhora dos métodos de redução de artefatos nas imagens das tomografias computadorizadas, como o aumento da voltagem e amperagem, a restrição

da colimação e o posicionamento do paciente com o eixo da prótese alinhado, tem permitido melhor avaliação das estruturas ósseas e de partes moles, como osteólise, reação periosteal e abscessos em contato com o implante.⁵⁰

2.4.2.3 Ressonância magnética

He *et al.* (2014) analisam achados de imagem que, apesar dos artefatos existentes, auxiliam no diagnóstico de infecção a partir da ressonância magnética. Entre eles, a existência de líquido articular, edema extracapsular, destruição óssea e linfadenopatia reativa, citando que estas alterações, quando presentes simultaneamente, aumentam o valor preditivo positivo de infecção.⁵¹

2.4.2.4 Medicina nuclear

Palestro (2014), em revisão crítica da literatura, publicada sobre a evolução das imagens produzidas pela medicina nuclear nas artroplastias, cita resultados controversos nos diversos trabalhos analisados. Em relação à cintilografia trifásica com Tecnécio-99, o exame mais realizado realça a constatação de que é possível haver hipercaptação periprotética por até três anos após a cirurgia em articulações assintomáticas, principalmente no joelho, com acurácia para as complicações em artroplastias dos membros inferiores entre 50 e 70%. Considera este exame válido principalmente quando o resultado é normal, sugerindo baixa probabilidade de alterações relacionadas ao implante. Afirma que a cintilografia com gálio-67 tem demonstrado menor acurácia do que se supunha nos trabalhos iniciais para diagnóstico de infecção e tem sido menos utilizada, com maior indicação nas infecções da coluna vertebral. Palestro também revisa diversos trabalhos utilizando cintilografia com leucócitos marcados e conclui que este método,

embora demonstre sensibilidade entre 66 e 92%, e especificidade próxima a 100%, tem aplicabilidade reduzida devido à dificuldade de interpretação, além de custos elevados e logística complexa para sua realização. Por fim, avalia que a tomografia por emissão de pósitrons (PET "positron emission tomography") utilizando fluorodesoxiglicose radioativa (FDG "fluorodeoxyglucose"), elemento análogo à glicose, ainda demonstra resultados controversos nos estudos clínicos, principalmente no que diz respeito à acurácia. Este fato, aliado ao seu alto custo, impede que a técnica seja atualmente empregada com maior frequência no diagnóstico das IPP.⁵²

Kwee *et al.* (2008), em metanálise sobre o emprego da PET-FDG no diagnóstico de IPP, relatam ter encontrado sensibilidade de 82% e especificidade de 87% nos trabalhos analisados, e afirmam que a indicação deste exame na rotina clínica de investigação para infecções em próteses ainda está por ser definida.⁵³

2.4.3 Análise citológica do líquido sinovial

O líquido sinovial obtido a partir da artrocentese é passível de análise bioquímica, citológica, que inclui contagem de células e suas porcentagens, e como fonte para a realização de culturas. Em especial, a contagem de células e as análises microbiológicas têm maior significado no diagnóstico das IPP. Aqui, revisamos estudos sobre a citologia, e, no capítulo sobre diagnóstico microbiológico, abordamos o cultivo do líquido sinovial.

Trampuz *et al.* (2004) publicam estudo prospectivo com 133 revisões de artroplastia total de joelho, nas quais 34 tiveram diagnóstico de infecção, e concluem que a contagem de leucócitos acima de 1.700 por microlitro teria sensibilidade de 94% e especificidade de 88% para infecção, enquanto a porcentagem de neutrófilos acima de 65% teria sensibilidade de 97% e especificidade de 98%.⁵⁴

Ghanem *et al.* (2008) definem que 1.100 leucócitos por microlitro do líquido sinovial como indicação de infecção, com sensibilidade e especificidade ao redor de 90% para artroplastias totais do joelho. A proporção de neutrófilos acima de 64% teria sensibilidade e especificidade de 95%.⁵⁵

Bedair *et al.* (2011), em estudo sobre as alterações do líquido sinovial nas infecções agudas, sugerem que a quantidade mínima de células a ser considerada como suspeita de infecção, após 17 dias de cirurgia, seria de 27.800 leucócitos por microlitro, com sensibilidade de 84% e especificidade de 99%, e observam que a proporção de leucócitos apresenta menor relevância, uma vez que a contagem de 89% destas células teve especificidade de apenas 69%.⁵⁶

Schinsky *et al.* (2008), em estudo com artroplastias de quadril, já citado anteriormente, sugerem que o número mínimo de leucócitos no líquido sinovial indicativo de IPP seria de 3.000 por microlitro, desde que o paciente apresente elevados níveis de VHS e PCR.⁴⁸

Cipriano *et al.* (2012), em extenso estudo com revisão de artroplastias de joelho e quadril em 1.113 pacientes (1.179 cirurgias), analisam a contagem de leucócitos a partir da qual o diagnóstico de IPP seria provável. Houve 165 diagnósticos de IPP, e os resultados, sem que fossem relatadas diferenças entre joelho e quadril, sugeriram que valores acima de 3.450 leucócitos por microlitro, com proporção de leucócitos acima de 75%, teriam maior valor diagnóstico de infecção, com sensibilidade de 91% e especificidade de 93%.⁵⁷

2.4.4 Análise histológica do tecido periprotético

A maioria dos estudos de revisão sobre IPP cita a análise histológica do tecido periprotético como ferramenta diagnóstica de infecção.

Mirra *et al.* (1976) estudam 34 artroplastias de joelho e quadril com diagnóstico de infecção, dentro dos critérios da época, que valorizavam,

basicamente, sinais radiográficos de soltura do implante, dor intratável e instabilidade articular. Ao analisar fragmentos do tecido periprotético, relatam ter detectado alta correlação entre a presença de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e infecção.⁵⁸

Novo trabalho de Mirra *et al.* (1982) define como critério para diagnóstico de infecção a presença de cinco ou mais PMN por campo em aumento de 400 vezes (HPF "high-power field").⁵⁹

Morawietz *et al.* (2006) propõem um consenso histopatológico para interpretação da membrana de interface osso-prótese ou osso-cimento, em caso de soltura do implante. Propõem quatro tipos de alteração, sendo que a denominada tipo II, com a presença de tecido de granulação com PMN, células plasmáticas e pouco ou nenhum produto do desgaste do implante seria compatível com infecção.⁶⁰

Tsaras *et al.* (2012) publicam revisão sistemática com metanálise em que foi possível localizar 26 estudos envolvendo pacientes submetidos à revisão de artroplastia do joelho ou quadril nos quais foram descritos os resultados do exame anatomopatológico por congelação, a partir de fragmentos de tecido periprotético obtidos no intraoperatório. Em 15 estudos, os autores consideraram o achado de cinco PMN por HPF como indicativo de infecção, em seis o número de corte considerado foi de 10 PMN por HPF, e os demais usaram números variados para o diagnóstico. Os autores concluem que este método é válido no diagnóstico de IPP, porém há necessidade de se definir melhor qual o número de células a ser considerado como indicativo da condição.⁶¹

Janz *et al.* (2013) demonstram que biópsia para contagem de PMN deve ser obtida da membrana existente entre o implante e o osso, com sensibilidade de 83% e especificidade de 98%.⁶²

Wu *et al.* (2014) analisam 158 IPP em 152 pacientes com o objetivo de definir qual seria o número necessário de amostras com a detecção de cinco ou mais PMN para a confirmação do diagnóstico de infecção. Concluem que a coleta em cinco diferentes pontos é o ideal, e que basta um destes pontos apresentar cinco ou mais PMN para que esteja estabelecido o diagnóstico.⁶³

2.5 Diagnóstico microbiológico

Na busca do diagnóstico microbiológico, vários métodos podem ser empregados:

- Testes sorológicos,
- Cultura do líquido sinovial,
- Cultura do tecido periprotético coletado por biópsia percutânea ou quando da remoção do implante,
- Cultura do líquido submetido à sonicação do material explantado,
- Diagnóstico molecular, sem a realização de culturas, por meio da multiplicação de fragmentos nucleares do micro-organismo infectante pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (RCP).

Corvec *et al.* (2012) citam, ainda, novas tecnologias em desenvolvimento, como microcalorimetria, hibridização *in situ* fluorescente com microscopia do biofilme e testes sorológicos diversos. Na microcalorimetria, é realizada a identificação rápida do agente por meio da análise do calor gerado pelo crescimento e metabolismo bacteriano na cultura. Na técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH "fluorescence *in situ* hybridization"), é possível identificar ligações de substâncias fluorescentes a áreas específicas do núcleo da bactéria e, com microscopia de varredura, visualizar o biofilme. Esta técnica permite também a avaliação do arranjo arquitetônico do micro-organismo no interior do biofilme. Todas estas novas técnicas não apresentam, ainda, aplicação clínica.⁶⁴

Gollwitzer *et al.* (2013) comparam, em estudo prospectivo sobre testes sorológicos, com casuística de 15 pacientes portadores de IPP de quadril e 20 casos com solturas assépticas como controle, o valor de diversos peptídeos antimicrobianos e citocinas próinflamatórias na diferenciação entre solturas sépticas e assépticas. Estes marcadores, ainda sem aplicação na rotina clínica, foram dosados no líquido sinovial e na corrente sanguínea

de pacientes com infecção confirmada a partir de parâmetros microbiológicos e histopatológicos. Os resultados com os peptídeos antimicrobianos HBD-3 (β -defensina humana-3) e LL-37 (catelicidina LL-37) no líquido sinovial foram estatisticamente significantes da presença de infecção.⁶⁵

No presente estudo, discutimos de modo mais detalhado a identificação do agente etiológico por meio de culturas e pela técnica de RCP.

2.5.1 Cultura do líquido sinovial

Qu *et al.* (2013) publicam metanálise sobre culturas do líquido sinovial em suspeitas de IPP, envolvendo 3.332 pacientes, em que afirmam que a sensibilidade global resultante foi de 72% e a especificidade de 95%. Os autores fazem a recomendação para a semeadura seja feita em frascos de hemocultura e que haja interrupção da antibioticoterapia ao menos duas semanas antes da punção. Concluem que a aspiração pré-operatória tem sensibilidade entre moderada e alta, e a especificidade muito alta.⁶⁶

Enayatollahi e Parvizi (2015) realçam, em revisão, a sugestão do Consenso Internacional de 2013 que recomenda a não infusão de soro fisiológico ou qualquer outro fluido no caso de uma punção negativa da articulação em busca do diagnóstico de IPP, o que não é incomum ocorrer.⁶⁷

2.5.2 Cultura de tecido periprotético

Atkins *et al.* (1998), em estudo prospectivo com o objetivo de aprimorar o diagnóstico de IPP, envolvendo 334 revisões de artroplastia de quadril ou joelho, analisam o número ideal de fragmentos periprotéticos a serem submetidos à cultura para que se obtenha um resultado confiável visando ao diagnóstico microbiológico. Os autores utilizam um modelo matemático de

expansão binomial, em que as probabilidades de todas as combinações de resultados positivos e falso-positivos entre uma e sete amostras são testadas. Do mesmo modo, foi calculado qual seria o número adequado de resultados com culturas do mesmo patógeno para maior precisão diagnóstica. Concluem que o número indicado de amostras seja de cinco ou seis, e que três ou mais resultados com o mesmo patógeno são fortes preditores de infecção. Como conclusão secundária, observam baixa sensibilidade no teste de Gram, com índices entre 6 e 12% de sensibilidade.⁶⁸

Schäfer *et al.* (2008), analisando IPP de joelho e quadril em que foram coletadas cinco amostras de tecido periprotético para cultura, consideram que duas ou mais com crescimento desse, ou mesmos, micro-organismos indicam fortemente o diagnóstico microbiológico. No mesmo estudo, sugerem que o tempo de incubação prolongado até 14 dias seria uma estratégia válida para a identificação de alguns agentes etiológicos de crescimento mais lento, como o *Propionibacterium sp.*⁶⁹

Shannon *et al.* (2013), no entanto, não encontram diferença no tempo de incubação na identificação do *Propionibacterium sp*, e indicam que diferentes meios de cultura podem otimizar o resultado. Os autores obtiveram positividade para o *Propionibacterium sp* com sete dias de incubação utilizando o caldo de tioglicolato.⁷⁰

Parvizi *et al.* (2011) divulgam o resultado do grupo de discussão da MSIS sobre IPP e incorporam as mesmas orientações, ou seja, coleta entre cinco e seis fragmentos, e interpretação de que duas ou mais culturas positivas para esse, ou esses micro-organismos são necessárias para definir o diagnóstico microbiológico na IPP.⁷¹

Estas mesmas orientações são reforçadas por Osmon *et al.* (2013), ao relatarem as diretrizes do IDSA, e Parvizi e Gehrke (2013), que publicam os resultados do Consenso Internacional sobre IPP.^{45,46}

Aaron e Patel (2014), em revisão, citam que, no caso da obtenção de um único resultado positivo em cinco ou seis amostras de cultura, este pode ser valorizado quando o organismo identificado é considerado virulento,

como o *Staphylococcus aureus* ou um bacilo aeróbio Gram-negativo. Para espécies de baixa virulência, afirmam ser frequente a interpretação de que se trate de um contaminante, exceto na situação na qual o mesmo micro-organismo também é identificado por outro método, como na cultura do líquido sinovial ou do líquido de sonicação.⁷²

Hughes *et al.* (2011) comparam de modo prospectivo, quatro meios de cultura para o diagnóstico microbiológico de IPP a partir de tecido periprotético biopsiado quando da remoção dos implantes: sólido, que inclui placas de ágar sangue e ágar chocolate, caldo de Robertson com carne cozida ("cooked meat"), utilizado de rotina no serviço do autor, caldo para anaeróbios fastidiosos e frascos de hemocultura BD BACTEC automático, aeróbio e anaeróbio. A partir de protocolo de diagnóstico que considerou todos os pacientes como portadores de infecção, os quatro meios de cultura testados demonstraram alta especificidade (97 a 100%), enquanto a sensibilidade foi de 30% para as placas, 83% para o meio de Robertson, 57% para o caldo de anaeróbios fastidiosos e 87% para os frascos de hemocultura. Os resultados demonstraram que o processamento automático dos frascos de hemocultura BD BACTEC tiveram elevada sensibilidade e especificidade, com baixo tempo até a positividade ser detectada. Somente os meios sólidos tiveram tempos mais curtos até positivarem, porém com baixa sensibilidade. Os autores também sugerem que seja usado o frasco BD BACTEC de adultos, que permitem a injeção de até 10 ml de volume, ao invés do pediátrico utilizado em outros estudos, cujo volume injetado é de 1 ml, tendo, portanto, potencialmente menor número de micro-organismos cultiváveis.⁷³

Larsen *et al.* (2012), em revisão sistemática, analisam as modificações e melhorias nos métodos de cultura envolvendo IPP, entre 1995 e 2012, com especial atenção quanto ao transporte e à preparação das amostras, dos meios e dos métodos de cultura. Afirmam que são escassos os trabalhos sobre como preservar as amostras para o transporte entre o centro cirúrgico e o laboratório de microbiologia, não permitindo conclusões. Também observam que métodos de preparo de partes moles para cultura

são pouco estudados, não havendo trabalhos comparativos a respeito. São citados três métodos: fragmentar em pequenas partes com bisturi, moer e triturar com pilão ou utilizar o equipamento Stomacher (marca registrada), aparelho com pequenas pás que esmagam e homogeneizam o tecido para análise, contido em pequenos sacos. Em relação aos meios de cultura, afirmam que não há estudos que avaliem de modo formal a performance de diferentes meios sólidos no diagnóstico microbiológico das IPP.⁷⁴

2.5.3 Sonicação do implante removido

Tunney *et al.* (1998) analisam, de modo inovador, a aplicação de ultrassom nos implantes removidos em 120 revisões de artroplastia de quadril, em que tiveram por objetivo identificar a presença de bactérias aderidas na forma de biofilme. Neste processo, denominado sonicação, os autores aplicam ondas com frequência de 50 kHz, durante 5 minutos, em bolsas plásticas estéreis preenchidas com solução de Ringer lactato e contendo o implante. O líquido resultante da sonicação é, então, semeado em placas de cultura para observação de eventual crescimento bacteriano. Os autores relatam 26 casos positivos e 94 negativos. Dos 26 casos com culturas positivas, havia registro hospitalar de apenas 18 pacientes, dos quais 12 apresentavam suspeita de soltura asséptica ou instabilidade e seis de infecção. Nos 94 pacientes com culturas positivas, dados de prontuário médico foram obtidos de 52, dos quais 50 apresentavam suspeita de soltura asséptica ou instabilidade e dois tinham suspeita de soltura séptica. Ainda que a definição do diagnóstico de IPP tenha sido imprecisa na casuística e os registros hospitalares tenham se mostrado incompletos, os resultados divulgados se mostraram promissores.⁷⁵

Trampuz *et al.* (2003) definem a sonicação como um método físico que envolve a aplicação de ultrassom no meio líquido estéril em que está imersa a prótese. Seu modo de ação é pela emissão de ondas sonoras que criam áreas com gradiente de pressão em torno do implante, previamente retirado

do paciente e acondicionado em condições estéreis, formando microbolhas que se rompem durante a variação da pressão local. A energia liberada na ruptura destas microbolhas é capaz de soltar o biofilme da superfície do implante, e, deste modo, disponibilizar os micro-organismos no meio líquido circunjacente.⁷⁶

Trampuz *et al.* (2006) sugerem que o uso de bolsas plásticas, como utilizado por Tunney *et al.* em seu estudo pioneiro, pode diminuir a especificidade da sonicação, pela possibilidade de contaminação devido a vazamentos. Isto levou ao desenvolvimento da técnica que utiliza recipientes rígidos em polipropileno, menos sujeitos a este problema.⁷⁷

Trampuz *et al.* (2007), em trabalho publicado no The New England Journal of Medicine, descrevem 331 revisões de artroplastia do joelho ou quadril, sendo 79 com diagnóstico de infecção. Os autores comparam culturas obtidas pelo método da sonicação, semeadas em meio sólido, e culturas periprotéticas. Trazem como inovação a vortização, técnica na qual o recipiente contendo o implante é submetido a um turbilhonamento, na forma de redemoinho, realizado por equipamento específico. Utilizando recipientes rígidos e a vortização, foi obtida sensibilidade de 60,8% para o tecido periprotético e 78,5% para o líquido sonicado, e especificidade de 99,2 e 98,8%, respectivamente.¹²

Monsen *et al.* (2009), em trabalho experimental com diferentes parâmetros para a sonicação, afirmam que a duração e intensidade da emissão do ultrassom, além da temperatura ambiente durante o uso do sonicador, são parâmetros críticos para o cultivo das bactérias. Sugerem que se use o sonicador a 40 kHz por 7 minutos em torno de 22 graus Celsius para otimizar, principalmente, a viabilidade das bactérias Gram-negativas, que são praticamente erradicadas caso a sonicação atinja 15 minutos ou se o ambiente estiver acima de 35 graus Celsius. Também afirmam que a imersão completa ou parcial do recipiente com o implante na bacia do sonicador não modifica o resultado final, que o líquido no qual o implante permanece imerso pode ser o soro fisiológico ou similar, e aconselham o uso de frascos com parede de vidro para melhorar a

condução do ultrassom.⁷⁸

Portillo *et al.* (2013) afirmam que a vortização da prótese já aumenta, isoladamente, a sensibilidade da cultura mesmo sem a aplicação da sonicação, podendo se tornar opção quando o equipamento e treinamento para a utilização do sonicador não estiverem disponíveis.⁷⁹

Vergidis *et al.* (2011) trazem outro aprimoramento no método, que consiste na utilização de centrifugação após a sonicação e a vortização, com o objetivo de concentrar a bactéria removida do biofilme. Este método tem sido utilizado em diversos protocolos atualmente.⁸⁰

Tande e Patel (2014), em revisão, discutem o método de semeadura e incubação do líquido sonicado em meios sólidos (placas de ágar), em que a contagem do número de CFU define o resultado como positivo ou negativo. Existe variação na literatura sobre qual o número mínimo de CFU para a amostra ser considerada positiva. Nos líquidos sonicados sem utilização posterior de centrífugas, portanto não concentrados, o valor dos diferentes estudos variou entre um e 50 CFU por mililitro, sendo que a maioria desses utiliza entre um e 10 CFU por mililitro. Ao se usar a centrifugação, este valor passa a ser de 200 CFU por mililitro. A maioria dos protocolos trabalha com o líquido sonicado em culturas com placas. Também afirmam que a semeadura do líquido sonicado em caldos de cultura (tioglicolato) não é aconselhável devido à dificuldade de distinguir entre patógenos e contaminantes, devido ao processo de coleta, transporte e processamento ser mais sujeito a falhas. No mesmo estudo, argumentam quanto ao alto risco de contaminação na simples imersão do implante em meios de cultura ou sua rolagem em placas de ágar, e não recomendam esta prática.⁷²

Yano *et al.* (2014) descrevem o uso, no Brasil, da sonicação em 185 implantes removidos de osteossínteses consideradas infectadas, incluindo placas, hastes intramedulares e fixações de coluna vertebral. Os autores relatam a semeadura em meio sólido de amostras do tecido ao redor do implante e do líquido obtido pela sonicação dos materiais; e observam sensibilidade das culturas em 90,4% nos casos de sonicação, e 56,8% nas culturas de tecido. Este é o único estudo publicado de origem brasileira no

qual identificamos o uso da sonicação em implantes ortopédicos.⁸¹

Shen *et al.* (2015) comparam os resultados de 50 pacientes com IPP, 42% dos quais receberam antibióticos até 14 dias antes da cirurgia de remoção do implante, em que foi feita a incubação em frascos de hemocultura BD BACTEC do líquido produzido pela sonicação e do líquido sinovial extraído quando da cirurgia. Demonstraram baixa sensibilidade do líquido sinovial cultivado, com 64% para pacientes sem antibioticoterapia recente e 52% nos pacientes que vinham recebendo antibióticos. Já a incubação do líquido sonicado nos frascos BD BACTEC detectaram vários outros patógenos não identificados nas culturas do líquido sinovial, principalmente nos pacientes com uso prévio de antibioticoterapia. Nestes, a sensibilidade foi de 81%, enquanto que, nos pacientes sem antibioticoterapia prévia, a sensibilidade foi de 88%. Os autores sugerem que a utilização de frascos de hemocultura BD BACTEC para incubar o líquido da sonicação é um método inovador e promissor de cultura nos casos de IPP, não tendo identificado na literatura o uso desta técnica anteriormente.⁸²

Portillo *et al.* (2015) analisam implantes removidos de 75 pacientes, dos quais 45 (60%) são próteses articulares e os demais 30 (40%) são referidos como materiais de osteossíntese. Descrevem 39 (52%) pacientes como portadores de infecção. Na busca por diagnóstico microbiológico, os autores comparam a semeadura do líquido sonicado em frascos de hemocultura com a cultura convencional do tecido periprotético e do líquido da sonicação semeados diretamente em meio sólido. Descrevem sensibilidade de 100% nas culturas do líquido da sonicação semeado diretamente em frascos de hemocultura e 87% nos pacientes com este líquido semeado em placas, e 59% na cultura do tecido periprotético. Os autores citam ainda que, nos pacientes com relato de antibioticoterapia recente, a sensibilidade se manteve em 100% nas amostras do líquido sonicado cultivado em frascos de hemocultura, baixando para 77% do líquido sonicado semeado diretamente em placas e para 55% nas amostras de tecido periprotético. Este estudo relata método que se assemelha ao proposto em nosso trabalho.⁸³

2.5.4 Diagnóstico molecular

Mullis *et al.* (1983), em descoberta que rendeu o prêmio Nobel de Química para o autor principal, divulgam o método denominado Reação em Cadeia da Polimerase, ou RCP, em que a replicação de sequências do ácido desoxirribonucleico (DNA "deoxyribonucleic acid") e ácido ribonucleico (RNA "ribonucleic acid") da célula permite a identificação da presença de micro-organismos em uma amostra, mesmo sem a realização de culturas. O método consiste na desnaturação do DNA por aquecimento, seguido da religação dos fragmentos nucleicos, em temperaturas específicas, a dois oligonucleotídeos sintéticos denominados *primers*, que atuam como iniciadores da síntese de DNA. Estes *primers* são pequenas fitas com cerca de 20 das quatro bases nitrogenadas, ou desoxinucleotídeos, constituintes do DNA (adenina, guanina, citosina e timina – no RNA, a timina é substituída pela uracila), que se ligam ao início da sequência de DNA a ser multiplicada. Segue-se uma fase de polimerização, em que a ação de uma enzima isolada da bactéria *Thermus aquaticus*, descrita como Taq DNA polimerase, e a alternância de temperaturas quentes e frias, permite a formação de múltiplas cópias do fragmento original. A repetição deste ciclo, que dura cinco minutos, aumenta a quantidade de DNA disponível para a leitura. São realizados entre 30 e 60 ciclos (após 36 ciclos, até 68 bilhões de cópias estarão disponíveis) e o material obtido é, em seguida, separado por eletroforese e submetido a coloração, ou cromatografia, e leitura final.⁸⁴

Higuchi *et al.* (1992) desenvolvem um aprimoramento da técnica da RCP, ao acrescentar um produto fluorescente ao meio que permite maior controle do ritmo de amplificação das sequências nucleares, permitindo a automação e a difusão da técnica. Esta técnica tem sido denominada RCP em tempo real ("Real-time PCR").⁸⁵

Gomez *et al.* (2012) discutem a utilização da RCP no diagnóstico de IPP nos casos em que é realizada a sonicação no implante e citam a dificuldade da interpretação dos resultados, pela dificuldade de se obter altos índices de especificidade para o diagnóstico microbiológico. O aumento

do número de ciclos está ligado à perda de especificidade, uma vez que quantidades mínimas de material genético de micro-organismos, eventualmente, não relacionados à infecção podem ser detectados deste modo.⁸⁶

Krischna e Cunnion (2012) discutem o diagnóstico molecular e afirmam que o fato de se identificar a presença de material nucleico de um micro-organismo não afasta a necessidade de métodos fenotípicos de identificação (culturas), testes bioquímicos e sorológicos para se ter um diagnóstico mais completo, além do fato da RCP não permitir testes de susceptibilidade a antimicrobianos.⁸⁷

Cazavane *et al.* (2013) divulgam estudo com 434 pacientes, dos quais 144 com diagnóstico de IPP, e comparam a sensibilidade e a especificidade entre três tipos de análise para o diagnóstico microbiológico: a cultura de tecido periprotético, a cultura do líquido sonicado e a RCP do líquido sonicado. O resultado para sensibilidade foi de 70, 73 e 77%, respectivamente, e especificidade de 98% nos três grupos. A maior sensibilidade da PCR do líquido sonicado foi considerada estatisticamente significativa para a cultura de tecido periprotético, mas não para a cultura do líquido sonicado.⁸⁸

3 Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Este é um estudo de análise descritiva, prospectivo e comparativo, entre dois métodos de diagnóstico microbiológico em infecções periprotéticas de joelho ou quadril, visando à superioridade de um método sobre o outro. Não houve intervenção direta no tratamento dos pacientes, tendo sido utilizadas para análise amostras do tecido periprotético e o implante removido durante revisões de artroplastias.

3.2 Aprovação na comissão de ética e termo de consentimento

O presente estudo foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número de protocolo IOT 871 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Protocolo de Pesquisa número 347/11.

Anexo A - Aprovação do projeto pela Comissão Científica do IOT

Anexo B - Aprovação do estudo pelo CET da FMUSP

O paciente, ou seu responsável, leu ou ouviu a leitura, realizada pelo pesquisador, ou por um dos médicos integrantes da pesquisa, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e que permitiu sua participação neste estudo, sendo que a eventual recusa em participar não lhe traria qualquer prejuízo em seu tratamento previsto. Este documento foi assinado e arquivado.

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.3 Financiamento do projeto

Este estudo teve financiamento integral aprovado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). O Termo de Outorga e Aceitação de Auxílios corresponde ao Processo 2012/51162-8.

3.4 Critérios de seleção

3.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo pacientes esqueleticamente maduros que apresentassem o diagnóstico de infecção periprotética no joelho ou quadril, sem restrição quanto ao tipo de implante (primário, de revisão ou endoprótese, cimentado ou não cimentado), e com, no mínimo, 90 dias decorridos desde a implantação da prótese.

A primeira triagem, quanto ao risco da presença de infecção (alto ou baixo), seguiu as recomendações da Academia Americana de Cirurgiões Ortopédicos publicados em 2010⁸⁹, presentes na Tabela 3:

Tabela 3 - Riscos associados à presença de IPP – critérios da AAOS

Sintomas	Fatores de risco suportados por evidência	Fatores de risco suportados por consenso	Achados de exame físico	Outros
Alto risco de infecção		Dor e/ou rigidez articular E ao menos um ou mais: 1) Fatores de risco 2) Achados de exame físico 3) Soltura precoce/osteólise do implante, detectado por radiografia		
Baixa probabilidade de infecção		Dor e/ou rigidez articular e NENHUM dos seguintes itens: 1) Fatores de risco 2) Achados de exame físico 3) Soltura precoce/osteólise do implante, detectado por radiografia		
Dor Rigidez	Antecedente de infecção (joelho) Infecção superficial da ferida cirúrgica (quadril e joelho) Obesidade (quadril) Longo tempo cirúrgico (acima de 2,5 horas para quadril e joelho) Antecedente de imunossupressão (joelho)	Bacteremia ou candidemia recente (há menos de 1 ano) Antecedente de infecção periprotética em outra articulação (infecção metacrônica) Alterações cutâneas: psoríase, celulite crônica, linfedema, estase venosa, úlceras Uso de drogas endovenosas Infecção ou colonização recente (menos de 3 anos) por MRSA Infecção ativa à distância	Calor, edema, vermelhidão, derrame articular Fístula associada à articulação	Soltura e/ou osteólise precoce (menos que 5 anos) detectada na radiografia

Uma vez admitido o alto risco de IPP, o diagnóstico prévio de infecção era confirmado se houvesse os seguintes achados, selecionados a partir dos critérios do Consenso Internacional de 2013⁴⁵:

- Presença de trajeto fistuloso identificado ou
- Presença de três dos seguintes critérios:
 - Aumento dos níveis de PCR e VHS em, ao menos, duas vezes o limite máximo normal;
 - Aumento da contagem de leucócitos no líquido sinovial;
 - Aumento da porcentagem de neutrófilos polimorfonucleares no líquido sinovial;

- Um único resultado de cultura positiva obtido a partir do líquido sinovial.

Foi considerado, ainda, como fator de confirmação diagnóstica a concomitância entre o aumento do PCR e do VHS em pacientes sem doença inflamatória e com sinais radiográficos de soltura do implante, osteólise ou elevação periosteal.

3.4.2 Critérios de não inclusão

Foram considerados não aptos a participar do estudo, após a primeira triagem sobre o risco de infecção, os pacientes que não aceitassem participar desse ou que se recusassem a assinar o TCLE.

3.4.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes cujos materiais a serem processados apresentaram uma ou mais das seguintes intercorrências:

1. A contaminação das amostras em qualquer fase entre a coleta e o processamento;
2. O não recebimento das amostras pelo Laboratório de Microbiologia em São Paulo, até seis horas após a coleta dos materiais no centro cirúrgico;
3. O não processamento do material pelo Laboratório de Microbiologia, por qualquer motivo.

3.5 Características e locação do estudo

O presente estudo foi realizado com materiais obtidos a partir de cirurgias realizadas em sete hospitais de diferentes cidades do Estado de São Paulo (São Paulo, Jundiaí, Campinas, Americana e Santa Bárbara d'Oeste), sempre com a presença do médico pesquisador ou de médico previamente treinado quanto ao método proposto. O processamento das amostras foi realizado pelo Laboratório de Microbiologia (LM) da Divisão do Laboratório Central (DLC) do HC-FMUSP, sob coordenação da Dra. Flávia Rossi.

Os pacientes foram incluídos e os materiais obtidos entre outubro de 2014 e dezembro de 2015, e as culturas processadas e analisadas até fevereiro de 2016.

3.6 Inclusão e preenchimento da ficha de coleta de dados

Após o primeiro contato telefônico realizado entre o cirurgião e o pesquisador do estudo, em todos os casos, era discutida a viabilidade de inclusão a partir dos critérios de risco para infecção anteriormente citados. Uma vez confirmado o potencial paciente, era programada logística que envolvia o transporte do aparelho de sonicação e dos frascos adequados para o recebimento da amostra até o hospital no qual seria a cirurgia, no dia e horário previamente agendado. Uma vez confirmado o diagnóstico de infecção pelos critérios já citados, assinado o TCLE e autorizado o início da cirurgia pelo anestesista, era comunicado o Laboratório de Microbiologia do DLC do HC-FMUSP sobre o caso, e se iniciava o prazo de 6 horas até a entrega das amostras para processamento. As informações para o preenchimento da ficha de coleta de dados foram obtidas junto ao prontuário médico, com o paciente ou familiares, sendo documentados as seguintes informações (Anexo A):

- dados de identificação: nome, Registro Geral (RG), Registro Hospitalar (RH);
- dados demográficos: idade, data de nascimento, gênero;
- data e motivo da realização da artroplastia que evoluiu com infecção;
- tipo de implante: primário ou de revisão;
- localização do implante: quadril ou joelho;
- lateralidade;
- tempo entre a cirurgia e o diagnóstico da infecção;
- comorbidades em tratamento, hábito do tabagismo;
- utilização e tipo de antibioticoterapia nos últimos 15 dias;
- presença de fístula;
- realização prévia de artrocentese e, quando realizada, resultados de citologia e cultura microbiológica;
- resultados dos exames laboratoriais de atividade inflamatória (VHS e PCR);
- condição radiográfica atual do implante, se fixo ou com soltura/osteólise/reação periosteal.

3.7 Procedimentos para obtenção, transporte e processamento das amostras

Sem a interferência do pesquisador ou equipe, o cirurgião do paciente manteve a sua rotina no preparo para a cirurgia, sendo apenas alertado que, a partir da abertura da cápsula articular, seria necessária a coleta progressiva de amostras, como descrito a seguir.

3.7.1 Coleta do tecido periprotético

Foi padronizada a retirada de seis fragmentos, sendo dois de partes moles e quatro ósseos, com tamanhos entre 0,5 e 2 cm de diâmetro, a partir dos seguintes pontos:

- cápsula articular em sua face voltada para o espaço intrarticular;
- membrana periprotética, definido como material que se forma na interface cimento-osso, nas próteses cimentadas, e metal-osso, nas artroplastias não cimentadas;
- osso esponjoso em contato com a face lateral do implante proximal (súpero-lateral do acetábulo no quadril, côndilo lateral do fêmur no joelho);
- osso esponjoso em contato com a face medial do implante proximal (súpero-medial do acetábulo no quadril, côndilo medial do fêmur no joelho);
- osso esponjoso em contato com a face lateral do implante distal (região do grande trocânter no quadril, planalto lateral da tíbia no joelho);
- osso esponjoso em contato com a face medial do implante distal (região do pequeno trocânter no quadril, planalto medial da tíbia no joelho).

Na falha óssea de maior magnitude, a área de osso esponjoso mais próxima ao local pré-determinado foi escolhida para ser biopsiada. Todos os fragmentos foram colocados em frascos cilíndricos de vidro, com 2 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento, tampa plástica de rosca, preenchidos até sua metade com caldo de tioglicolato. Os frascos foram previamente identificados com os dados do paciente e o material a ser coletado, e numerados de um a seis, respectivamente para cada fragmento supracitado. Uma vez imerso o fragmento, a tampa foi rosqueada firmemente e realizada a agitação manual para completa embebição do material coletado. O frasco

foi mantido na posição vertical e acondicionado no recipiente para transporte.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 1 – Frasco com tioglicolato contendo amostras de tecido periprotético



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 2 – Frascos com tecido periprotético no recipiente para transporte

3.7.2 Coleta e sonicação do implante

Os componentes da prótese, incluindo as partes do cimento, quando existente, com mais de 2 cm de diâmetro, foram colocados em recipiente de polipropileno rígido, de boca larga, submetido previamente à esterilização em vapor e plasma de peróxido de hidrogênio associada à emissão de micro-ondas ("STERRAD", Johnson & Johnson, Estados Unidos), método adequado para a esterilização de materiais termossensíveis. A sequência de eventos a partir deste momento constituiu em:

- abertura do recipiente pelo instrumentador da cirurgia, no momento da remoção do primeiro componente protético pelo cirurgião;
- preenchimento desse com solução de Ringer lactato em temperatura ambiente até completar metade de sua capacidade;
- imersão dos componentes protéticos;
- oclusão do recipiente com sua tampa e checagem da não existência de vazamentos;
- entrega do recipiente ao pesquisador, para a sonicação.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 3 - Componentes da prótese no recipiente para sonicação



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 4 - Recipiente com os implantes na bacia do sonicador

O procedimento de sonicação seguiu a técnica proposta por Trampuz *et al.*,¹² com algumas modificações, e consistiu nos seguintes passos, realizados dentro do centro cirúrgico, sem, no entanto, interferir com a cirurgia principal:

- Agitação vigorosa do recipiente contendo o implante por meio de 20 movimentos verticais de amplitude em torno de 20 cm para cada movimento;
- colocação deste frasco no interior da bacia do sonicador, modelo BRANSONIC 5800 (*Branson Ultrasonics Corporation, Emerson Electric Company*, Estados Unidos), preenchido com água deionizada em temperatura ambiente até a marca sinalizada no aparelho, a 5 cm do seu topo;
- realização da sonicação durante cinco minutos, na frequência de 40 ± 2 kHz;
- retirada do recipiente e nova agitação de 20 movimentos, nos mesmos moldes;
- remoção da tampa e exposição do líquido sonicado;

- com paramentação cirúrgica, realizada retirada, com três seringas hipodérmicas de 20 ml, de três amostras do líquido, 10 ml em cada seringa;
- com agulhas individuais, inserido o conteúdo das seringas nos três frascos de hemocultura BD BACTEC previamente disponibilizados, identificados e numerados de um a três, na ordem para pesquisa de bactérias aeróbias, (frasco um, BD BACTEC Plus Aerobic/F), bactérias anaeróbias (frasco dois, BD BACTEC Plus Anaerobic/F), e para micobactérias e fungos (frasco três, BD BACTEC Myco/F); inseridos 10 ml em cada frasco para aeróbio e anaeróbio, e 5 ml no frasco para micobactéria/fungo, conforme orientação do fabricante;
- acondicionamento dos três frascos de hemocultura no recipiente preparado para transporte;
- Os materiais remanescentes do processo de sonicação, incluindo o líquido e o implante, são desprezados segundo a rotina de cada centro cirúrgico.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 5 - Sonicador Bransonic 5800



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 6 - Frascos de hemocultura BD Bactec



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 7 - Frasco de hemocultura com líquido da sonicção

3.7.3 Transporte das amostras

O material coletado, já acondicionado nos frascos de hemocultura e tubos de vidro com tioglicolato, foi enviado à Sessão de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central do Instituto Central do HC-FMUSP.

Nas cirurgias realizadas no IOT do HC-FMUSP, o material foi levado diretamente até o laboratório por funcionários do hospital dentro das primeiras duas horas após a coleta. Nas cirurgias realizadas em outros hospitais, o transporte dos materiais foi realizado por empresas autorizadas para este tipo de serviço, cujas normas estão previstas na Resolução número 420, de 12 de fevereiro de 2004, da Agência Nacional de Transportes Terrestres (ANTT), do Ministério dos Transportes.⁹⁰

O tempo limite decorrido entre a finalização do processo de coleta do material na sala de cirurgia, e o recebimento e processamento inicial dos frascos pelo laboratório foi estabelecido em seis horas.

3.7.4 Processamento das amostras

Todas as amostras foram recepcionadas pelo Laboratório de Microbiologia em que foi realizada, de imediato, a identificação e separação para os processamentos, em separado, do tecido periprotético, imerso em tioglicolato (TIO), e do líquido produzido na sonicação, coletado em frascos de hemocultura. Para ambos, foram realizadas as culturas para investigação de micro-organismos aeróbios (CAER) e anaeróbios (CANA), micobactérias (CMIC) e fungos (CFUN). Seguiu-se o protocolo do laboratório, como descrito a seguir.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 8 – Recebimento de amostras pelo laboratório de microbiologia

3.7.4.1 *Cultura do tecido periprotético*

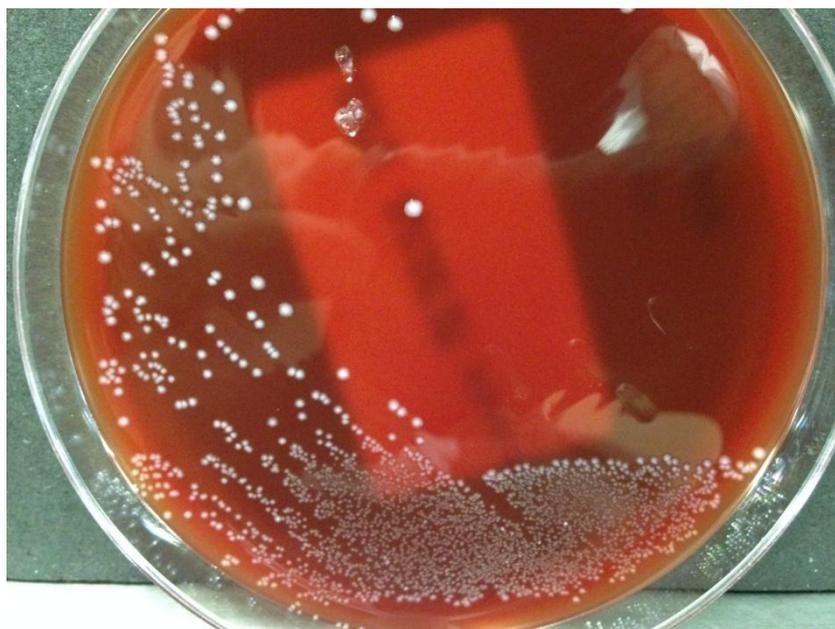
3.7.4.1.1 *Cultura aeróbia*

Os frascos com tioglicolato contendo tecido periprotético são mantidos em estufa bacteriológica entre 35° e 37° Celsius por cinco dias, inertes, com observação a cada 24 horas para checagem de turbidez, que é a turvação do meio de cultura.

Na ausência de crescimento de micro-organismos nos tubos de TIO, ou seja, o meio se mantendo límpido e translúcido, é realizada nova incubação nas mesmas condições descritas por mais quatro dias, com leituras diárias. Após este período, não havendo mudança no aspecto, o resultado final é liberado como cultura negativa.

A constatação de turvação nos tubos de TIO, indicadora do crescimento de micro-organismos, geralmente no primeiro ou segundo dia de incubação na estufa, leva à semeadura deste, para o melhor isolamento das colônias, nas placas de Ágar Sangue (AS) e Ágar MacConkey (MC), em quatro quadrantes. Em seguida, estas placas são incubadas por 18 a 24 horas, na temperatura entre 35° e 37° Celsius, AS em estufa com atmosfera de gás carbônico (CO₂) e MC em estufa bacteriológica. Em paralelo à inoculação do TIO nas placas, é confeccionado um esfregaço em lâmina para Coloração de Gram, utilizado para correlacionar a bacterioscopia com a cultura.

Por definição, AS é um meio rico e não seletivo, com diferencial para a hemólise, ou seja, a formação de halos pela ocorrência lise sanguínea sinaliza que há crescimento bacteriano. Nele, se desenvolve a maioria dos Gram-negativos e Gram-positivos, além de fungos filamentosos, ou bolores, e leveduras, exceto algumas espécies de bactérias mais exigentes, denominados fastidiosas, como o *Haemophilus spp.* O MC é um meio seletivo para Gram-negativo e com diferencial para a utilização de lactose, o que permite a identificação de bactérias que digerem este elemento e, com isto, modificam o meio por meio da alteração do seu pH. O cristal violeta, ou violeta de metila, inibe o crescimento de micro-organismos Gram-positivos, especialmente o *Enterococcus* e o *Staphylococcus*. Como exceção, eventualmente, podem crescer *Enterococcus*, *Candida* e *Bacillus*.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 9 – Placa de ágar sangue com crescimento de *Enterococcus sp*



Fonte: Arquivo pessoal do autor

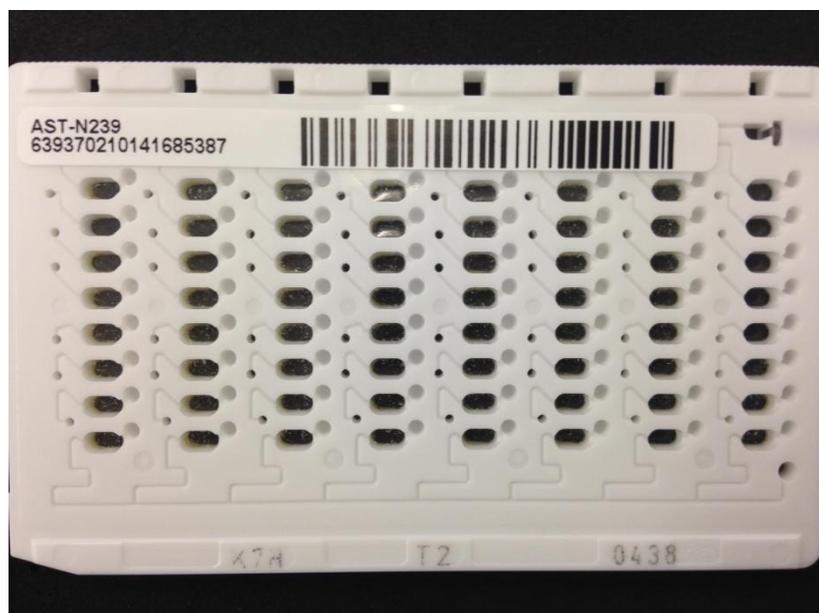
Figura 10 – Placa de ágar MacConkey com crescimento de *Escherichia coli*

Não havendo crescimento nas placas após 18 a 24 horas, é realizada nova incubação dessas por mais 24 horas. Na ausência de crescimento de micro-organismos, após 48 horas de incubação, o Gram é observado e, no caso de apontar a presença de bactérias, indica o envio do respectivo TIO para o Setor de Anaeróbios, enquanto é liberado o resultado final da cultura

aeróbia como sendo negativa. Esta cultura também é liberada como negativa quando no Gram não são observadas bactérias.

Ao se constatar crescimento de micro-organismos na nova incubação, são aplicados critérios morfotintoriais que avaliam o formato e o tipo das colônias e a coloração obtida pelo método de Gram, para a diferenciação entre bactérias e fungos.

A identificação definitiva dos micro-organismos, bactérias e fungos, é realizada pela confecção de amostras, denominadas "spots", colocadas em placas específicas, ou "slides", que, por sua vez, são postas no equipamento VITEK MS (bioMérieux, França), que é um sistema rápido de identificação de micro-organismos que utiliza o método de espectrometria de massa por ionização/dessorção a laser (MALDI – TOF MS "matrix assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry"). Os espectros obtidos no aparelho são comparados ao banco de dados do equipamento.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 11 – Placa para colocação de amostras para uso no equipamento VITEK MS



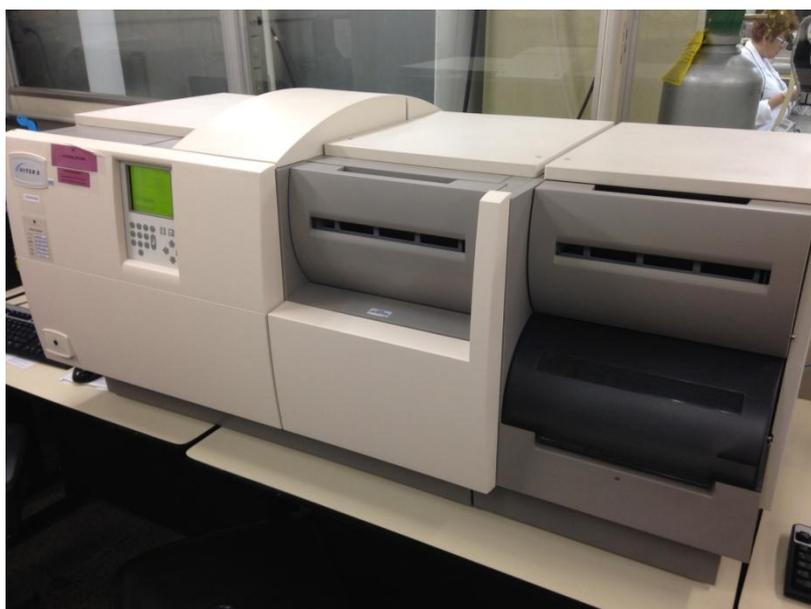
Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 12 – Equipamento VITEK MS para identificação de micro-organismos

No caso de fungos filamentosos, a identificação é realizada por microscopia e microcultivo em Ágar Batata pelo Setor de Fungos, sendo deste a responsabilidade pela liberação do laudo final.

Após a identificação dos micro-organismos, os testes de sensibilidade a antimicrobianos são realizados, quando aplicável por meio do sistema automatizado VITEK 2 XL (bioMérieux, França), que possui um sistema de detecção óptica capazes de medir alterações discretas do crescimento bacteriano. Este sistema utiliza cartões compactos de plástico com reagentes que contêm antimicrobianos em um formato de 64 poços, permitindo, desta forma, detectar a resposta do micro-organismo a dezenas de diferentes antimicrobianos. O Vitek 2 XL emprega monitorização turbidimétrica do crescimento microbiano durante o período de incubação.

Os cartões permitem o teste de suscetibilidade para Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras. A média de tempo para a obtenção dos resultados é de quatro a dez horas para bactérias e um pouco superior para o grupo de leveduras.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

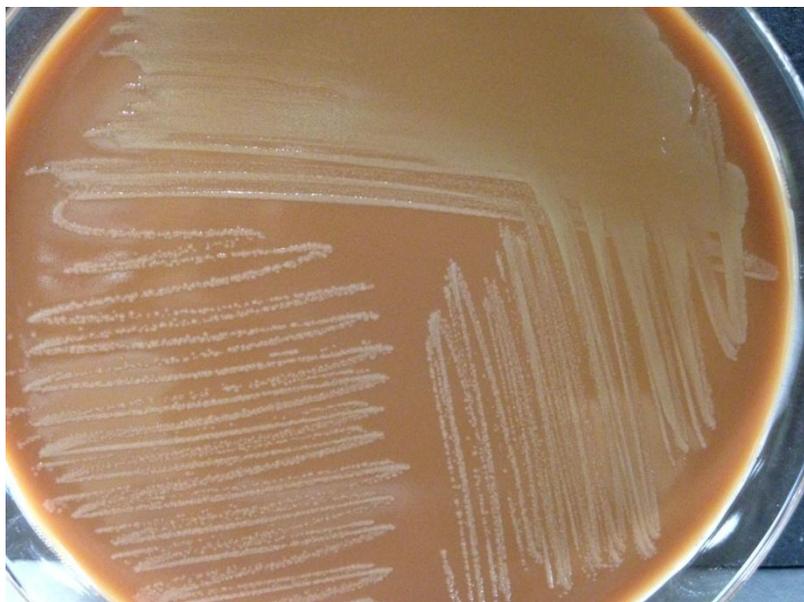
Figura 13 – Equipamento VITEK 2 XL para testes de sensibilidade a antimicrobianos

Os testes de sensibilidade são padronizados seguindo as diretrizes do "Clinical & Laboratory Standards Institute" (CLSI), instituição norte-americana sem fins lucrativos que define padrões para a medicina laboratorial.

3.7.4.1.2 Cultura anaeróbia

Os tubos de TIO para cultura de anaeróbios e aeróbios facultativos seguem o mesmo protocolo de incubação da cultura aeróbia, sendo que, na ausência de crescimento de micro-organismos, é realizada a incubação por mais sete dias, antes de liberar o resultado final da cultura anaeróbia como negativa.

Os tubos de TIO com crescimento, em que é observada a turvação do meio, são semeados em placas de Ágar Sangue para Anaeróbios (ASANA) e Ágar Chocolate (COX), e realizado o teste de aerotolerância. Também um esfregaço em lâmina para Coloração de Gram é feito neste momento. As placas são incubadas por 48 horas, a temperatura entre 35° e 37° Celsius, COX em estufa com atmosfera de CO₂ e o ASANA, com sistema gerador de atmosfera de anaerobiose e em jarra de anaerobiose, na estufa bacteriológica.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 14 – Placa de ágar chocolate com crescimento de *Haemophilus influenzae*

Jarras de anaerobiose são dispositivos de plástico, impermeáveis a gás, que podem ser usados como incubadora para um número limitado de culturas que requerem atmosferas com baixa tensão de oxigênio em relação ao ar. O oxigênio é removido da atmosfera destas câmaras por meios químicos obtidos comercialmente. Os sistemas geradores de atmosferas de anaerobiose são envelopes contendo ácido ascórbico, que não necessitam de adição de água para obtenção de atmosfera desejada.

O ASANA é um meio enriquecido com vitamina K, hemina bovina e extrato de levedura, elementos que favorecem, em atmosferas especiais, o crescimento de anaeróbios. O COX é um meio rico e não seletivo que permite o crescimento da grande maioria das bactérias aeróbias e facultativas. Quando incubado em CO₂, dá suporte também ao crescimento dos microaerófilos e permite o crescimento de bactérias fastidiosas.

Após o período de incubação, as placas são examinadas para verificar se houve crescimento ou não correlacionando com o Gram. Todos os morfotipos observados no Gram devem coincidir com aqueles isolados na placa primária, seguindo como descrito abaixo:

- ASANA com crescimento de colônia pura e teste de aerotolerância (COX) positivo, liberado resultado final como cultura negativa.
- ASANA com crescimento de colônia pura e teste de aerotolerância (COX) negativo, realizado um esfregaço para coloração de Gram e realizada a identificação automatizada do micro-organismo no equipamento VITEK MS.

3.7.4.1.3 *Cultura de fungos*

Os tubos de TIO com crescimento são semeados em tubos com meio de cultura Sabouraud (SAB). Estes são incubados em estufa bacteriológica a temperatura de 30^o Celsius, por 30 dias, sendo sua leitura com periodicidade semanal. O SAB é um meio com diversos nutrientes que favorecem o crescimento de diversos fungos leveduriformes e filamentosos.

Os tubos de SAB que não apresentam crescimento de colônias sugestivas de leveduras e/ou fungos filamentosos até o prazo final de incubação são liberados como cultura de fungos negativa.

As colônias sugestivas de leveduras são semeadas em Ágar Cromocandida e, posteriormente, identificadas por metodologia automatizada por meio do equipamento VITEK MS e os fungos filamentosos

têm sua identificação realizada por microscopia (lâmina durex) e microcultivo em Ágar Batata.

3.7.4.1.4 Cultura de micobactérias

Uma alíquota de 2 ml é tomada dos tubos de TIO com crescimento e transferida para um novo tubo estéril, em que é submetida a um processo de digestão e descontaminação que tem como objetivo a liquefação de debrís orgânicos e eliminação de micro-organismos contaminantes com crescimento mais rápido que possam prejudicar a recuperação da micobactéria.

Esta alíquota tratada é, então, semeada em um tubo de Löwenstein Jensen (LJ) e incubada na temperatura entre 35° a 37° Celsius, por oito semanas. As leituras são realizadas a cada 24 horas nos primeiros três dias, depois somente no sétimo dia e, após isto, uma vez por semana até o término do protocolo de incubação, de 42 dias. A base do meio de LJ é constituída por ovos integrais, o que permite amplo crescimento das micobactérias.

As culturas que não apresentam crescimento de colônias sugestivas de micobactérias até o final do período de incubação são liberadas como cultura de micobactérias negativa.

Colônias suspeitas de micobactérias são confirmadas obrigatoriamente com a realização de esfregaço em lâmina submetidas à coloração de Ziehl Neelsen e identificadas por suas características macroscópicas, como a morfologia da colônia, a velocidade de crescimento e o pigmento, e microscópicas. Também são realizados testes fenotípicos, pelo método imunocromatográfico TB Ag MPT 64 (Teste "Bioeasy"), que é um teste qualitativo de identificação imunocromatográfica rápida para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* que utiliza anticorpo monoclonal anti-MPT64, e, ainda, o Teste de Inibição de Crescimento em Meio de Löwenstein-Jensen com ácido paranitrobenzoico (PNB).

3.7.4.2 Cultura do líquido resultante da sonicação

Os frascos, ou balões, de hemocultura BACTEC Aeróbio Plus (BAER), BACTEC Anaeróbio Plus (BANA) e BACTEC Myco F/Lytic (MYCOF) contendo o líquido sonicado são colocados no equipamento BD BACTEC FX (Becton, *Dickinson and Company*, Estados Unidos) para incubação e monitoramento.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 15 – Equipamento BD Bactec FX para processamento dos frascos de hemocultura contendo o líquido da sonicação

Este aparelho mantém o frasco em constante agitação na temperatura entre 33,5° e 36,5° Celsius, promovendo, desta forma, condições ideais para o desenvolvimento de micro-organismos, caso existam na amostra. O crescimento bacteriano, quando presente, leva à metabolização dos nutrientes do meio de cultura, o que libera CO₂ no meio. Um corante no sensor, presente no fundo do frasco, reage com CO₂ e modula a quantidade de luz que é absorvida. Fotodetectores em cada estação do equipamento medem o nível de fluorescência correspondente à quantidade de CO₂ liberada pelos micro-organismos. Esta fluorescência é medida e interpretada pelo sistema de acordo com parâmetros de positividade previamente

programados no equipamento, acusando a presença ou não de micro-organismos na amostra.

Em geral, o crescimento de micro-organismos aeróbios e anaeróbios é detectado em até 24 a 48 horas, sendo que o protocolo para estes frascos, BAER e BANA, prevê até cinco dias de incubação. No frasco para micobactérias e fungo, MYCOF, também é possível ser detectado crescimento precoce, embora a incubação deva ser mantida, em não havendo positividade, até o prazo final de 42 dias definido pelo fabricante.

Após os cinco dias de incubação dos frascos aeróbio e anaeróbio, não havendo positividade, é liberado o resultado como cultura aeróbia e aneróbia negativas. O resultado negativo, igualmente, é emitido para os frascos de cultura de micobactérias e fungos após o final do processo de incubação de 42 dias.

Os frascos sugestivos de crescimento bacteriano detectados e sinalizados são retirados de acordo com as instruções do fabricante, processados com luvas estéreis dentro de ambiente com fluxo laminar, em condições assépticas.

Uma alíquota é retirada com seringa do frasco BAER e semeada em placas AS, MC e COX, além de se confeccionar esfregaço em lâmina para a coloração de Gram. Para o frasco BANA, uma alíquota é semeada em ASANA e COX, e esfregaço em lâmina para coloração de Gram também é confeccionado.

A incubação e interpretação das placas semeadas após o período de incubação, assim como a identificação e teste de sensibilidade dos micro-organismos isolados, seguem os mesmos critérios utilizados para a cultura aeróbia e anaeróbia do tecido periprotético.

Para o frasco MYCOF, é tomada alíquota 10 mL e colocada em tubo cônico estéril, de 15 ml ou 50 ml, e centrifugada por 20 minutos a 3.500 rotações por minuto. O sobrenadante é desprezado e o sedimento utilizado para confeccionar dois esfregaços em lâmina, um para coloração de Ziehl Neelsen e outro para coloração de Gram, sendo o restante do sedimento utilizado para subcultivo em LJ e SAB.

O LJ é incubado por 30 dias, a partir da data do sinalizado como positivo pelo equipamento, em estufa bacteriológica entre 35° e 37° Celsius. É realizado o mesmo protocolo de observação do crescimento bacteriano e identificação utilizados para cultura de micobactérias do tecido periprotético, com um período de incubação de 30 dias, podendo ser prorrogado por mais 30 dias na ausência de crescimento bacteriano.

O SAB é incubado por 20 dias, a partir da data do sinalizado como positivo pelo equipamento, em estufa bacteriológica a 30° Celsius. São realizadas leituras semanais até completar 20 dias de incubação e seguida a mesma conduta para interpretação, identificação e liberação de resultados da cultura de fungos em TIO.

3.8 Análise estatística

Após verificação da distribuição dos dados por meio do Teste de Shapiro Wilk, as variáveis contínuas foram apresentadas por média (\pm desvio padrão) ou mediana (amplitude), quando apropriado. Para variáveis categóricas, os dados foram apresentados por frequências de ocorrência absolutas e relativas. As frequências de ocorrência dos dados descritivos foram analisadas por meio de Testes Chi-quadrado.

A sensibilidade dos métodos de diagnóstico de infecção foi calculada por meio de tabelas de contingência 2 x 2, e as comparações pareadas entre os valores de sensibilidade obtidos pelos diferentes métodos de cultura microbiológica das diversas amostras foram analisadas pelo Teste de McNemar. Isto foi realizado para a cultura do fluído de sonicação e dos fragmentos de cápsula, membrana periprotética, osso proximal lateral, osso proximal medial, osso distal lateral e osso distal medial. Adicionalmente, foram aplicados Testes Chi-quadrado 2 x 2 ou Teste Exato de Fisher 2 x 2 quando apropriado, para analisar possíveis associações entre os dados de caracterização da amostra (gênero, tipo de artroplastia, localização da extração, lateralidade, antibioticoterapia recente, presença de fístula,

artrocentese com leucocitose e artrocentese com cultura positiva) e o diagnóstico de infecção por cultura do fluido de sonicação ou cultura de diferentes tecidos.

A ocorrência dos micro-organismos identificados por ambos os métodos de diagnóstico de infecção foi comparada por testes Chi-quadrado. Em todas as análises, foi utilizado o *software* PASW statistic 18.0 (SPSS Inc., Chicago, USA), adotando-se nível de significância (α) de 5% ($P < 0,05$).

O poder estatístico da amostra, de 75%, foi calculado pelo *software* G-Power 3.1.9.2 (Franz Faul, *Universitat Kiel, Germany*), considerando o design do estudo para desigualdade de proporções entre amostras pareadas (Teste de McNemar), assumindo taxa de erro do tipo 1 = 5%, razão de odds = 4 como estimativa do tamanho do efeito, e diferença mediana para os valores de sensibilidade entre os métodos de diagnóstico de infecção equivalente a 55%, conforme observado no estudo.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Recrutamento

O recrutamento de pacientes teve início em outubro de 2014, com o fim do processo de importação do aparelho de sonicação, e finalizado em dezembro de 2015. O último resultado de cultura analisado foi liberado após 42 dias da última cirurgia, em fevereiro de 2016.

Foram recebidos neste período 125 comunicados sobre o agendamento de cirurgias que envolviam a retirada de próteses articulares de joelho ou quadril, passíveis para a triagem do estudo, dos quais 30 foram efetivamente incluídos. Destes, 13 foram casos de São Paulo, 11 de Campinas, três de Santa Bárbara d'Oeste, dois de Jundiaí e um de Americana. Em todos, foi possível obter as seis amostras de tecido periprotético e o líquido obtido após a sonicação do implante, e realizados os procedimentos propostos, sem perda de casos ou amostras.

Em todos os casos, os resultados da VHS e do PCR estavam, ao menos, duas vezes acima do limite normal. Pelo fato dos diversos serviços utilizarem diferentes parâmetros na interpretação destes exames, optamos por não fazer a descrição detalhada dos seus resultados.

4.2 Caracterização da amostra

Não foram observadas diferenças significativas entre as proporções dos sujeitos que compuseram a amostra em relação ao gênero, tipo de artroplastia, localização do implante, lateralidade e antibioticoterapia recente ($P > 0,05$, Tabela 4). Entretanto, foi observada maior proporção de sujeitos com presença de fístula (73,3 %), de casos nos quais não houve realização de artrocentese para análise citológica (90,0%) e de pacientes nos quais não

foi feita a artrocentese para cultura microbiológica (93,3 %). (P < 0,05, Tabela 1).

Tabela 4 – Características dos sujeitos estudados

Característica	Valores/Ocorrência	P Valor^a
Idade [média (± desvio padrão)] (anos)	67 (± 11)	-----
Gênero [No. (%)]		
Mulheres	18 (60,0 %)	0,273
Homens	12 (40,0 %)	
Patologia Primária Articular [No. (%)]		
Artrose	18 (60,0 %)	-----
Osteonecrose	4 (13,3 %)	
Displasia Acetabular	1 (3,3 %)	
Artrite reumatoide	3 (10,0 %)	
Trauma/Fratura	4 (13,3 %)	
Tipo de Artroplastia [No. (%)]		
Revisão	10 (33,3 %)	0,068
Primária	20 (66,7 %)	
Localização do Implante [No. (%)]		
Joelho	17 (56,7 %)	0,465
Quadril	13 (43,3 %)	
Lateralidade [No. (%)]		
Direita	20 (66,7 %)	0,068
Esquerda	10 (33,3 %)	
Antibioticoterapia Recente [No. (%)]		
Sim	17 (56,7 %)	0,465
Não	13 (43,3 %)	
Tempo entre a Cirurgia e Diagnóstico de Infecção [mediana (amplitude)] (meses)	10 (3-60)	-----
Fatores Diagnósticos [No. (%)]		
<i>Presença de Fístula</i>		
Sim	22 (73,3 %)	0,011
Não	8 (26,7 %)	
<i>Artrocentese para citologia</i>		
Sim	3 (10,0 %)	< 0,001
Não	27 (90,0 %)	
<i>Artrocentese para cultura microbiológica</i>		
Sim	2 (6,7 %)	< 0,001
Não	28 (93,3 %)	
<i>Alterações Radiográficas</i>		
Sim	15 (50,0 %)	1
Não	15 (50,0 %)	

^a Valores de P para Teste Chi-quadrado ou Teste Exato de Fisher, quando apropriado.

4.3 Sensibilidade do diagnóstico de infecção

4.3.1 Comparação entre a cultura do líquido de sonicação e a cultura do tecido periprotético

Foi observada maior sensibilidade do método de cultura do fluido de sonicação (86,7%) para o diagnóstico de infecção comparado ao método de cultura de tecido a partir de cápsula (43,3%), membrana periprotética (53,3%), osso proximal lateral (30,0%), osso proximal medial (30,0%), osso distal lateral (33,3%) e osso distal medial (26,7%) ($P < 0,05$, Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação do diagnóstico de sensibilidade para infecção entre cultura do fluido de sonicação e cultura de diferentes tecidos

Cultura do Fluido de Sonicação	Cultura de Tecido					
	Cápsula	Membrana Periprotética	Osso Proximal Lateral	Osso Proximal Medial	Osso Distal Lateral	Osso Distal Medial
86,7%	43,3%	53,3%*	30,0%	30,0%	33,3%	26,7%
Diferença ^a (%)	43,3%	33,3%	56,7%	56,7%	53,3%	60,0%
IC 95% Dif	22,5-59,3%	11,6-51,4%	34,2-71,2%	34,2-71,2%	31,3-68,3%	36,4-74,0%
P Valor ^b	< 0,001	0,009	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

^a Diferença percentual entre o diagnóstico de sensibilidade para cultura do fluido de sonicação e cultura de diferentes tecidos.

^b Valor de P para a comparação dos valores de sensibilidade entre os meios de cultura do fluido de sonicação e os diferentes métodos de cultura de tecido pelo Teste McNemar.

* Diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores de sensibilidade em relação à cultura da membrana periprotética pelo Teste McNemar.

IC 95% Dif : Intervalo de confiança com 95% de confiança para a diferença nos valores de sensibilidade entre os meios de cultura.

4.3.2 Comparação entre os diferentes sítios de coleta do tecido periprotético

Foi observada maior sensibilidade do método de cultura de tecido realizado a partir de fragmentos da membrana periprotética para o diagnóstico de infecção, quando comparada aos métodos de cultura do osso proximal lateral ($P = 0,039$), osso proximal medial ($P = 0,016$) e osso distal medial ($P = 0,021$). Não houve diferença entre as demais comparações ($P > 0,05$, Tabela 2).

4.4 Associação entre as características da amostra e o diagnóstico de infecção

Não foram observadas associações significativas entre gênero, localização do implante, lateralidade, presença de fístula, artrocentese para pesquisa de leucocitose ou para cultura microbiológica, e ambos os métodos de diagnóstico de infecção ($P > 0,05$).

Foram observadas associações significativas entre antibioticoterapia recente e o diagnóstico de infecção por meio das culturas de tecido do osso distal lateral ($P = 0,007$) e medial ($P = 0,049$), mostrando menor proporção de diagnóstico positivo de infecção nos sujeitos que fizeram uso prévio e recente de antibiótico (Tabela 6).

Tabela 6 - Associação entre antibioticoterapia recente e diagnóstico de infecção por meio de cultura do fluido de sonicação

Antibioticoterapia Recente	Cultura do Fluido de Sonicação		Cultura de Tecido Cápsula		Cultura de Tecido Membrana Periprotéica	
	Sem Infecção	Infecção	Sem Infecção	Infecção	Sem Infecção	Infecção
	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)
Não	0,0 (0,0)	13,0 (100,0)	6,0 (46,2)	7,0 (53,8)	5,0 (38,5)	8,0 (61,5)
Sim	4,0 (23,5)	13,0 (76,5)	11,0 (64,7)	6,0 (35,3)	9,0 (52,9)	8,0 (47,1)
P Valor^a	P = 0,113		P = 0,460		P = 0,484	
Antibioticoterapia Recente	Cultura de Tecido Osso Proximal Lateral		Cultura de Tecido Osso Proximal Medial		Cultura de Tecido Osso Distal Lateral	
	Sem Infecção	Infecção	Sem Infecção	Infecção	Sem Infecção	Infecção
	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)
Não	8,0 (61,5)	5,0 (38,5)	7,0 (53,8)	6,0 (46,2)	5,0 (38,5)	8,0 (61,5)
Sim	13,0 (76,5)	4,0 (23,5)	14,0 (82,4)	3,0 (17,6)	15,0 (88,2)	2,0 (11,8)
P Valor^a	P = 0,443		P = 0,123		P = 0,007	
Antibioticoterapia Recente	Cultura de Tecido Osso Distal Medial					
	Sem Infecção	Infecção				
	No. (%)	No. (%)				
Não	7,0 (53,8)	6,0 (46,2)				
Sim	15,0 (88,2)	2,0 (11,8)				
P Valor^a	P = 0,049					

^a Valores de para Teste Chi-quadrado 2x2 ou Teste Exato de Fisher 2x2, quando apropriado.

4.5 Frequência de ocorrência de micro-organismos

No total, foi identificada a ocorrência de 21 micro-organismos, dos quais quatro foram obtidos somente pela cultura de tecido (*Citrobacter braakii*, Cocos gram positivo, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus capitis*), quatro por cultura do fluido de sonicação (Bacilos Gram Positivos, *Candida guilliermondii*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus warneri*) e 17 identificados por ambos os métodos.

Na cultura do fluido de sonicação, foi observada maior frequência de ocorrência de *Acinetobacter baumannii complex*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus coagulase negativo*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus agalactiae* e menor frequência de ocorrência de *Staphylococcus aureus*, em comparação ao método de cultura de tecido ($P < 0,05$, Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição de micro-organismos detectados por Cultura do Fluido de Sonicação e Cultura de Tecido^a

Micro-organismos	Cultura do Fluido de Sonicação (n = 30)		Cultura do Tecido (n = 180)		P Valor ^b
	No.	%	No.	%	
<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	2	5,7	3	3,5	0,005
<i>Bacilos gram positivos</i>	1	2,9	0	0,0	-----
<i>Candida guilliermondii</i>	1	2,9	0	0,0	-----
<i>Candida parapsilosis</i>	1	2,9	4	4,7	0,114
<i>Citrobacter braakii</i>	0	0,0	1	1,2	-----
Cocos gram positivo	0	0,0	1	1,2	-----
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	1	2,9	4	4,7	0,114
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0,0	5	5,9	-----
<i>Enterococcus faecium</i>	1	2,9	5	5,9	0,143
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	2,9	5	5,9	0,143
<i>Proteus mirabilis</i>	1	2,9	6	7,1	0,171
<i>Providencia stuartii</i>	1	2,9	6	7,1	0,171
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	8,6	5	5,9	0,002
<i>Serratia marcescens</i>	1	2,9	8	9,4	0,229
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	20,0	19	22,4	0,009

continua

conclusão

Micro-organismos	Cultura do Fluido de Sonicação (n = 30)		Cultura do Tecido (n = 180)		P Valor ^b
	No.	%	No.	%	
<i>Staphylococcus capitis</i>	0	0,0	1	1,2	-----
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	3	8,6	2	2,4	0,005
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	14,3	8	9,4	<0,001
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	5,7	0	0,0	-----
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	2,9	0	0,0	-----
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	8,6	2	2,4	0,005

^a Descrição dos micro-organismos identificados em 180 amostras extraídas de 30 sujeitos.

^b Valores de P para comparação da ocorrência de micro-organismos entre os meios de cultura, por meio do Teste Chi-quadrado ou Teste Exato de Fisher, quando apropriado.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou analisar, de modo objetivo, os resultados de dois diferentes métodos para a pesquisa do diagnóstico microbiológico nas infecções periprotéticas. Comparamos o modo mais frequente de análise, que é a cultura, em meio sólido, de fragmentos do tecido periprotético, com o cultivo, inicialmente, em frascos de hemocultura e, posteriormente, em placas, do líquido proveniente da sonicação do implante. A discussão a seguir baseia-se nos dados relatados na introdução, e na revisão da literatura e na análise dos resultados do estudo, seguindo a sequência em que foram apresentados.

5.1 Considerações sobre a epidemiologia das artroplastias no Brasil

Na introdução deste trabalho, relatamos vários estudos epidemiológicos sobre a incidência e prevalência das artroplastias pelo mundo, com evidente aumento de seus números devido ao envelhecimento da população e da maior disponibilidade para a cirurgia em diversos países.

A falta de um registro nacional de artroplastias ativo no Brasil implica em dificuldades para os gestores de saúde locais avaliarem itens como demanda por cirurgias, custos, qualidade dos implantes e das equipes médicas, complicações e suas consequências, entre elas, a infecção. É fundamental que este registro, proposto pela SBOT e ainda em fase de implementação, seja estabelecido e mantido no longo prazo, tanto para as cirurgias ofertadas pelo SUS como para aquelas do mercado de planos de saúde e pacientes particulares.

Embora sem números conclusivos, também parece haver uma carência expressiva da oferta deste procedimento aos pacientes que dependem exclusivamente do SUS, o que sugere a necessidade de políticas públicas de saúde que sejam voltadas para este público.

5.2 Considerações sobre as classificações das IPP

Em relação às classificações para as IPP, parece haver consenso da divisão entre os pacientes com quadro agudo ou crônico, e que a via hematogênica é a provável causa da infecção nos casos mais tardios. Existem, no entanto, dúvidas sobre até que momento a infecção de apresentação aguda deva ser assim considerada e até quando o agente etiológico deva ser admitido como sendo de origem nosocomial nas infecções de sintomatologia retardada.

Tande e Patel (2014) citam trabalhos nos quais os melhores resultados nos tratamentos com desbridamento, antibióticos e manutenção do implante (DAIR "debridement, antibiotics and implant retention") acontecem nas infecções com até 30 dias de pós-operatório, o que representa um quadro agudo.⁷²

A classificação de Tsukayama *et al.* (1996), considera a infecção como aguda quando se manifesta em até 30 dias após a cirurgia, e a maioria dos demais estudos cita como fase aguda o período até três meses de pós-operatório. Em comum, os diversos autores afirmam que, neste período de 90 dias, a maior probabilidade é que a infecção seja causada por micro-organismos mais virulentos, capazes de gerar sintomas inflamatórios evidentes. A partir de um determinado momento, 30 ou 90 dias após o procedimento cirúrgico, haveria predominância de micro-organismos adquiridos durante o ato operatório ou logo após esse, mas de virulência menor. Este período, que denominamos como infecção de aparecimento retardado, tem sido proposto com duração de 12 meses para alguns autores e de 24 meses para outros.²⁶

No entanto, recente modificação nos critérios de notificação de infecção em sítio cirúrgico do CDC americano trouxe este prazo para três meses, praticamente separando os pacientes em apenas duas categorias, agudos com sintomas até 90 dias e de aparecimento tardio após este período. Há, portanto, necessidade de melhor definição dos prazos por meio de estudos mais amplos e detalhados, já que a presença de micro-

organismos de origem nosocomial tendem a ter perfil de susceptibilidade antimicrobiana diferente ao das infecções por bactérias da comunidade, interferindo na decisão da antibioticoterapia empírica a ser instituída.

Diante das diferentes propostas de classificação, parece razoável individualizar o paciente, aplicando àqueles com quadros menos complexos os critérios de tempo na decisão da terapia a ser instituída, e, para os casos difíceis, com diferentes graus de comprometimento local ou sistêmico, utilizar as propostas de McPherson *et al.* Embora o foco deste trabalho não seja o tratamento das IPP, é importante citar a proposta de definição do que significa um tratamento bem-sucedido para esta doença, publicada por Diaz-Ledezma *et al.* (2013), que afirmam ser o bom resultado aquele em que existe a erradicação microbiológica e clínica da infecção, sem recidivas, sem necessidade de novas intervenções cirúrgicas para a mesma infecção e com o paciente livre de mortalidade relacionada à IPP. Os autores propõem ainda um critério temporal de classificação para o sucesso do tratamento, de curto prazo, até dois anos, médio prazo, ao redor de cinco anos, e longo prazo, mais de 10 anos.^{27,91}

5.3 Considerações sobre o diagnóstico da IPP

Em relação ao diagnóstico das IPP, existem ainda dúvidas sobre os critérios a serem empregados. Enquanto consensos são desenvolvidos, apoiados na opinião de especialistas e na literatura vigente, é inegável que há casos nos quais o paciente com infecção pode apresentar alterações inconclusivas em seus exames, enquanto outros, com falhas em seus implantes de origem mecânica ou imunológica, podem ser interpretados como sendo infectados, a partir de provas inflamatórias inespecíficas, alterações nos exames de imagem, ou por apresentarem culturas microbiológicas e diagnóstico molecular com resultados falso-positivos.

Mesmo a detecção da presença de micro-organismos, aderidos ao implante ou às estruturas orgânicas na forma de biofilme, não significa, de modo inequívoco, que exista infecção, como demonstrado por Sivaraman *et al.* (2016) em estudo sobre transplantes de córnea e por Ferreira *et al.* (2015) em análise de implantes dentários removidos.^{92,93}

Os fatores que sugerem o diagnóstico das IPP mais citados nas publicações são os testes sanguíneos, como a VHS e o PCR, os exames de imagem, a presença de fístula ou a constatação de secreção purulenta intrarticular, o exame citológico e microbiológico do líquido sinovial obtido por artrocentese, e o exame anatomopatológico do tecido periprotético.

Os testes sanguíneos de atividade inflamatória são, geralmente, disponíveis e de baixo custo, sendo válidos, principalmente, por seu alto valor preditivo negativo. Sua interpretação pode ser dificultada em pacientes com doença inflamatória, embora Cipriano *et al.* (2012) afirmem que valores duas vezes acima do limite normal da PCR são sugestivos de infecção tanto nos pacientes com este tipo de afecção como naqueles sem distúrbio autoimune, com a ressalva de que a atividade inflamatória pode variar ao longo do tempo, exigindo monitoramento por meio da repetição dos testes.⁵⁷

Os exames de imagem devem ser considerados como ferramentas úteis para o diagnóstico das IPP, mas são de difícil interpretação. A constatação de soltura ou osteólise na radiografia não distingue, isoladamente, o quadro séptico do asséptico.

A tomografia computadorizada é capaz de detalhar as estruturas ósseas ao redor do implante e a presença de líquido em contato com esse, mas igualmente sem poder diferenciar se há infecção ou não.

A ressonância magnética, com o avanço dos programas computacionais de aquisição das imagens, tem permitido avaliar detalhes ósseos e de partes moles, como a linfadenopatia reacional, que agregam informações à suspeita de infecção. É um exame que tende a ser mais utilizado para este diagnóstico no futuro.

Os exames de medicina nuclear estão entre os mais solicitados pelo ortopedista ao se deparar com uma suspeita de infecção periprotética ou de osteossíntese. Os artigos levantados sobre a cintilografia óssea ressaltam a baixa especificidade deste exame para IPP dentro dos primeiros 24 meses de pós-operatório, principalmente nas artroplastias do joelho. Mesmo a tomografia por emissão de pósitrons ainda necessita de protocolos mais definidos de indicação, por seu elevado custo e sua especificidade pouco comprovada. A maior contribuição dos exames de medicina nuclear nas IPP é por seu elevado valor preditivo negativo nos casos sem hipercaptação.

A presença de pus ou fístula é um dado bastante afirmativo do diagnóstico de infecção após artroplastia. Como citado na nossa introdução, é necessário descartar que o aspecto purulento seja proveniente de reação imunológica a partículas iônicas liberadas pelo atrito metal-metal, como descrito por Mikhael *et al.* (2009) em implantes com estas superfícies de contato.⁴⁷

Em relação à análise do líquido sinovial, importante principalmente nos casos sem fístula ou nos pacientes com doença inflamatória ativa, os trabalhos levantados são unânimes em ressaltar seu valor. O estudo citológico deve mostrar aumento expressivo da quantidade de células de inflamação aguda e proporção elevada de neutrófilos, e amostras do líquido devem ser enviadas para cultura microbiológica.

Devemos salientar que a artrocentese necessita ser realizada em ambiente adequado, limpo, por vezes, com o uso do intensificador de imagens, e que a punção pode ser negativa, quando não há quantidade suficiente de líquido para ser aspirado. No nosso estudo, pela falta de hábito ou de condições para a artrocentese, notamos que apenas quatro dos 30 pacientes tiveram relato de pesquisa do líquido sinovial no pré-operatório. Também são escassos os relatos desta prática nas publicações da literatura nacional, e acreditamos que não faça parte da rotina na maioria dos serviços de ortopedia do país.

Entendemos que, na impossibilidade da artrocentese, passam a ser mais valorizadas outras informações, como histórico de comorbidades, bacteremia recente, imunossupressão, infecção superficial, presença de cicatrizes e alterações radiográficas ao redor dos implantes.

Outro aspecto que nos chamou a atenção foi a ausência de estudos na literatura brasileira sobre a avaliação histológica do tecido periprotético nos casos de IPP, item presente na maioria dos critérios diagnósticos publicados, em que se busca detectar a presença de células de inflamação aguda na visão com magnificação de 400 vezes. Igualmente, não identificamos solicitação para esta investigação nos casos inseridos na nossa casuística. Parece-nos interessante que sejam implementados no Brasil protocolos que promovam o exame anatomopatológico rotineiro do tecido periprotético quando da retirada cirúrgica do implante, ou a biópsia pré-operatória em casos selecionados de suspeita de IPP.

5.4 Considerações a respeito do diagnóstico microbiológico

Os estudos analisados relatam métodos para o diagnóstico microbiológico a partir de culturas do líquido sinovial, do tecido periprotético e do líquido obtido por sonicação do implante, ou, ainda, pela detecção de fragmentos nucleares de micro-organismos pela técnica de RCP.

O líquido sinovial obtido por artrocentese é uma fonte potencial de material para o diagnóstico microbiológico, sendo necessárias, como já salientado, condições adequadas para sua coleta. De igual importância são as condições de armazenamento das amostras e do envio dessas ao laboratório de microbiologia, para se evitar resultados inconsistentes. Discutiremos o assunto a seguir, ao abordarmos a cultura de tecidos.

Em relação à cultura microbiológica dos fragmentos de tecido periprotético, alguns aspectos devem ser considerados. Primeiramente, é possível identificar um certo consenso sobre o número de espécimes a serem biopsiados para análise, cinco ou seis, mas não se descreve de modo

detalhado de onde estes fragmentos devam ser removidos, ou seus tamanhos ideais. Observamos, também, escassos trabalhos sobre a logística de transporte das amostras, desde sua colocação em frascos ainda na sala cirúrgica, o modo de preservação para manutenção da viabilidade dos micro-organismos, prazos e modo de transporte ao laboratório de microbiologia, em que serão processadas.

A falta de padronização da logística necessária entre a coleta do material e sua chegada ao laboratório de microbiologia pode contribuir para resultados discrepantes das culturas microbiológicas. A colocação do material em frascos secos, o excessivo calor ambiente, a demora para o envio ao laboratório de microbiologia e para a semeadura nos meios de cultura definitivos podem levar a resultados falso-negativos. Já a coleta sem critérios definidos do tecido periprotético, o modo como esse é colocado nos frascos para transporte e o excessivo manuseio das amostras podem ocasionar falso-positivos.

A situação ideal para coleta de materiais para o diagnóstico microbiológico, seja do líquido sinovial, seja do tecido periprotético, implica em cuidados para se evitar a contaminação, a colocação dos materiais em frascos com caldos que preservem a vitalidade de eventuais micro-organismos, sendo referência o tioglicolato, a rapidez e o controle do transporte destes materiais até o laboratório de microbiologia, evitando-se a exposição desse ao calor excessivo, com a devida integração entre as equipes médicas, de enfermagem e do laboratório para que as amostras sejam corretamente processadas em tempo hábil.

Um aspecto não conclusivo da literatura é sobre um único resultado positivo de cultura microbiológica, seja do líquido sinovial, seja do tecido periprotético. Diante da possibilidade de falhas aqui relatadas em todo o processo de coleta, transporte e processamento das amostras, o infectologista deve ser muito prudente ao definir a antibioticoterapia a partir deste resultado isolado, assim como o ortopedista não o deve valorizar em excesso ao concluir tratar-se de uma IPP. Uma exceção é a cultura positiva única obtida a partir de sonicação do implante, o que é valorizado por Portillo

et al. (2015) como sendo de maior valor diagnóstico.⁸³

As técnicas que se mostram mais promissoras no diagnóstico microbiológico das IPP são a sonicação do implante e a RCP. Buscamos um melhor detalhamento do histórico da sonicação por ser o foco do presente estudo, e pudemos notar um crescente número de publicações a respeito.

Alguns aspectos da técnica de sonicação estão padronizados na maioria dos estudos, como a frequência utilizada no sonicador, de 40 kHz por 5 minutos e o uso de recipientes rígidos de polipropileno, com boa vedação e preenchidos parcialmente com soro fisiológico ou Ringer lactato.

A utilização da vortização aumenta a possibilidade de despregamento do biofilme e está relatada na maior parte dos estudos a partir de 2009. Sua ação é mecânica e depende do uso de aparelho específico, o vortizador. Em nosso experimento, optamos por não fazer a vortização para minimizar os custos com o equipamento, substituindo-a pela agitação vigorosa do recipiente, conforme relatado nos métodos. Vale ressaltar que, tanto na vortização como na agitação com as mãos, é indispensável a vedação completa do frasco contendo o implante, para evitar contaminação.

A centrifugação após a sonicação é outro adjuvante na tentativa de aumentar a detecção micro-organismos e tem sido empregada em diversos estudos. No mesmo raciocínio em relação à vortização, optamos por não incorporar a centrifugação visando diminuir os custos do processo.

A semeadura do líquido obtido pela sonicação é feito, na maioria dos trabalhos, diretamente em placas com meio sólido de cultura, a partir das quais é realizada, caso haja crescimento de micro-organismos, a contagem do número de CFU para definir o resultado como positivo ou negativo.

Identificamos somente dois trabalhos, de Shen *et al.* e Portillo *et al.*, ambos publicados em 2015, quando nosso estudo já estava em andamento, onde o líquido da sonicação é injetado diretamente nos frascos de hemocultura BD BACTEC, método semelhante à nossa proposta. Em ambas as publicações, os resultados relatam maior sensibilidade com esta técnica.

O diagnóstico microbiológico pela RCP tem sido motivo de diversas publicações recentes. A identificação é feita sem a necessidade de culturas,

e o método, embora ainda de custo elevado, tem se difundido rapidamente. Amostras da corrente sanguínea, do líquido sinovial e do produto da sonicação podem ser avaliadas com este método, no prazo de poucas horas. A maior preocupação, no entanto, é a detecção de micro-organismos não relacionados à infecção. Como pondera McConoughey *et al.* (2014) em artigo de opinião sobre biofilmes nas IPP, a contaminação pode levar ao aumento dos falso-positivos e à interpretação por vezes equivocada de infecções polimicrobianas.⁹⁴

5.5 Discussão dos resultados do estudo

5.5.1 Recrutamento

Dentro do período disponível para a inclusão de novos casos, de 15 meses, o processo de captação envolveu o contato frequente entre a equipe de pesquisa e cirurgiões com atuação na cirurgia do quadril e do joelho, que atuassem na cidade de São Paulo ou na região metropolitana de Campinas, São Paulo. Diante da sinalização de um potencial participante, os critérios de inclusão eram checados e iniciava-se o processo final de captação.

Várias foram as dificuldades para efetivamente serem incluídos cada um dos participantes no estudo. Em diversos casos, os procedimentos agendados foram cancelados no momento da cirurgia, por falta de vagas na unidade de terapia intensiva, ou por intercorrências clínicas dos pacientes. Em cinco situações, o cirurgião optou por não remover o implante apenas após a incisão cirúrgica, mesmo com toda a estrutura de captação presente em sala. E houve situações nas quais a comunicação de que haveria um caso era enviada já no momento em que se iniciava a cirurgia, inviabilizando a inclusão desse.

Das 125 comunicações de casos potenciais, a maioria dos casos foi descartada por dúvidas diagnósticas, em que os critérios da presença de infecção não foram suficientemente evidentes.

5.5.2 Perfil demográfico

O perfil demográfico da amostra em estudo é compatível com outros trabalhos sobre o tema. Gomez *et al.* (2012) apresentam, em sua casuística, com 366 pacientes submetidos à revisão de artroplastias, sendo 135 com IPP, a idade média de 66 anos, com variação entre 24 e 92 anos, sendo 50% pessoas do sexo masculino. Em 74% dos casos, a indicação para a artroplastia foi por artrose, seguida por fraturas, com 13%, artropatia inflamatória, com 5%, osteonecrose da cabeça femoral em 2%, entre outros diagnósticos.⁸⁶

Moojen *et al.* (2010) relatam, em seu estudo sobre a incidência de infecção em artroplastias inicialmente interpretadas como assépticas, com recrutamento de 176 pacientes, idade média de 70 anos, variando entre 28 e 92, sendo 28% do sexo masculino. A artrose foi o motivo da artroplastia em 65% dos casos, seguido de sequela de doenças do quadril na infância com 12%, fraturas e artropatias inflamatórias, ambas com 6% e osteonecrose da cabeça femoral com 5%, entre outras.⁹⁵

Nossos pacientes têm, em média, 67 anos, variando entre 35 e 90, sendo 40% do sexo masculino. A artrose representou 60% dos diagnósticos que levaram à artroplastia, seguida da osteonecrose da cabeça femoral com 13%, fratura recente do colo femoral e artrite reumatoide, ambos com 10%, e um paciente com sequela de fratura do planalto tibial (3%).

Com relação a comorbidades, poucos estudos as citam em detalhes. Byren *et al.* (2009) dividem os casos entre pacientes sem nenhuma comorbidade, com uma ou mais doenças ou, ainda, se a informação é desconhecida. Spangehl *et al.* (1999) relatam 202 revisões de artroplastia total de quadril em que 25 apresentavam IPP, e não citam possíveis comorbidades. Cazanave *et al.* (2013), em 144 pacientes com IPP, descrevem apenas aqueles com fatores de risco aumentado para infecção, no caso diabetes mellitus e uso prolongado de imunossupressores.^{9,44,88}

Em nossos pacientes, todos, exceto um, apresentam, ao menos, uma doença crônica relevante, sendo a hipertensão arterial sistêmica presente em 19 (63%), diabetes melito em dez (33%), havendo, ainda, relatos de doença pulmonar obstrutiva crônica, coronariopatia, insuficiência renal, cirrose hepática, artrite reumatoide, retocolite ulcerativa, insuficiência cardíaca congestiva, hipotireoidismo, asma brônquica, obesidade mórbida e insuficiência arterial crônica. As comorbidades nos pacientes com IPP justificam a realização de mais estudos, a fim de se verificar sua relação com o diagnóstico e a evolução diante das diferentes formas de tratamento da infecção.

Em relação ao sítio da artroplastia, a maioria dos estudos sobre IPP com mais de 15 anos é referente ao quadril, com aumento progressivo do número de publicações sobre a artroplastia de joelho acompanhando o aumento da incidência desta cirurgia. Cipriano *et al.* (2012) analisam 146 IPP, sendo 49% do quadril e 51% do joelho, enquanto Byren *et al.* (2009), em 112 casos de IPP, relatam 46% casos de quadril, 45% do joelho e o restante de outras articulações.^{9,57}

Em nossa casuística, temos 35% de casos envolvendo o quadril e 65% o joelho.

5.5.3 Caracterização da amostra

A análise estatística não encontrou diferenças estatisticamente significantes que determinassem, na amostra, predomínio de gênero, patologia articular primária, tipo de artroplastia, primária ou de revisão, localização do implante, joelho ou quadril, lateralidade ou uso de antibioticoterapia recente. Houve, no entanto, de modo estatisticamente significativo, predomínio de pacientes com fístula e de casos nos quais não foi feita a artrocentese, seja para cultura microbiológica seja para análise citológica.

O viés da predominância de pacientes com presença de fístula se deu pela necessidade de termos casos com diagnóstico definido de infecção, e a fístula é considerada um dos sinais mais evidentes desta patologia. Já a não realização de artrocentese em muitos pacientes, como já discutido, parece ser pelo fato desta intervenção não fazer parte da rotina diagnóstica na maioria dos serviços ortopédicos, ao menos pelo que fica sugerido na presente amostra, restrita à área de abrangência definida.

5.5.4 Sensibilidade do diagnóstico de infecção

A comparação entre os métodos de diagnóstico microbiológico, principal objetivo deste estudo, mostrou maior sensibilidade do método utilizando a sonicação em relação à cultura convencional do tecido periprotético, com significância estatística. Isto se deu na comparação entre os resultados da sonicação e as culturas em cada um dos seis sítios definidos como fontes de material para cultura.

Este resultado é compatível aos estudos prévios nos quais se buscou a superioridade de um método sobre o outro, em especial, os trabalhos já citados de Shen *et al.* (2015) e Portillo *et al.* (2015), que usam metodologia semelhante ao presente trabalho, com utilização de frascos de hemocultura para a semeadura do líquido obtido pela sonicação e a posterior comparação aos resultados da cultura do tecido periprotético.

O estudo de Shen foi realizado somente com pacientes portadores de próteses articulares, o que não ocorreu no trabalho de Portillo, que também avaliou pacientes portadores de osteossíntese. A casuística de Shen foi de 50 pacientes, enquanto Portillo analisou 45 pacientes portadores de próteses articulares, dos quais 18 foram diagnosticados como portadores de infecção periprotética. Deste modo, nossa casuística de 30 pacientes, todos com diagnóstico de infecção, parece-nos significativa.

Os trabalhos acima citados tiveram cerca de metade dos pacientes usando antibióticos no período de 14 dias que antecedeu a remoção dos implantes, sendo 52% no estudo de Shen e 56% no trabalho de Portillo. O uso recente de antibiótico esteve presente em 56% dos nossos pacientes. Nos três estudos, o uso do antibiótico mostrou leve redução, sem significado estatístico, na sensibilidade das amostras obtidas por sonicação. Em nosso trabalho, a redução na sensibilidade foi estatisticamente significativa apenas em amostras de tecido periprotético, especificamente daqueles retirados de fragmentos ósseos da porção distal da articulação, tanto medial como lateral.

Deste modo, a sonicação parece ser um método útil para o diagnóstico microbiológico especialmente nos pacientes com histórico recente do uso de antimicrobianos.

A comparação entre os diferentes sítios de coleta do tecido periprotético, variável que não encontramos anteriormente relatada na literatura, sugere que fragmentos da membrana periprotética apresentam maior sensibilidade em suas culturas em relação ao cultivo de fragmentos ósseos. Foram estatisticamente significantes as diferenças de sensibilidade da cultura microbiológica entre a membrana periprotética e os fragmentos ósseos obtidos da porção proximal da articulação, medial e lateral, e da porção distal medial dessa. A relevância deste achado está na possibilidade de, em não havendo disponibilidade para se realizar a sonicação do implante, o cirurgião direcione a coleta de tecido para cultura em áreas nas quais seja identificada esta membrana, geralmente presente nos pontos de soldura espontânea do implante.

Em relação à identificação de micro-organismos nas amostras, os trabalhos de Shen e Portillo mostram aumento do número de patógenos identificados pelo método da sonicação em relação à cultura do tecido periprotético, o que também ocorreu no nosso estudo. Nas 30 amostras da sonicação, obtivemos a identificação de 35 micro-organismos, predominantemente *Staphylococcus aureus* (sete vezes), enquanto nas 180 amostras de tecido periprotético, foram identificados 85 micro-organismos,

predominando igualmente o *Staphylococcus aureus* (19 vezes). A comparação entre estes achados pode ser realizada fazendo-se a divisão entre amostras e achados. Para a sonicação, este resultado é de 1,16 (35/30), enquanto no tecido periprotético é de 0,47 (85/180). Portanto, a sonicação parece ser capaz de demonstrar um número maior de micro-organismos presentes na amostra.

Não é possível ser feito qualquer raciocínio relacionando o tipo de micro-organismo encontrado e a natureza da amostra, por serem muitos os diferentes patógenos, inviabilizando a análise estatística. De qualquer modo, assim como acontece nos diagnósticos microbiológicos obtidos pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase, observa-se a possibilidade de serem identificados mais patógenos que em culturas convencionais, sendo necessários mais estudos que permitam a conclusão de quais destes micro-organismos efetivamente participam do processo infeccioso e quais poderiam ser considerados como inertes a este processo.

5.6 Limitações do estudo

Podemos considerar que o presente estudo apresenta casuística reduzida, de 30 pacientes. Entre os fatores que levaram a este número reduzido, está a dificuldade de obtenção de pacientes dentro dos rígidos critérios de inclusão estabelecidos e o prazo relativamente curto para a realização do estudo.

Foram necessárias diversas etapas até a efetiva execução do projeto, incluindo sua aprovação, viabilização orçamentária e, por fim, a importação do equipamento necessário ao estudo.

O projeto foi aprovado pela Comissão Científica do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da FMUSP em junho de 2011 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP em novembro de 2011. Seguiu-se um prazo de sete meses no qual tivemos dificuldade para a formatação da proposta a ser enviada ao patrocinador do estudo, a FAPESP, em parte, devido à

mudança do responsável dentro da Comissão de Projetos do IOT. Finalmente, o projeto foi apresentado à FAPESP em setembro de 2012.

Houve diversos questionamentos da FAPESP quanto a detalhes e justificativas do projeto, de modo que esse teve sua aprovação final pela agência de fomento somente em agosto de 2013, quando se iniciou o processo de importação do sonicador.

Novas dificuldade surgiram neste momento, como a recusa da venda de somente uma unidade pelo distribuidor, a não concordância do modo de quitação do valor devido, já que foi solicitado pagamento adiantado, o que não é norma da FAPESP, além de problemas na liberação alfandegária. Deste modo, o sonicador somente foi disponibilizado para o estudo em outubro de 2014. Assim, o tempo total para a inclusão de casos foi de 15 meses, o que limitou o número total de casos captados.

Outro aspecto limitante a ser considerado foi a impossibilidade de se obter a especificidade do método, tendo sido possível analisar somente sua sensibilidade. Para se obter a especificidade desse, seria necessário um grupo controle de pacientes sem diagnóstico de infecção, em que seria possível verificar o crescimento ou não de micro-organismos, sendo esperado que, para casos assépticos, os resultados negativos seriam em maior número. Esta é uma sugestão de estudo como desdobramento do presente trabalho.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

1. A cultura microbiológica do líquido obtido por sonicação dos implantes removidos em pacientes com infecção periprotética, semeado diretamente em frascos de hemocultura, mostraram sensibilidade superior, com significância estatística, à cultura convencional obtida a partir de fragmentos do tecido periprotético, semeado em placas.
2. Na impossibilidade da realização da sonicação, a cultura microbiológica de amostras da membrana periprotética mostrou-se com maior sensibilidade em relação aos demais sítios analisados.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO A - Carta de aprovação do projeto pela comissão científica do IOT

Informamos que o Protocolo de Pesquisa abaixo mencionado, foi aprovado pela Comissão Científica do DOT/FMUSP em 29.06.2011.

Favor entrar em contato com a Pós-Graduação do DOT/FMUSP (11) 3069-6908, para obter informações sobre o período de inscrição para Doutorado.

IDENTIFICAÇÃO

Protocolo IOT n° 871

Pesquisadora Responsável: Dra. Ana Lúcia Lei Munhoz Lima

Pesquisador Executante: Dr. José Luís Amim Zabeu

Título: Sonicação como método para otimizar diagnóstico microbiológico de infecção em artroplastias de membros inferiores

Grau de Pesquisa: Doutorado

7.2 ANEXO B - Carta de Aprovação do Estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisas da FMUSP



APROVAÇÃO

O Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **09.11.11**, após atendimento a diligência encaminhada **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **347/11**, intitulado: "**Sonicação como método para otimizar diagnóstico microbiológico de infecção em artroplastias de membros inferiores.**", apresentado pelo Departamento de **Ortopedia e Traumatologia**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa .

Pesquisador (a) Responsável: Ana Lúcia Lei Munhoz Lima

Pesquisador (a) Executante: José Luís Amim Zabeu

CEP-FMUSP, 09 de novembro de 2011.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador Interino
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire 1º andar CEP 01246903 – Fone : 3061-8004
mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

7.3 ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO..... Nº APTO:

BAIRRO:..... CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO:..... Nº APTO:

BAIRRO:..... CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : **Sonicação como método para otimizar o diagnóstico microbiológico de infecção em artroplastias dos membros inferiores.**

PESQUISADOR : JOSE LUIS AMIM ZABEU

CARGO/FUNÇÃO: **Pesquisador ortopedista** INSCRIÇÃO CRM - SP: **63209**

UNIDADE DO HC-FMUSP: **Instituto de Ortopedia e Traumatologia**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: **Coleta única de materiais durante a cirurgia de remoção de prótese articular em pacientes com diagnóstico de infecção periprotética.**

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1. Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa *melhorar o diagnóstico etiológico das infecções em próteses articulares, ou seja, identificar o microrganismo causador da infecção de modo mais frequente e preciso, comparando dois métodos de se fazer a cultura microbiológica do material, a partir do implante e do tecido onde estava a prótese.*
2. Serão documentados seus dados pessoais, o histórico a respeito da infecção, a ocorrência de outras doenças concomitantes e o resultado de exames laboratoriais e radiográficos.
3. Serão coletados materiais durante a realização da cirurgia, que serão enviados para exames no Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, na cidade de São Paulo, para serem processados.
4. Não haverá qualquer mudança na técnica da cirurgia ou no planejamento pré ou pós-operatório devido a este estudo. Será seguida a orientação do serviço de infectologia do hospital onde você está sendo tratado acerca do tipo, duração e via de administração de antibióticos, conforme indicados, sendo parâmetro do infectologista o resultado da microbiologia realizada no próprio hospital, e não o resultado dos exames deste estudo.
5. Não são esperados quaisquer desconfortos, aumento do tempo cirúrgico ou riscos neste estudo.
6. Não há benefício direto para o paciente. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício no método em teste.
7. Em qualquer etapa do estudo, o (a) Sr. (Sra.) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. José Luís Amim Zabeu, que pode ser encontrado na Avenida John Boyd Dunlop s/n, Jardim Ipaussurama em Campinas, São Paulo, no Ambulatório de Ortopedia do Hospital da PUC-Campinas, no prédio dos ambulatórios do SUS. Também poderá fazer contato pelos telefones: 19 3343-8386 (PUC-Campinas) ou 19 99781-8111 (celular). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Av.

Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 2º andar– tel: 3061-8004, FAX: 3061-8004– E-mail: cep.fm@usp.br.

8. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
9. Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
10. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.
11. Há o compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **"Sonicação como método para otimizar diagnóstico microbiológico de infecção em artroplastias de membros inferiores"**

Eu discuti com o Dr José Luís Amim Zabeu ou com médicos de sua equipe sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data

____/____/____

Assinatura da testemunha *

Data ____/____/____

* para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

7.4 ANEXO D - Ficha de coleta de dados do paciente

Ficha de coleta de dados - Pesquisa de sonicação de artroplastias

Caso número: _____

Data da sonicação: _____

1. NOME: _____
2. RG: _____ RH (registro hospitalar) _____
3. Idade: _____ / Data de Nascimento: _____ / Gênero: _____
4. Data da cirurgia que desenvolveu infecção: _____
5. Doença que motivou a realização da artroplastia: _____
6. Tipo, local e lado da artroplastia: _____
7. Tempo até o diagnóstico de infecção: _____
8. Comorbidades e tabagismo: _____
9. Antibioticoterapia prévia (15 dias ou menos, tipo e via): _____

10. Presença de fístula (sim ou não): _____
11. Artrocentese e resultados:

12. VHS: _____ / PCR: _____
13. Condição radiográfica do implante: _____

7 Referências

7 REFERÊNCIAS

1. Lima AL, Oliveira PR, Carvalho VC, Saconi ES, Cabrita HB, Rodrigues MB. Periprosthetic joint infections. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2013;2013:542796.
2. Frank RM, Cross MB, Della Valle CJ. Periprosthetic joint infection: modern aspects of prevention, diagnosis, and treatment. *J Knee Surg*. 2015 Apr;28(2):105-12.
3. Korim MT, Esler CN, Reddy VR, Ashford RU. A systematic review of endoprosthetic replacement for non-tumour indications around the knee joint. *Knee*. 2013 Dec;20(6):367-75.
4. Singh JA, Sperling JW, Schleck C, Harmsen W, Cofield RH. Periprosthetic infections after shoulder hemiarthroplasty. *J Shoulder Elbow Surg*. 2012 Oct; 21(10):1304-9.
5. Voloshin I, Schippert DW, Kakar S, Kaye EK, Morrey BF. Complications of total elbow replacement: a systematic review. *J Shoulder Elbow Surg*. 2011 Jan; 20(1):158-68.
6. Cahill JL, Shadbolt B, Scarvell JM, Smith PN. Quality of life after infection in total joint replacement. *J Orthop Surg*. 2008 Apr;16(1):58-65.
7. Ware JE Jr, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care*. 1992;30:473-83.
8. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J Rheumatol*. 1988 Dec;15(12):1833-40.
9. Byren I, Bejon P, Atkins BL, Angus B, Masters S, McLardy-Smith P, et al. One hundred and twelve infected arthroplasties treated with "DAIR" (debridement, antibiotics and implant retention): antibiotic duration and outcome. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(6):1264-71.
10. Peel TN, Dowsey MM, Buising KL, Liew D, Choong PF. Coste analysis of debridement and retention for management of prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Feb;19(2):181-6.

11. Klouche S, Sariali E, Mamoudy P. Total hip arthroplasty revision due to infection: a cost analysis approach. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2010 Apr; 96(2):124-32.
12. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med.* 2007, 357: 654-63.
13. Parvizi J, Jacovides C, Zmistowski B, Jung KA. Definition of periprosthetic joint infection: is there a consensus? *Clin Orthop Relat Res.* 2011 Nov;469(11):3022-30.
14. Springer BD, Scuderi GR. Evaluation and management of the infected total knee arthroplasty. *Instr Course Lect.* 2013;62:349-61.
15. Kiefer H. Differences and opportunities of THA in the USA, Asia and Europe. In: Chang JD, Billau K, eds. *Bioceramic and alternative bearings in joint arthroplasty.* Nürnberg: Steinkopff Verlag, 2007;3-8.
16. Kurtz SM, Roder C, Lau E, Ong K, Widmer M, Maravic M, et al. International survey of primary and revision total hip replacement. *Paper # 365. Presented at the 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society.* New Orleans, 2010.
17. Kurtz SM, Ong KL, Lau E, Widmer M, Maravic M, Gómez-Barrena E, et al. International survey of primary and revision total knee replacement. *Int Orthop.* 2011 Dec;35(12):1783-9.
18. Maradit Kremers H, Larson DR, Crowson CS, Kremers WK, Washington RE, et al. Prevalence of total hip and knee replacement in the United States. *J Bone Joint Surg Am.* 2015 Sep 2;97(17):1386-97.
19. Gomes LSM. THR in the young: South American perspective. *Bone Joint J* 2012; Focus on: 1-6. The British Editorial Society of Bone and Joint Surgery. <http://www.boneandjoint.org.uk/content/focus/thr-young-south-american-perspective> - Último acesso 04/10/2015.
20. <http://portalsbot.org.br/sbot-e-a-expansao-do-registro-e-rastreamento-das-proteses-de-jelho-e-quadril/> - último acesso 26/12/2015.
21. Ministério da Saúde do Brasil: Dados do Sistema Único de Saúde. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/qiuf.def> - Pesquisa do autor - Último acesso 03/01/2016.
22. <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94074.pdf>.

23. http://www.ans.gov.br/images/stories/Materiais_para_pesquisa/Materiais_por_assunto/ProdEditorialANS_Rol_de_Procedimentos_e_eventos_em_saude_2014.pdf.
24. Anagnostakos K, Schmid NV, Kelm J, Grün U, Jung J. Classification of hip joint infections. *Int J Med Sci*. 2009; 6(5):227-33.
25. Fitzgerald RH Jr, Nolan DR, Ilstrup DM, Van Scoy RE, Washington JA 2nd, Coventry MB. Deep wound sepsis following total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 1977 Oct;59(7):847-55.
26. Tsukayama DT, Estrada R, Gustilo RB . Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections. *J Bone Joint Surg Am*. 1996 Apr; 78(4):512-23.
27. McPherson EJ, Woodson C, Holtom P, Roidis N, Shufelt C, Patzakis M. Periprosthetic total hip infection. Outcomes using a staging system. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;403:8-15.
28. Cierny G 3rd, Mader JT, Penninck JJ. A clinical staging system for adult osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res*. 2003 Sep; (414):7-24.
29. Tsukayama DT, Goldberg VM, Kyle R Diagnosis and management of infection after total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2003; 85-A (Suppl 1):S75-80.
30. Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly*. 2005 Apr 30;135(17-18):243-51.
31. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control*. 2008 Jun;36(5):309-32.
32. <http://www.cdc.gov/nhsn/PDFs/pscManual/9pscSSIcurrent.pdf> - última pesquisa 11/01/2016.
33. Jahoda D, Nyc O, Simsa J, Kucera E, Hanek P, Chrz P, et al. Late hematogenous infection of prosthetic joints in our patients and proposal for a system of prevention. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 2007 Dec;74(6):397-400.
34. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol*. 1994, 176: 2137–42.

35. Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis.* 1982;146:487–97.
36. Southwood RT, Rice JL, McDonald PJ, Hakendorf PH, Rozenblds MA. Infection in experimental hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Br.* 1985 Mar;67(2):229-31.
37. Mukherjee PK, Zhou G, Munyon R, Ghannoum MA. Candida biofilm: a well-designed protected environment. *Med Mycol.* 2005 May;43(3):191-208. Review.
38. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2001;358:135–8.
39. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):167-93.
40. Del Pozo JL, Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Aug;82(2):204-9. Review.
41. Atalla H, Gyles C, Mallard B. Staphylococcus aureus small colony variants (SCVs) and their role in disease. *Anim Health Res Rev.* 2011 Jun;12(1):33-45.
42. Sendi P, Frei R, Maurer TB, Trampuz A, Zimmerli W, Graber P. Escherichia coli variants in periprosthetic joint infection: diagnostic challenges with sessile bacteria and sonication. *J Clin Microbiol.* 2010 May;48(5):1720-5.
43. Lannergård J, von Eiff C, Sander G, Cordes T, Seggewiss J, Peters G, et al. Identification of the genetic basis for clinical menadione-auxotrophic small-colony variant isolates of Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Nov;52(11):4017-22.
44. Spangehl MJ, Masri BA, O'Connell JX, Duncan CP. Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am.* 1999; 81(5):672–83.
45. Parvizi J, Gehrke T. *Proceedings of the International Consensus Meeting on periprosthetic joint infection.* Musculoskeletal Infection Society, Rochester, MN. 2013.

46. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2013 Jan; 56(1):e1-e25.
47. Mikhael MM, Hanssen AD, Sierra RJ Failure of metal-on-metal total hip arthroplasty mimicking hip infection. A report of two cases. *J Bone Joint Surg Am*. 2009 Feb; 91(2):443-6.
48. Schinsky MF, Della Valle CJ, Sporer SM, Paprosky WG. Perioperative testing for joint infection in patients undergoing revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Sep;90(9):1869-75.
49. Berbari E, Mabry T, Tsaras G, Spangehl M, Erwin PJ, Murad MH, et al. Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am*. 2010 Sep 1; 92(11):2102-9.
50. Cyteval C, Bourdon A. Imaging orthopedic implant infections. *Diagn Interv Imaging*. 2012 Jun;93(6):547-57.
51. He C, Lu Y, Jiang M, Feng J, Wang Y, Liu Z. Clinical value of optimized magnetic resonance imaging for evaluation of patients with painful hip arthroplasty. *Chin Med J*. 2014;127(22):3876-80.
52. Palestro CJ. Nuclear medicine and the failed joint replacement: past, present, and future. *World J Radiol*. 2014 Jul 28;6(7):446-58.
53. Kwee TC, Kwee RM, Alavi A. FDG-PET for diagnosing prosthetic joint infection: systematic review and metaanalysis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008 Nov; 35(11):2122-32.
54. Trampuz A, Hanssen AD, Osmon DR, Mandrekar J, Steckelberg JM, Patel R. Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. *Am J Med*. 2004 Oct 15; 117(8):556-62.
55. Ghanem E, Parvizi J, Burnett RS, Sharkey PF, Keshavarzi N, Aggarwal A, et al. Cell count and differential of aspirated fluid in the diagnosis of infection at the site of total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Aug; 90(8):1637-43
56. Bedair H, Ting N, Jacovides C, Saxena A, Moric M, Parvizi J, et al. The Mark Coventry Award: diagnosis of early postoperative TKA infection using synovial fluid analysis. *Clin Orthop Relat Res*. 2011 Jan; 469(1):34-40.

57. Cipriano CA, Brown NM, Michael AM, Moric M, Sporer SM, Della Valle CJ. Serum and synovial fluid analysis for diagnosing chronic periprosthetic infection in patients with inflammatory arthritis. *J Bone Joint Surg Am.* 2012 Apr 4; 94(7):594-600.
58. Mirra JM, Amstutz HC, Matos M, Gold R. The pathology of the joint tissues and its clinical relevance in prosthesis failure. *Clin Orthop Relat Res.* 1976 Jun;(117):221-40.
59. Mirra JM, Marder RA, Amstutz HC. The pathology of failed total joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 1982 Oct;(170):175-83.
60. Morawietz L, Classen RA, Schröder JH, Dynybi CI, Perka C, Skwara A, et al. Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol.* 2006 June; 59(6):591-7.
61. Tsaras G, Maduka-Ezeh A, Inwards CY, Mabry T, Erwin PJ, Murad MH, et al. Utility of intraoperative frozen section histopathology in the diagnosis of periprosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 2012 Sep 19;94(18):1700-11.
62. Janz V, Wassilew GI, Hasart O, Matziolis G, Tohtz S, Perka C. Evaluation of sonicate fluid cultures in comparison to histological analysis of the periprosthetic membrane for the detection of periprosthetic joint infection. *Int Orthop.* 2013 May; 37(5):931-6.
63. Wu C, Qu X, Mao Y, Li H, Dai K, Liu F, et al. Utility of intraoperative frozen section in the diagnosis of periprosthetic joint infection. *PLoS One.* 2014;9(7): e102346.
64. Corvec S, Portillo ME, Pasticci BM, Borens O, Trampuz A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int J Artif Organs.* 2012 Oct;35(10):923-34.
65. Gollwitzer H, Dombrowski Y, Prodinger PM, Peric M, Summer B, Hapfelmeier A, et al. Antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines in periprosthetic joint infection. *J Bone Joint Surg Am.* 2013 Apr 3; 95(7):644-51.
66. Qu X, Zhai Z, Wu C, Jin F, Li H, Wang L, et al. Preoperative aspiration culture for preoperative diagnosis of infection in total hip or knee arthroplasty. *J Clin Microbiol.* 2013 Nov; 51(11):3830-4.
67. Enayatollahi MA, Parvizi J. Diagnosis of infected total hip arthroplasty. *Hip Int.* 2015 Jul-Aug;25(4):294-300.

68. Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DW, Simpson H, Peto TE, et al. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *J Clin Microbiol.* 1998 Oct; 36(10):2932-9.
69. Schäfer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Infect Dis.* 2008 Dec 1; 47(11):1403-9.
70. Shannon SK, Mandrekar J, Gustafson DR, Rucinski SL, Dailey AL, Segner RE, et al. Anaerobic thioglycolate broth culture for recovery of *Propionibacterium acnes* from shoulder tissue and fluid specimens. *J Clin Microbiol.* 2013 Feb; 51(2):731-2.
71. Parvizi J, Zmistowski B, Berbari EF, Bauer TW, Springer BD, Della Valle CJ, et al. New definition for periprosthetic joint infection: from the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. *Clin Orthop Relat Res.* 2011 Nov; 469(11):2992-4.
72. Tande AJ, Patel R. Prosthetic Joint Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014 April; 27(2):302-45.
73. Hughes HC, Newnham R, Athanasou N, Atkins BL, Bejon P, Bowler IC. Microbiological diagnosis of prosthetic joint infections: a prospective evaluation of four bacterial culture media in the routine laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1528-30.
74. Larsen LH, Lange J, Xu Y, Schønheyder HC. Optimizing culture methods for diagnosis of prosthetic joint infections: a summary of modifications and improvements reported since 1995. *J Med Microbiol.* 2012 Mar;61(Pt 3):309-16.
75. Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR, Anderson N, Davis RI, et al. Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. *J Bone Joint Surg Br.* 1998 Jul; 80(4):568-72.
76. Trampuz A, Osmon DR, Hanssen AD, Steckelberg JM, Patel R. Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection. *Clin Orthop Relat Res.* 2003 Sep; (414):69-88.
77. Trampuz A, Piper KE, Hanssen AD, Osmon DR, Cockerill FR, Steckelberg JM, et al. Sonication of explanted prosthetic components in bags for diagnosis of prosthetic joint infection is associated with risk of contamination. *J Clin Microbiol.* 2006 Feb; 44(2):628-31.
78. Monsen T, Lövgren E, Widerström M, Wallinder L. In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections. *J Clin Microbiol.* 2009;47, 2496-501.

79. Portillo ME, Salvado M, Trampuz A, Plasencia V, Rodriguez-Villasante M, Sorli L, et al. Sonication versus vortexing of implants for diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* 2013;51:591-4.
80. Vergidis P, Greenwood-Quaintance KE, Sanchez-Sotelo J, Morrey BF, Steinmann SP, Karau MJ, et al. Implant sonication for the diagnosis of prosthetic elbow infection. *J Shoulder Elbow Surg.* 2011;20:1275-81.
81. Yano MH, Klautau GB, Silva CB, Nigro S, Avanzi O, Mercadante MT, et al. Improved diagnosis of infection associated with osteosynthesis by use of sonication of fracture fixation implants. *J Clin Microbiol.* 2014 December; 52(12): 4176–82.
82. Shen H, Tang J, Wang Q, Jiang Y, Zhang X. Sonication of explanted prosthesis combined with incubation in BD bactec bottles for pathogen-based diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* 2015 Mar;53(3):777-81.
83. Portillo ME, Salvadó M, Trampuz A, Siverio A, Alier A, Sorli L, Martínez S, et al. Improved diagnosis of orthopedic implant-associated infection by inoculation of sonication fluid into blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2015 May;53(5):1622-7.
84. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
85. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology.* 1992 Apr;10(4):413-7.
86. Gomez E, Cazanave C, Cunningham SA, Greenwood-Quaintance KE, Steckelberg JM, Uhl JR, 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 Nov;50(11):3501-8.
87. Krishna NK, Cunnion KM. Role of molecular diagnostics in the management of infectious disease emergencies. *Med Clin North Am.* 2012 Nov;96(6):1067-78.
88. Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Karau MJ, Schmidt SM, Gomez Urena EO, et al. Rapid molecular microbiologic diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* 2013;51: 2280–7.
89. Della Valle C, Parvizi J, Bauer TW, Dicesare PE, Evans RP, Segreti J, et al. Diagnosis of periprosthetic joint infections of the hip and knee. American Academy of Orthopaedic Surgeons. *J Am Acad Orthop Surg.* 2010 Dec;18(12):760-70.

90. <http://appweb2.antt.gov.br/resolucoes/00500/Anexos/ResolucaoAnexo420-20110905.pdf>.
91. Diaz-Ledezma C, Higuera CA, Parvizi J. Success after treatment of periprosthetic joint infection: a Delphi-based international multidisciplinary consensus. *Clin Orthop Relat Res*. 2013; 471:2374–82.
92. Sivaraman KR, Hou JH, Chang JH, Behlau I, Cortina MS, Cruz J de L. Scanning electron microscopic analysis of biofilm formation in explanted human boston type i keratoprostheses. *Cornea*. 2016 Jan;35(1):25-9.
93. Ferreira NO, Andrucio MC, Nelson-Filho P, Zanella EP, Consolaro A, Romano FL, et al. Bacterial biofilm on successful and failed orthodontic mini-implants-a scanning electron microscopy study. *Microsc Res Tech*. 2015 Dez;78(12):1112-6.
94. McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirlif M, et al. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol*. 2014; 9(8): 987-1007.
95. Moojen DJ, van Hellemond G, Vogely HC, Burger BJ, Walenkamp GH, Tulp NJ, et al. Incidence of low-grade infection in aseptic loosening of total hip arthroplasty. *Acta Orthop*. 2010;81:667-73.