

Ministério da Saúde
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

IMPACTO DA OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS NO
DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES ASSOCIADAS AOS IMPLANTES ORTOPÉDICOS

Carla Ormundo Gonçalves Ximenes Lima

Rio de Janeiro

2017



MINISTÉRIO DA SAÚDE

SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE

INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL
HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

IMPACTO DA OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES ASSOCIADAS AOS IMPLANTES ORTOPÉDICOS

Carla Ormundo Gonçalves Ximenes Lima

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientadora: Prof^a. Dr^a Juliana Arruda de Matos

Rio de Janeiro
SETEMBRO/2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

L732i Lima, Carla Ormundo Gonçalves Ximenes.
Impacto da otimização dos métodos microbiológicos no diagnóstico de
infecções associadas aos implantes ortopédicos causadas por anaeróbios /
Carla Ormundo Gonçalves Ximenes Lima — 2017. 100f.

Orientadora: Juliana Arruda de Matos.
Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema
Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2017.

1. Implantes Ortopédicos. 2. Anaeróbios. 3. Infecções Periprotéticas. 4.
Biofilme. 5. Ortopedia. I. Matos, Juliana Arruda de, orient. II. Título.

NLM QT 37



MINISTÉRIO DA SAÚDE

SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE

INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL
HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

IMPACTO DA OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES ASSOCIADAS AOS IMPLANTES ORTOPÉDICOS

Carla Ormundo Gonçalves Ximenes Lima

Juliana Arruda de Matos

Dissertação de Mestrado submetida ao Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Mauro José Costa Salles – Santa Casa – SP

Prof. Dr. Leandro Araújo Lobo – UFRJ

Prof. Dr. Marco Bernardo Cury Fernandes – INTO

Prof. Dr. Diego Pinheiro Aguiar – INTO (revisor)

Profª. Drª. Amanda dos Santos Cavalcanti (suplente)

Rio de Janeiro

SETEMBRO/2017

Para Ana Clara e André Ricardo, meus amores, que tanto suportaram minha ausência. A
vocês todo meu amor.

Para minha querida *mãe*. Obrigada pelo apoio, ensinamentos e todo amor dedicado.

AGRADECIMENTOS

São inúmeros os problemas enfrentados numa Instituição Pública de Saúde. Terminar uma pesquisa diante de tantos obstáculos já é motivo para agradecer, porém é necessário olhar para trás e reconhecer que se não fossem outras mentes envolvidas no mesmo objetivo, nada aconteceria, assim como nada acontece todos os dias em nossas vidas sem a ajuda do outro.

Em primeiro lugar agradeço à Viviani Barreira Marangoni Ferreira, chefe da equipe APATO. Em 2012 acreditou que eu seria capaz de tocar este projeto e mesmo quando pensei em desistir, continuou me incentivando. Todo meu reconhecimento e minha gratidão são traduzidos em cada resultado e cada conquista que alcançamos em nosso serviço, mesmo com tantos problemas que juntas enfrentamos.

À Juliana Arruda de Matos, minha orientadora, que me adotou em meio ao caos e até aqui seguiu, auxiliando e ensinando. Meu carinho, gratidão e reconhecimento por tudo e, principalmente, por vê-la acreditar que ainda conseguimos fazer algo para ajudar os nossos pacientes.

À Regina Maria Cavalcanti Pilloto Domingues, chefe do Laboratório de Biologia dos Anaeróbios e minha orientadora. Abriu todas as portas com carinho e me acolheu. Sem você e sua generosidade não teria feito nada.

A todos da equipe APATO. Poucos, mas extremamente competentes e dispostos a ajudar. TODOS contribuíram ao longo desta jornada com detalhes imprescindíveis à realização. Um carinho especial à Marcia Campos Silva, minha amiga e grande incentivadora. Sem ela, muitas coletas não aconteceriam.

À Isabelly Fernanda da Silva, minha querida estagiária e companheira nesta empreitada, sendo fundamental em todas as etapas.

À Aurea Yukie Higa e Lucia Rodrigues Serradas, eternas chefes e colaboradoras de todas as conquistas até aqui realizadas. Só tenho a agradecer.

A todos do Laboratório de Biologia dos Anaeróbios da UFRJ. Lugar de gente querida e incentivadora. Com portas abertas me receberam e acolheram. Um agradecimento mais que especial à Mayara Gil de Castro que muito me ajudou doando seu tempo para contribuir nas análises. Eliane de Oliveira Ferreira, Camila Nunes, Leandro Carneiro e Karla, amigos e motivadores em todos os momentos.

À Silvia, chefe da Central de Esterilização de Materiais e todos os profissionais do setor, por todas as vezes que cuidaram com carinho da esterilização dos frascos e por todas as vezes que me atenderam em minhas solicitações. Fundamentais neste processo.

Aos residentes do grupo do quadril e joelho Elton Andreola, Lucas e Breno. Vocês foram fundamentais neste trabalho. Aos *Staffs* Marco Bernardo Cury Fernandes e Artur Shioji por todo apoio prestado.

À enfermeira Amanda da Silva Gomes pela ajuda na confecção das tabelas.

RESUMO

LIMA, Carla Ormundo Gonçalves Ximenes. Impacto da otimização dos métodos microbiológicos no diagnóstico de infecções associadas aos implantes ortopédicos. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Ministério da Saúde, 2017. **Palavras-chave:** Implantes ortopédicos, anaeróbios, infecções periprotéticas, biofilme.

Os implantes ortopédicos propiciam melhor qualidade de vida a pacientes com doenças osteoarticulares graves, porém 5% dos casos evoluem com falha. Tanto o diagnóstico entre falha asséptica e infecção associada ao implante ortopédico (IAIO) quanto o manejo clínico e cirúrgico das IAIO dependem da identificação do agente etiológico. No entanto, os protocolos convencionais de cultura apresentam resultado falso negativo num elevado percentual dos casos, além de serem inadequados para o isolamento de anaeróbios estritos. Os objetivos do presente estudo são estimar a prevalência de anaeróbios estritos nas IAIO, descrever os pacientes com IAIO provocadas por estes microorganismos, e comparar o desempenho de um protocolo de cultura otimizado, incluindo a cultura do fluido do vortex do implante, com um protocolo convencional de cultura para o diagnóstico das IAIO. Trata-se de um estudo transversal com coleta prospectiva de dados, espécimes clínicos e implantes ortopédicos dos pacientes submetidos às cirurgias de revisão do implante. O protocolo experimental consistiu em semeadura imediata em meio tioglicolato no centro cirúrgico, maceração dos tecidos com pérolas de vidro, prolongamento do tempo de incubação para 14 dias, uso de atmosfera anaeróbia estrita e cultura do fluido do vortex do implante. IAIO foi definida com base nos critérios diagnósticos propostos pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas para as infecções associadas às artroplastias. Um total de 66 pacientes foram incluídos na análise final. Dos 35 pacientes com diagnóstico de infecção confirmada, 11 tiveram isolamento de anaeróbios estritos [prevalência=31,4% (IC95% 16,9%-49,3%)]. Desses, 8 eram *Propionibacterium acnes*, e os demais foram *Clostridium bifermentans*, *Parabacteroides distasonis* e *Bacteroides fragilis*. Quatro pacientes apresentaram infecção confirmada por anaeróbios estritos exclusivamente, e diferiram dos pacientes com infecção por microrganismos facultativos e daqueles com falha asséptica quanto ao sexo (masculino 0% vs. 55% vs. 72%, respectivamente). As pacientes com infecção por anaeróbio estrito apresentaram ainda maior frequência de leucocitose em sangue periférico e valores de VHS mais elevados do que os pacientes com falha asséptica. O protocolo de cultura otimizado apresentou sensibilidade e acurácia superiores aos do protocolo de cultura convencional, sem prejuízo da especificidade. A cultura do fluido do vortex da prótese apresentou sensibilidade maior e menor especificidade em relação à cultura otimizada de espécimes clínicos, porém a diferença não foi estatisticamente significativa. Os resultados sugerem um papel importante dos anaeróbios na etiologia da IAIO e a superioridade do protocolo otimizado de cultura de espécimes clínicos em relação ao convencional.

Palavras-chave: Implantes ortopédicos, anaeróbios, infecções periprotéticas, biofilme.

ABSTRACT

LIMA, Carla Ormundo Gonçalves Ximenes. Impact of optimization of microbiological methods in the diagnosis of infections associated with orthopedic implants Rio de Janeiro, 2017. Dissertation (Master in Applied Sciences to the Musculoskeletal System) - National Institute of Traumatology and Orthopedics, Ministry of Health, 2017.

Orthopedic implants provide a better quality of life for patients with severe osteoarticular diseases, but failure develops in 5% of cases. Both the diagnosis between aseptic failure and infection associated with orthopaedic implant (IAIO) and the surgical and clinical management of IAIO depend on the identification of the etiologic agent. However, conventional culture protocols present false negative results in a high percentage of cases, besides being unsuitable for the isolation of strict anaerobes. The aims of the present study are to estimate the prevalence of strict anaerobes in IAIO, to describe patients with IAIO caused by these agents, and to compare the performance of an optimized culture protocol, including culture of the implant vortex fluid, with a standard culture protocol for the diagnosis of IAIO. This is a cross-sectional study with prospective collection of data, clinical specimens and orthopaedic implants of patients submitted to implant revision surgeries. The experimental protocol consisted of immediate seeding of clinical specimens in thioglycollate medium in the operating room, maceration of tissues with glass beads, prolongation of the incubation time to 14 days, use of anaerobic atmosphere and culture of the implant vortex fluid. IAIO was defined based on the diagnostic criteria proposed by the American Society of Infectious Diseases for prosthetic joint infections. A total of 66 patients were included in the final analysis. Of the 35 patients diagnosed with confirmed infection, 11 had strict anaerobe isolation [prevalence = 31.4% (95% CI: 16.9% -49.3%)]. Of these, 8 were *Propionibacterium acnes*, and the others were *Clostridium bifermentans*, *Parabacteroides distasonis* and *Bacteroides fragilis*. Four patients had confirmed infection by strict anaerobes exclusively, and differed from the patients with infection by facultative microorganisms and those with aseptic failure regarding gender (male 0% vs. 55% vs. 72%, respectively). Patients with strict anaerobic infection had an even higher frequency of leukocytosis in peripheral blood and higher ESR values than patients with aseptic failure. The optimized culture protocol showed higher sensitivity and accuracy than the conventional culture protocol, without compromising specificity. The culture of the prosthesis vortex fluid presented higher sensitivity and lower specificity than the optimized culture of clinical specimens, but the difference was not statistically significant. The results suggest an important role of anaerobes in the etiology of IAIO and the superiority of the optimized protocol of culture of clinical specimens in relation to the conventional one.

Keywords: orthopaedic implants, prosthetic joint infection, biofilms, anaerobic, anaerobic prosthetic joint infection

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. IMPLANTES ORTOPÉDICOS.....	1
1.2. CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DAS IAIO.....	4
1.3. PATOGÊNESE DAS IAIO.....	8
1.3.1. BIOFILME.....	10
1.3.2. IMPORTÂNCIA DO BIOFILME NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS IAIO.....	12
1.4. MICROBIOLOGIA DAS IAIO.....	14
1.5. DIAGNÓSTICO DAS IAIO.....	20
1.6. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO.....	22
1.6.1. CULTURA DO FLUIDO SINOVIAL.....	22
1.6.2. CULTURA DO TECIDO PERIPROTÉTICO.....	24
1.6.3. SONICAÇÃO E VORTEX DO IMPLANTE.....	29
1.6.4. MÉTODOS MOLECULARES.....	32
1.7. IAIO E CULTURA MICROBIOLÓGICA NEGATIVA.....	33
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	36
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4. PACIENTES E MÉTODOS.....	38
4.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	38
4.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	38
4.3. POPULAÇÃO DO ESTUDO	38
4.4. LOCAL DO ESTUDO.....	39
4.5. DADOS CLÍNICOS.....	39
4.6. COLETA E TRANSPORTE DOS FRAGMENTOS DE TECIDO PERIPROTÉTICO.....	40
4.7. PROCESSAMENTO E CULTIVO DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS.....	42
4.8. IDENTIFICAÇÃO E TESTE DE SENSIBILIDADE	43
4.9. COLETA, TRANSPORTE E PROCESSAMENTO DOS IMPLANTES.....	44
4.10. CONTROLE DE QUALIDADE DOS INSUMOS.....	46
4.11. PROCEDIMENTOS MICROBIOLÓGICOS DE ROTINA (GRUPO CONTROLE)	46
4.12. TAMANHO AMOSTRAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5. RESULTADOS	49
5.1. DEFINIÇÕES UTILIZADAS NO PROCESSO DE ANÁLISE DOS DADOS.....	51
5.2. PERFIL MICROBIOLÓGICO DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS E IMPLANTES SUBMETIDOS AO PROTOCOLO OTIMIZADO DE CULTURA	52
5.3. PERFIL MICROBIOLÓGICO DA CULTURA DE TECIDO OTIMIZADA <i>VERSUS</i> CULTURA DO FLUIDO DO VORTEX	57
5.4. PREVALÊNCIA DE ANAERÓBIOS ESTRITOS DE ACORDO COM OS CRITÉRIOS ESTABELECIDOS	58
5.5. COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DE PACIENTES COM IAIO CAUSADA EXCLUSIVAMENTE POR ANAERÓBIOS ESTRITOS, SEM INFECÇÃO (FALHA ASSÉPTICA) E COM INFECÇÃO CAUSADA POR MICRORGANISMOS FACULTATIVOS E COM FALHA ASSÉPTICA.....	63
5.6. COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DA CULTURA OTIMIZADA (PROTOCOLO EXPERIMENTAL) <i>VERSUS</i> CULTURA CONVENCIONAL (CONTROLE) DE ESPÉCIMES CLÍNICOS INTRAOPERATÓRIOS NO DIAGNÓSTICO DE IAIO.....	67

5.7. COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DA CULTURA OTIMIZADA DE ESPÉCIMES CLÍNICOS INTRAOPERATÓRIOS <i>VERSUS</i> CULTURA DE VORTEX DO IMPLANTE NO DIAGNÓSTICO DE IAIO.....	69
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÃO.....	80
8. RECOMENDAÇÕES.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXOS	95

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>agr</i>	Gene regulador acessório
AnE	Anaeróbio estrito
BGN	Bacilo Gram negativo
BGP	Bacilo Gram Positivo
BHI	Brain Heart Infusion
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEMATE	Central de esterilização de materiais
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
FA	Falha asséptica
Fac	Facultativo
IDSA	Infectious Disease Society of America
IL-6	Interleucina 6
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
IPA	Infecção associada à prótese articular
KHz	Kilohertz
MALDI-TOF	Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization – Time of Flight
MRSA	Methicillin - resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Mass Spectrometry
MSIS	Musculoskeletal Infection Society
PCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PCR-t	Proteína C reativa
pH	Potencial hidrogeniônico
PO ₂	Pressão parcial de oxigênio
QS	Quorum sensing
RNA	Ácido ribonucleico

rpm	Rotações por minuto
SAPHO	Sinovite, Acne, Pustulose, Hiperostose e Osteíte
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
SCV	Small-colony variants
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC	Unidade formadora de colônia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VHS	Velocidade de hemossedimentação das hemácias
XG	Força gravitacional

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Meio de cultura tioglicolato contendo espécimes clínicos (antes da agitação).....	41
Figura 2. Meio de cultura tioglicolato contendo espécimes clínicos (após agitação).	41
Figura 3. Maleta para transporte dos espécimes clínicos.	42
Figura 4. Tioglicolato contendo espécime clínico sendo submetido ao vortex.	42
Figura 5. Frascos de polipropileno preparados para o armazenamento de implantes. Visão superior do recipiente antes da esterilização (A), recipiente estéril preparado para armazenamento do implante (B).	45
Figura 6. Tempo de positividade dos espécimes para microrganismos anaeróbios estritos.....	55
Figura 7. Tempo de positividade dos espécimes para microrganismos facultativos.....	55

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1. Critérios de definição das IAIO pós artroplastia.	7
Tabela 2. Características clínicas e demográficas da população do estudo.	50
Tabela 3. Grupos criados com base nos critérios IDSA para definição de infecção.	51
Tabela 4. Visão geral dos resultados do diagnóstico microbiológico pelo protocolo otimizado de cultura.	52
Tabela 5. Espécies de anaeróbios estritos isoladas.	53
Tabela 6. Distribuição dos microrganismos isolados dos 66 pacientes submetidos ao protocolo otimizado de cultura (N=60).	54
Tabela 7. Tempo de incubação necessário para o isolamento de acordo com o microrganismo isolado, diagnóstico e espécime clínico.	56
Tabela 8. Resultados observados nos três métodos: cultura otimizada de espécimes clínicos, cultura do fluido do vortex da prótese, cultura convencional de espécimes clínicos, diagnóstico de falha, número de espécimes positivos nos métodos e articulação.	59
Tabela 9. Pacientes com infecção por anaeróbios estritos - sumário dos resultados do protocolo de cultura otimizado e classificação da infecção.	62
Tabela 10. Características demográficas e clínicas dos pacientes no estudo e de acordo com a etiologia da falha (asséptica vs infecção exclusivamente por anaeróbio estrito vs. infecção por algum facultativo) - variáveis categóricas.	65
Tabela 11. Características demográficas e clínicas dos pacientes no estudo de acordo com a etiologia da falha (asséptica vs. infecção exclusivamente por anaeróbio estrito vs. infecção por algum facultativo) - variáveis contínuas.	66
Tabela 12. Desempenho da cultura dos espécimes clínicos intraoperatórios (tecido e líquido articular), comparando protocolo experimental com protocolo convencional.	68
Tabela 13. Desempenho da cultura do vortex do implante e da cultura otimizada dos espécimes clínicos intraoperatórios (tecido e líquido articular) (N=40).	70

Quadro 1 Tipos de espécimes clínicos coletados por grupos.....	40
--	----

1 INTRODUÇÃO

1.1 Implantes Ortopédicos

No mundo inteiro é cada vez mais frequente o uso de implantes ortopédicos, principalmente próteses de quadril e joelho e as artrodeses de coluna (LIMA e OLIVEIRA, 2010; WALDROP et al., 2015). O aumento da prevalência de patologias articulares associadas à obesidade e ao envelhecimento da população, tais como osteoartrite, fraturas de colo de fêmur e doença degenerativa da coluna vertebral, são fatores importantes que contribuem para a maior utilização deste tipo de intervenção (PEREIRA et al., 2010; FEHLINGS et al., 2015).

Quando o procedimento é bem-sucedido, promove alívio da dor, recupera a mobilidade e autonomia do paciente e, conseqüentemente, ocorre melhora global na sua qualidade de vida (MOHAJER e DAROUICHE, 2014; TANDE e PATEL, 2014). Nos Estados Unidos, em 2010, foram realizadas 332.000 cirurgias para implante de próteses de quadril e 719.000 cirurgias para implantes de próteses de joelho. Até 2030, estima-se que 572.000 artroplastias de quadril e quase 3.5 milhões de artroplastias de joelho sejam realizadas (TANDE e PATEL, 2014). Em número menor, porém cada vez mais frequente, estão as próteses articulares do ombro, cotovelo, punho e articulação temporomandibular (LIMA e OLIVEIRA, 2010). Ainda nos EUA, entre 2004 e 2011, o número de artrodeses de coluna com mais de 3 níveis para tratamento de deformidade de coluna em adultos com mais de 60 anos aumentou de 6.897 para 17.792 por ano, representando um aumento de 138% (WALDROP et al., 2015). No Brasil ainda não existem dados publicados acerca do total de artroplastias realizadas, mas de acordo com o DATASUS¹, de 2014 a 2016 foram feitas pelo SUS, mais de 30.000 artroplastias primárias de quadril e mais de 20.000 artroplastias totais de joelho.

¹Relatório de gestão anual: 2014, 2015, 2016

A maioria das cirurgias para implante de próteses ortopédicas são bem-sucedidas. No entanto, cerca de 5% dos pacientes submetidos a artroplastia de joelho e quadril evolui com falha do implante em 10 anos, sendo necessária uma nova abordagem cirúrgica nesses casos (ULRICH et al., 2008; KHAN et al., 2016). O percentual de artrodeses primárias de coluna que evoluem com falha necessitando revisão cirúrgica é muito variável, dependendo da patologia, número de níveis operados e da técnica cirúrgica, sendo relatados na literatura índices de 4 a 45% em 2 a 5 anos (MOK et al., 2009; ASHER et al., 2010; PICHELMANN et al., 2010). Cirurgias de revisão podem ocorrer como consequência de falhas mecânica/asséptica ou infecciosa (PORTILLO et al., 2013b). As causas não infecciosas são responsáveis pela maior parte das falhas, e podem ocorrer devido à perda da fixação cimento-osso, fratura periprotética, fratura, desgaste e instabilidade do material protético (TANDE e PATEL, 2014). Por outro lado, a infecção é responsável por cerca de 15% dos casos de falha das artroplastias e 15 a 35% das falhas das artrodeses de coluna (MOK et al., 2009; PICHELMANN et al., 2010). Os fatores de risco para falha infecciosa são divididos em fatores do hospedeiro, perioperatórios e do próprio implante. Dentre os fatores do hospedeiro já relacionados com maior risco de infecção periprotética estão a idade, desnutrição, tabagismo, doença articular subjacente (como artrite reumatóide ou psoriática), obesidade, diabetes mellitus, neoplasia, infecção do sítio cirúrgico, infecção articular prévia, bacteremia, infecções recorrentes do trato urinário, infecção pelo vírus HIV, tabagismo, dentre outros (ZIMMERLI, 2006; ASLAM e DAROUICHE, 2012). Em pacientes com artrite reumatóide o risco aumenta quase três vezes quando comparado com aqueles que apresentam osteoartrite idiopática (ASLAM e DAROUICHE, 2012).

A presença do implante gera uma imunodeficiência local, possivelmente em virtude da interação dos granulócitos com materiais não fagocitáveis como a superfície do implante ou com partículas de desgaste liberadas, que podem prejudicar a função destas células, tornando-as ineficientes no microambiente periprotético. Como exemplo, já foi demonstrado que

granulócitos ao redor do implante se tornam incapazes de destruir o microrganismo estafilococo de modo eficiente e, mesmo ocorrendo a opsonização, eles são ineficientemente digeridos. Os granulócitos ficam parcialmente degranulados com diminuição na produção de superóxido desmutase, o que prejudica a defesa do hospedeiro (ZIMMERLI e SENDI, 2011). Com isso, o inóculo bacteriano necessário para causar infecção fica reduzido de 100 a 100.000 vezes (LIMA e OLIVEIRA, 2010). Segundo estudos utilizando modelo animal, cerca de 100 unidades formadoras de colônias (UFC) de *Staphylococcus aureus* são necessárias para infectar um implante, ao passo que 10^4 UFC de microrganismos são necessárias quando não existe implante (SOUTHWOOD et al., 1985).

Além dos fatores inerentes ao hospedeiro e dos relacionados ao implante já mencionados, o tempo do procedimento cirúrgico e o tipo de procedimento podem aumentar o risco de infecção, como ocorre em casos onde a artroplastia além de bilateral é simultânea, nas cirurgias de revisão implantes ou nas artrodeses de coluna por via posterior (KURTZ et al., 2010; CHAHOUD et al., 2014; URIBE e DEUKMEDJIAN, 2015). Segundo estudos publicados, a taxa de infecção pós artroplastia primária varia de 1% a 9% dependendo do procedimento realizado, sendo menor que 1% em artroplastias do quadril e do ombro, em torno de 2% nas próteses de joelho e 9% em próteses de cotovelo (GALLO et al., 2003; SIA et al., 2005; ASLAM e DAROUICHE, 2012; MOHAJER e DAROUICHE, 2014; ARCIOLA et al., 2015). Após a realização de procedimentos de revisão essas taxas aumentam para 3% nas artroplastias do quadril e 6% nas artroplastias do joelho (SIA et al., 2005) e podem chegar até 40% (MOHAJER e DAROUICHE, 2014). A maioria dos casos de infecção ocorrem dentro dos primeiros 2 anos após a realização do procedimento cirúrgico (PULIDO et al., 2008; KURTZ et al., 2010).

As IAIO acarretam transtorno físico e emocional. Seu tratamento é complexo, envolvendo a necessidade de novos procedimentos cirúrgicos e uso de antibioticoterapia

prolongada. No caso das IAIO pós artroplastias, as opções vão desde a modalidade mais conservadora, o desbridamento com retenção de prótese, reservada para casos selecionados, à menos conservadora troca em dois tempos, na qual a prótese infectada é retirada num primeiro ato cirúrgico, e um novo implante é colocado após um intervalo que pode variar de algumas poucas semanas a meses. Uma opção intermediária, associada a melhores desfechos funcionais que a troca em dois tempos, e maior taxa de cura do que o desbridamento com retenção, é a troca da prótese infectada por uma nova num único tempo cirúrgico (troca em tempo único), reservada em linhas gerais, para os pacientes com boas condições de pele e partes moles e com agentes etiológicos conhecidos e sensíveis a antimicrobianos com ação em biofilme. No entanto, muitos casos evoluem com falha terapêutica, sendo necessário o emprego das cirurgias de salvamento tais como as artrodeses e as amputações (TANDE e PATEL, 2014).

Além da elevada morbidade, deve-se considerar também o impacto econômico das IAIO. Nos EUA, o custo anual estimado acumulado para cirurgias de revisão de artroplastia por razões infecciosas ultrapassa 500 milhões de dólares e pode passar de 1 bilhão em 2020 (ARCIOLA et al., 2015). As cirurgias por razões não infecciosas apresentam sempre custos menores do que aquelas que ocorrem em decorrência de infecção, já que as últimas estão associadas a aumento do tempo cirúrgico, maior utilização de enxerto ósseo, aumento de complicações, maior tempo de internação e uso de antimicrobianos (ASLAM e DAROUICHE, 2012; MOHAJER e DAROUICHE.,2014).

1.2. Critérios Diagnósticos da IAIO

Existe grande dificuldade em se estabelecer um diagnóstico padronizado das IAIO. Vários grupos, incluindo a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA- *Infectious Disease Society of America*) e a Sociedade Musculoesquelética de Infecção (MSIS- *Musculoskeletal Infection Society*) publicaram critérios para definição de IAIO pós artroplastias

(PARVIZI et al., 2011; OUSSEDIK et al., 2012; OSMON et al., 2013). De acordo com a MSIS, a evidência definitiva de IAIO pós artroplastias é caracterizada pela presença de fistula em comunicação com a prótese ou a presença do mesmo microrganismo em dois espécimes de tecido periprotético ou líquido articular. Além disso, existem seis critérios que são conhecidos como critérios menores: pus ao redor da prótese, inflamação aguda no exame histológico do tecido periprotético, presença de microrganismo em um único espécime clínico, contagem de leucócitos e percentual de neutrófilos elevados no líquido articular, aumento dos valores da velocidade de hemossedimentação (VHS) e proteína C reativa (PCR-t) no soro. A presença de quatro ou mais critérios menores também preenche os critérios diagnósticos (PARVIZI et al., 2011). Da mesma forma, a IDSA considera a presença de fistula ou o isolamento do mesmo microrganismo em dois espécimes intraoperatórios, ou um pré-operatório e um intraoperatório, como critério definitivo. A diferença é que a presença de pus ao redor da prótese, sem outra etiologia conhecida, é considerada um critério definitivo de infecção, enquanto pela MSIS, este é um critério menor. São dois os critérios menores considerados pela IDSA: inflamação aguda no exame histológico do tecido periprotético e microrganismo virulento isolado em um único espécime. A presença de algum desses fatores menores seria altamente sugestiva de ou poderia representar infecção (OSMON et al., 2013).

Em agosto de 2013, na Filadélfia, 342 especialistas de 50 Países representando 160 Sociedades Científicas estiveram reunidos afim de estabelecer um consenso sobre prevenção, diagnóstico e tratamento da infecção periprotética. Os seguintes critérios definitivos foram estabelecidos: pus ao redor da prótese e presença do mesmo microrganismo em dois espécimes clínicos (GOMEZ e PARVIZI, 2015). A presença de três entre os seguintes critérios menores também define IAIO pós artroplastias: inflamação aguda no exame histológico do tecido periprotético, presença de microrganismo em apenas um espécime clínico, contagem de leucócitos elevada ou teste de estearase leucocitária positivo (++) no líquido articular, elevado

percentual de neutrófilos no líquido articular e valores elevados de VHS e PCR-t no soro (TANDE e PATEL, 2014). Um dos principais resultados deste encontro foi a modificação da definição de IAIO pós artroplastia pela MSIS e a inclusão do teste de estearase leucocitária como critério menor (GOMEZ e PARVIZI, 2015) (**Tabela 1**). Até onde foi possível averiguar, não existem diretrizes de consenso estabelecidas por essas mesmas entidades para o diagnóstico das IAIO pós artrodese de coluna, havendo diversas definições descritas na literatura (GEROMETTA et al., 2012; CHAHOUD et al., 2014).

Tabela 1. Critérios de definição das IAIO pós artroplastia.

Critérios	Definição de Infecção Periprotética					
	Sociedade Musculoesquelética de Infecção		Sociedade Americana de Doenças Infecciosas		Consenso Internacional	
	Definitivos	Menores	Definitivos	Menores	Definitivos	Menores
Fístula em comunicação com a prótese	Sim		Sim		Sim	
Mesmo microrganismo isolado em 2 ou mais espécimes	Sim		Sim		Sim	
Pus ao redor da prótese		Sim	Sim			Sim
Inflamação aguda no exame histopatológico do tecido periprotético		Sim	Sim	Sim		Sim
Cultura única com qualquer microrganismo		Sim				Sim
Cultura única com microrganismo virulento				Sim		
Contagem de leucócitos elevada no fluido sinovial		Sim				Sim
Percentual de neutrófilos elevado no fluido sinovial		Sim				Sim
Valores de VHS e PCR-t elevados no soro		Sim				Sim

(Adaptado de Tande e Patel, 2014).

1.3 Patogênese das IAIO

A patogênese das IAIO está diretamente relacionada à uma tríade que envolve microrganismo, implante ortopédico e hospedeiro (ZIMMERLI, 2006b). A contaminação pode acontecer de três maneiras: pelo contato direto ou formação de aerossol na prótese e/ou no tecido periprotético durante a cirurgia, a partir de um foco infeccioso em sítio adjacente e através da via hematogênica (TANDE e PATEL, 2014).

O contato direto do microrganismo ou formação de aerossol ocorre através de uma fonte endógena (como a microbiota cutânea do paciente), ou exógena (microbiota dos membros da equipe cirúrgica, do ambiente e até pela utilização de implantes contaminados) (LIMA e OLIVEIRA, 2010). Uma vez em contato com o dispositivo, os microrganismos colonizam a superfície do implante. As infecções que se manifestam até 1 ano após a cirurgia geralmente ocorrem por esse mecanismo (TANDE e PATEL, 2014). Um segundo mecanismo conhecido é a contaminação a partir de um foco infeccioso em sítio adjacente. Pode ocorrer logo após o período pós-operatório, quando uma infecção superficial do sítio cirúrgico evolui e atinge o implante, ou tardiamente, se o paciente apresentar infecção de pele e partes moles periimplante (CORVEC et al., 2012). A terceira via envolvida na contaminação do implante é a hematogênica (ASLAM e DAROUICHE, 2012; MOHAJER e DAROUICHE, 2014). De acordo com a literatura, este modo de contaminação é raro e apresenta uma incidência global de 0,1% a 0,6% (SENDI et al., 2011). De um total de 551 infecções que ocorreram em 6.101 artroplastias de quadril e joelho, somente 7 foram diagnosticadas como infecção através da via hematogênica (UÇKAY et al., 2009). Os focos primários mais frequentemente envolvidos na bacteremia são o trato respiratório, cutâneo, urinário, dentário e gastrointestinal (LIMA e OLIVEIRA, 2010).

De acordo com o tempo entre a realização da cirurgia e o início dos sinais e sintomas, as IAIO pós artroplastia podem ser classificadas em precoces ou agudas (até 3 meses após a cirurgia), intermediárias (3-24 meses) e tardias (> 24 meses) (MOHAJER e DAROUICHE, 2014). Alguns autores classificam como precoces aquelas que ocorrem até 3 meses, intermediárias (3-12 meses) e tardias (> 12 meses) (LEGOUT e SENNEVILLE, 2013). Nas infecções precoces, os microrganismos normalmente são virulentos (*Staphylococcus aureus* e bacilos gram negativos (BGN), por exemplo), introduzidos no momento da cirurgia e o paciente apresenta dor, febre, derrame articular, fistula com saída de secreção purulenta e eritema no local do implante. Nas infecções intermediárias, os sinais clínicos quase não são observados, os microrganismos são menos virulentos (*Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) e *Propionibacterium acnes*, por exemplo), sendo a dor forte e persistente o sintoma mais marcante. Outra característica é o afrouxamento precoce do implante e uma pequena fistula que abre e fecha no curso da infecção. Acredita-se que esse tipo de infecção ocorra pela introdução de microrganismos de baixa virulência durante o ato cirúrgico, o que leva ao quadro insidioso descrito, e que muitas vezes é classificado como falha asséptica. As infecções classificadas como tardias normalmente ocorrem através da via hematogênica e assim como nas infecções precoces, os microrganismos envolvidos geralmente são virulentos. Algumas infecções tardias pela via hematogênica também são causadas por microrganismos pouco virulentos (LEGOUT e SENNEVILLE, 2013; SHAH et al., 2015; KAUFMAN et al., 2016).

Nas IAIO pós artrodese de coluna, alguns autores também adotam o critério de início dos sintomas até 90 dias após a cirurgia para diferenciar as infecções agudas das não agudas, embora outros adotem outros pontos de corte como 30 dias ou 6 meses. À exemplo das IAIO pós artroplastias, nas IAIO pós artrodese de coluna os microrganismos menos virulentos, como *P. acnes* e SCN, são mais descritos nas infecções de início mais tardio e de evolução indolente (GEROMETTA et al., 2014; CHAHOUD et al., 2014).

1.3.1. Biofilme

O biofilme é definido como uma comunidade de microrganismos embebidos em uma matriz estrutural normalmente aderida a um substrato subjacente (MCCONOUGHIEY et al., 2014). Pode ser monomicrobiano ou polimicrobiano, porém, mesmo os monomicrobianos, principalmente os mais antigos, podem ser constituídos por subpopulações do mesmo microrganismo com características fenotípicas e genotípicas diferentes. Alguns microrganismos crescem melhor na presença de outros e isto pode influenciar as espécies que são encontradas no implante (TANDE e PATEL, 2014). Há uma coexistência de microrganismos com diferentes necessidades formando nichos microecológicos que se adaptam às mais diferentes concentrações de oxigênio, nutrientes e subprodutos metabólicos. É possível que ocorra uma grande alteração do ambiente onde o biofilme é formado provocada por microrganismos, como por exemplo num biofilme dental, onde condições fisiológicas normais são alteradas para um ambiente totalmente ácido e anaeróbio (OHLE et al., 2010).

Estima-se que 65% de todas as infecções relacionadas a cuidados com a saúde, sejam elas associadas ou não a dispositivos médicos, sejam causadas por microrganismos que formam biofilme (POZO e PATEL, 2009). As IAIO estão diretamente ligadas à formação de biofilme (HOWLIN et al., 2017). Numa IAIO, o biofilme bacteriano pode se aderir a qualquer componente do dispositivo, seja cimento, osso e/ou tecido fibroso (STOODLEY et al., 2011). Mais de 75% dos dispositivos médicos originários de infecções ortopédicas apresenta biofilme formado por *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* (MCCONOUGHIEY et al., 2014).

No momento que o implante é introduzido no corpo humano, é recoberto por um “filme” composto de frações sanguíneas (eritrócitos, trombócitos, macromoléculas) e proteínas ligadoras. Características da superfície do implante, como hidrofiliabilidade e rugosidade, interações físicas e químicas como força de Vand der Waals, interações eletrostáticas e

hidrofóbicas, proteínas conhecidas como autolisinas, com função adesiva e enzimática, facilitam a adesão do microrganismo. Além disso, fatores relacionados à imunidade do hospedeiro, número de microrganismos e suas características genéticas, influenciam na colonização satisfatória do implante (GALLO et al., 2003; ARCIOLA et al., 2015).

Os microrganismos planctônicos uma vez aderidos à superfície do implante tornam-se sésseis e começam a produzir uma matriz extracelular polimérica. Ela é composta por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. Fatores associados à matriz (exopolissacarídeos) e a presença de estruturas como pili e flagelo bacteriano interferem na formação e maturação deste biofilme. A motilidade afeta a formação do biofilme por permitir que o microrganismo alcance a superfície adequada (o que não aconteceria em condições estáticas) e por promover o recrutamento de células planctônicas para dentro do biofilme (HOURY et al., 2010). A estrutura neste primeiro momento é menos estável e mais susceptível à ação dos antimicrobianos (HØIBY et al., 2011), porém, na fase de maturação as bactérias tornam-se mais resistentes a esta atividade antimicrobiana quando a matriz extracelular polimérica funciona como uma barreira, limitando a difusão de substâncias químicas dentro e fora do biofilme. Além disso, com a proximidade e alta densidade celular, cria-se um ambiente favorável para a comunicação célula-célula conhecida como *Quorum sensing* (QS). Esta comunicação se baseia em um mecanismo de regulação da transcrição de genes bacterianos em resposta à densidade populacional. Em biofilmes produzidos pelo gênero *Staphylococcus*, por exemplo, o QS é realizado por um peptídeo auto-indutor secretado por células bacterianas. Assim como ocorre com o agregado de bactérias, este peptídeo extracelular atinge uma concentração limiar e começa a se ligar a um receptor de membrana, iniciando uma cascata de sinalização que resulta na expressão de um RNA regulatório. Este efetor ativa o gene regulador acessório (*agr*) com a consequente expressão de fatores de virulência secretados. Mutações em *agr* também causam redução da dispersão, levando a um aumento da formação do biofilme. Já os microrganismos

gram-negativos como *P. aeruginosa* utilizam um sistema QS diferente, mediado por moléculas sinalizadoras da família homoserina lactona. Um acúmulo de agentes QS além de uma concentração limiar é acompanhada por aumento na formação de biofilme e fatores de virulência secretados. A proximidade das células dentro do biofilme propicia a transferência de genes horizontais, o que pode permitir a transmissão de genes de virulência dentro do biofilme, além daqueles responsáveis pela resistência aos antibióticos (LINA et al., 1998; BOLES e HORSWILL, 2008; GALLOWAY et al., 2012). A forma como o biofilme cresce e amadurece gera consequências para células que estão em seu interior. Os microrganismos presentes na porção externa do biofilme consomem os nutrientes (oxigênio e glicose), de modo que aqueles que permanecem em seu interior ficam desprovidos destas substâncias e poderão entrar em um estado metabolicamente inativo. Este estado os torna altamente resistentes à ação de antibióticos (WOOD et al., 2013). Além do papel que o QS desempenha no processo de maturação, ele também está envolvido no desprendimento do microrganismo deste biofilme maduro, de modo que a infecção se dissemina no hospedeiro. Isto poderá resultar em episódios de infecções agudas que aparecem após exacerbação de um processo crônico subjacente (MCCONOUGHIEY et al., 2014).

1.3.2. Importância do Biofilme no Diagnóstico e tratamento das IAIO

O diagnóstico e tratamento das IAIO constituem um grande desafio. Os métodos de cultura convencionais são capazes de detectar microrganismos planctônicos (livres, em meio líquido na natureza), mas muitas vezes não detectam microrganismos sésseis (no biofilme). O diagnóstico pode estar seriamente comprometido devido à dificuldade que existe em separar e coletar células do biofilme e também pela dificuldade na produção de colônias em agar sólido por células bacterianas desenvolvidas na superfície dos tecidos (OHLE et al., 2010; HØIBY et al., 2011; ARCIOLA et al., 2015). Muitas vezes o patógeno que é isolado *in vitro*, através da

cultura, não reflete necessariamente o estado de crescimento *in vivo*. As infecções agudas normalmente são causadas por microrganismos planctônicos, facilmente recuperados dos espécimes, pois estão tipicamente presentes em fluidos e tecidos em elevadas concentrações. O contrário acontece quando a infecção é crônica, pois o fenótipo do microrganismo que está envolvido no processo é o de biofilme, onde este se encontra num estado quiescente, metabolicamente inativo, pela limitação de nutrientes. O biofilme normalmente encontra-se fragmentado, irregular e pode não ser recuperado em espécimes clínicos do tipo fluido, *swab* ou biópsia de tecido. *In vitro*, em uma simples cultura, o biofilme é detectado apenas 30% das vezes, portanto, melhorar os métodos de detecção de microrganismos em biofilmes é extremamente importante (MCCONOUGHIEY et al., 2014).

A resistência aos antimicrobianos é considerada um grande problema para o tratamento das infecções causadas por microrganismos que produzem biofilme. Muitas vezes eles não são capazes de penetrar além de camadas superficiais do biofilme ou sua ação é prejudicada em ambientes onde haja acúmulo de resíduos ou em ambiente alterado (pH, PCO₂, PO₂, etc). Podem ainda ser aprisionados e destruídos por enzimas na matriz do biofilme. Existe uma taxa de crescimento alterada no interior do biofilme e o antimicrobiano pode não ser capaz de atuar contra microrganismos que não estejam em crescimento (fase estacionária) ou ainda metabolicamente inativas (células persistentes) (POZO e PATEL, 2007). Comparados aos microrganismos planctônicos, eles apresentam maior chance de sofrerem mutações e transferência horizontal de genes. Bombas de efluxo, enzimas que degradam antimicrobianos, perda de afinidade por antibióticos alvo são mecanismos de resistência de *P. aeruginosa*, por exemplo, que podem ocorrer simultaneamente (HØIBY et al., 2010).

1.4. Microbiologia das IAIO

Algumas características importantes determinam o perfil microbiológico das IAIO, como a presença de comorbidades (diabetes, artrite reumatóide, por exemplo), o tipo de infecção (precoce, intermediária, tardia), as características e a patogenicidade específica do microrganismo. Nas IAIO pós artroplastia, o joelho é articulação mais acometida por infecção, seguida do quadril, porém, não existe diferença expressiva entre o tipo de microrganismo que infecta estas articulações (GEIPEL, 2009). Os patógenos mais comumente encontrados são SCN (30%-43% dos casos), *S. aureus* (12%-23%), etiologia polimicrobiana (10%-11%), *Streptococcus* spp (9%-10%), BGN (3%-6%), *Enterococcus* spp (3%-7%) e anaeróbios (2-4%) (ZIMMERLI et al., 2004). Nas IAIO pós artrodese de coluna os microrganismos mais frequentemente isolados são SCN (24%-50% dos casos), *S. aureus* (12%-65%), etiologia polimicrobiana (15%-56%), *Streptococcus* spp (5%-15%), *Enterococcus* spp. (6%-50%) e *P. acnes* (3-50%); os BGN são isolados em 14% a 54% dos casos, geralmente associados às IAIO pós artrodeses de coluna lombar baixa, devido à proximidade com a região perineal (PORTILLO et al., 2013a; GEROMETTA et al., 2014; CHAHOUD et al., 2014).

Quanto ao tipo de infecção, 60% daquelas que apresentam início precoce são causadas por *S. aureus* e BGN aeróbios, microrganismos que levam ao aparecimento dos sintomas nos primeiros 3 meses. Apesar de menos virulento, SCN também é importante neste cenário. As infecções polimicrobianas também são muito comuns neste período (CORVEC, LUCHETTA, AUBIN., 2015). SCN é o principal agente etiológico das infecções intermediárias. De acordo com um estudo prospectivo realizado durante 15 anos em pacientes submetidos a artroplastia de quadril e joelho, o microrganismo mais prevalente foi SCN (36%), seguido de *S. aureus* (25%), *Enterococcus* spp (9%), *Streptococcus* spp (7%) e a maior parte das infecções ocorreram no período de 3 a 24 meses (intermediárias) (PHILLIPS et al., 2006). Grande parte das infecções tardias (1 a 2 anos), são de origem hematogênica e *S. aureus* é o microrganismo mais isolado

neste cenário. Apesar de não ser muito frequente, microrganismos de baixa virulência podem aparecer neste tipo de infecção como resultado da contaminação no momento da cirurgia (TANDE e PATEL, 2014). De acordo com literatura, a incidência de IAIO pós artroplastia por *S. aureus* após bacteremia foi de 34% (15 de 44 pacientes) e é mais comum em artroplastias do joelho que do quadril. Os pacientes com infecção periprotética causada por *S. aureus* normalmente apresentam múltiplas comorbidades (MURDOCH et al., 2001; SENDI et al., 2011a,b).

Streptococcus spp é responsável por aproximadamente 20% das IAIO, sendo as espécies *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus* beta hemolítico do grupo G de Lancefield as mais comumente encontradas. Até 50% dos pacientes podem apresentar bacteremia no início dos sintomas da IAIO e normalmente o *Streptococcus* beta-hemolítico do grupo G está relacionado à infecção em sítio adjacente (celulite) (EVERTS et al., 2004).

Microrganismos anaeróbios desempenham um papel importante na patogênese das IAIO, normalmente em infecções tardias, que ocorrem dois anos após a instalação do dispositivo (FERNANDES e DIAS, 2013). Na cartilagem humana, os níveis de oxigênio estão em torno de 1% a 6% e a tensão de oxigênio é extremamente baixa em articulações doentes quando comparada à tensão de oxigênio de uma articulação saudável, o que pode favorecer o desenvolvimento de infecção por estes microrganismos (TYNER e PATEL, 2016). A maior parte dos microrganismos anaeróbios fazem parte das IAIO polimicrobianas, exceto *P. acnes*, que normalmente é responsável por infecções monomicrobianas. Diferentes tipos de técnicas são necessárias para o isolamento destes patógenos e marcadores inflamatórios como VHS e PCR-t, que normalmente auxiliam no diagnóstico, podem apresentar alteração somente em alguns casos. Exames de imagem demonstrando lucência periprotética e/ou gás são comuns nas infecções por *Clostridium* spp, *Bacteroides* spp e *Actinomyces* spp (SHAH et al., 2015).

O anaeróbio *Clostridium* spp está mais frequentemente envolvido nas artrites sépticas, mas a literatura demonstra que diferentes espécies deste gênero também são responsáveis por IAIO. Ele é encontrado tipicamente em pacientes com doença gastrointestinal que apresentam a infecção após bacteremia transitória. São causadas principalmente por *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringes*, porém, *Clostridium septicum* e *Clostridium cadaveris* também são relatados. A maioria dos casos ocorrem após 3 meses de instalação do dispositivo, mas podem ocorrer mais tardiamente. *C. difficile* é encontrado em IAIO pós artroplastia do quadril, joelho e ombro, já o *C. septicum* em pacientes com doença gastrointestinal maligna associada ou trauma (STERN e SCULCO, 1988; PRON et al., 1995; MCCARTHY e STINGEMORE, 1999; BURNELL et al., 2011; CURTIS e LIPP, 2013).

Poucos são os casos descritos em literatura a respeito da IAIO causada por espécies do anaeróbio *Peptostreptococcus* spp. As infecções normalmente aparecem como subclínicas, sem sinais típicos de doença articular como calor e edema. A dor é comumente relatada, VHS e PCR-t podem se apresentar elevados, assim como histopatológico pode demonstrar inflamação. O microrganismo normalmente está associado à doença periodontal e os casos relatados frequentemente estão associados à manipulação dentária (STOLL et al., 1996; BARTZ et al., 2005). A espécie *Peptostreptococcus magnus* foi reclassificada em 1998 como *Finelgodia magna* (MURDOCH, 1998). As infecções podem ser monomicrobianas ou polimicrobianas e ocorrem normalmente após 4 meses de instalação do implante. Quando polimicrobianas, são normalmente são associadas com outros anaeróbios, microrganismos Gram negativos e espécies do gênero *Staphylococcus*. As infecções monomicrobianas são de origem hospitalar enquanto as polimicrobianas ocorrem após evento traumático. As articulações mais acometidas são quadril e joelho e sintomas como febre, dor e afrouxamento do implante são relatados (LEVY et al., 2009).

As espécies pertencentes ao gênero *Actinomyces* são bacilos Gram positivo (BGP) anaeróbios, parte da microbiota gastrointestinal, oral e geniturinária feminina. A maioria dos relatos encontrados na literatura a respeito de IAIO causadas por este microrganismo sugerem que são tardias, ocorrendo após um ano. Parece estar associada à doença periodontal, extração dentária, pacientes usuários de drogas intravenosas e mulheres que utilizam dispositivos intrauterinos. Sinais e sintomas locais e sistêmicos como dor, eritema, movimento articular limitado, edema e alteração dos marcadores inflamatórios são observados. Frequentemente são infecções monomicrobianas mais observadas no quadril do que no joelho (PETRINI e WELINBERGER, 1978; STRAZZERI e ANZEL, 1986; PERSSON, 1987; WÜST et al., 2000; RUHE et al., 2001; ZAMAN et al., 2002; RIEBER et al., 2009; BROWN e DRINKWATER, 2012; HEDKE et al., 2012).

A maior parte das IAIO causadas pelo gênero *Bacteroides* spp está associada com a espécie *Bacteroides fragilis*, entretanto, não são muito comuns e existem poucos relatos descritos em literatura. Estas infecções ocorreram após 3 meses, em sua maioria, com sinais e sintomas locais e sistêmicos bem parecidos: febre, dor, leucocitose, odor fétido, purulência, hiperemia e bacteremia simultânea. Eram monomicrobianas e os pacientes apresentavam comorbidades: artrite reumatóide, patologia gastrointestinal ou geniturinária concomitante (carcinoma de células escamosas do colo do útero), diverticulite, radioterapia externa e hemorroidectomia (SANDERS e KAPLOWITZ, 1980; HICKEY et al., 1990; PATTISON et al., 1995).

P. acnes é um BGP anaeróbio, aerotolerante e compõe grande parte da microbiota da pele (PORTILLO et al., 2013a). Patógeno oportunista, seu papel na etiologia da acne é conhecido há décadas (BRÜGGEMANN, 2005) e existem evidências de que ele também é responsável por outras doenças, tais como: endocardite, osteomielite multifocal recorrente crônica, prostatite crônica (com evolução para o câncer de próstata), sarcoidose, SAPHO

(Sinovite, Acne, Pustulose, Hiperostose e Osteíte) e infecções associadas a diferentes tipos de implantes, tais como implantes cerebrais, derivações neurocirúrgicas, dispositivos cardiovasculares, implantes oculares, dispositivos de fixação de fratura interna, implantes e próteses ortopédicas (ACHERMANN et al., 2014). Diferente da maioria dos anaeróbios que estão envolvidos em IAIO polimicrobianas, este patógeno é mais comum em cenários monomicrobianos (TANDE e PATEL, 2014). Um estudo recente avaliou a presença de *P. acnes* em infecções polimicrobianas e monomicrobianas e comparou o sucesso do tratamento destas infecções. Um total de 38 pacientes apresentaram IAIO. Destas, 24 eram monomicrobianas causadas por *P. acnes* e 14 eram polimicrobianas. Das infecções polimicrobianas, 71,4% estavam associadas a SCN e não houve diferença estatística significativa na taxa de sucesso do tratamento entre infecções polimicrobianas e monomicrobianas (85,7% e 79,2%, respectivamente) (FIGA et al., 2017). A incidência de *P. acnes* nas IAIO está em torno de 4%-6%, mas pode ser ainda mais alta do que a relatada, seja pela dificuldade que existe no isolamento deste microrganismo através de técnica tradicional de cultivo microbiológico, por ser este um microrganismo de microbiota normal muitas vezes considerado como contaminante, ou ainda, por sua apresentação clínica, que diferentemente daquelas causadas por outros microrganismos, como *S. aureus* por exemplo, não se caracteriza pela presença de sinais e sintomas característicos de infecção (ZAPPE et al., 2008). Valores de VHS e PCR-t normalmente permanecem inalterados, assim como a análise histopatológica não apresenta inflamação aguda (PORTILLO et al., 2013b). Em cirurgias de revisão do ombro, a incidência está entre 19% -70%, mas o significado da cultura positiva parece incerto. Os resultados podem ser falso-positivos devido à chance de contaminação. A desinfecção pré-operatória penetra insuficientemente nos folículos pilosos, onde 25% destes microrganismos residem (LANGE-ASSCHENFELDT et al., 2011; HUDEK et al., 2014). Trabalhos demonstram que apesar de mais frequente no ombro, *P. acnes* também está associado à IAIO pós artroplastia em outras

articulações e até como causa de osteomielite não associada a implantes ou trauma prévio em tíbia, coluna e quadril (BACHMEYER et al., 2010). Estudos sugerem uma relação entre a degeneração do disco intervertebral e infecção bacteriana crônica, já que o *P. acnes* é isolado em 25% das culturas de pacientes submetidos à microdiscectomia. Apesar de ser considerado muitas vezes como contaminante, em um estudo realizado com 368 pacientes, 119 apresentaram cultura positiva para *P. acnes* e em 89 ele foi isolado exclusivamente. Em 30 casos havia co-infecção, principalmente com SCN (CAPOOR et al., 2016). A taxa de infecção após cirurgia de coluna normalmente é baixa (0,2%), entretanto, após instrumentação ela pode chegar a 12%. *P. acnes* é responsável por 3% a 50% destes casos (PORTILLO et al., 2013a).

As infecções causadas por *P. acnes* manifestam-se tipicamente dentro de 3-24 meses após instalação do implante e ocasionalmente com 36 meses ou mais. Como o exame histopatológico do tecido periprotético pode não demonstrar inflamação aguda ou crônica, devido à baixa virulência e carga bacteriana do *P. acnes* e o quadro clínico é insidioso, com poucos sinais inflamatórios, pesquisadores sugerem que alguns casos de falha protética considerados como falha asséptica sejam de origem infecciosa causada por esse microrganismo. Existe uma forte evidência que a produção de biofilme é um importante fator de virulência do *P. acnes* (HOLMBERG et al., 2009). Estudos *in vitro* demonstram que a espécie é capaz de formar biofilme rapidamente, em diferentes tipos de superfície dos biomateriais, incluindo titânio, aço e silicone e mesmo na forma planctônica este microrganismo pode se apresentar como estruturas agregadas. A adesão é mais eficiente em vidro fosco, com superfície rugosa, seguida de polietileno e aço inoxidável, com superfície mais lisa. Quando foi feita uma comparação entre o silicone, aço e titânio a adesão foi superior nos dois últimos (BAYSTON et al., 2007).

1.5. Diagnóstico das IAIO

Diferentes entidades como a Academia Americana de Cirurgiões Ortopédicos (*American Academy of Orthopaedic Surgeons* – AAOS), dispõem de Diretrizes cujo objetivo é auxiliar no diagnóstico das IAIO pós artroplastia utilizando diferentes modalidades diagnósticas, tais como suspeita clínica, imagens radiológicas, marcadores sorológicos e sinoviais e testes microbiológicos, já que não existe um exame padrão-ouro para o diagnóstico (GOMEZ e PARVIZI, 2015).

Apesar de pouco específicos devido à influência que podem sofrer de outras infecções e de doenças inflamatórias não infecciosas, incluindo infecções extra-articulares e do método laboratorial utilizado, os marcadores inflamatórios VHS e PCR- t são excelentes preditores da ausência de infecção, quando ambos negativos, e devem ser solicitados sempre que o paciente apresentar dor. A sensibilidade combinada dos marcadores está em torno de 98% para detecção das IAIO pós artroplastia (ENAYATOLLAHI e PARVIZI, 2015; PARVIZI et al., 2016).

Um estudo publicado em 2011 afirma que ao contrário do que se pensa, estes marcadores não apresentam robustez e poderão apresentar uma taxa de resultados falsos-negativos que algumas vezes ultrapassa 11% (JOHNSON et al., 2011). É evidente que algumas vezes a falha infecciosa é classificada como falha asséptica e microrganismos de baixa virulência causam aumentos sutis ou simplesmente não aumentam os níveis dos biomarcadores, portanto estes resultados devem ser avaliados com cautela (ENAYATOLLAHI e PARVIZI, 2015; PARVIZI et al., 2016).

A interleucina 6 (IL-6) é um biomarcador sorológico promissor. Seus valores retornam à normalidade com poucos dias de pós-operatório e ela é aparentemente mais fidedigna que PCR-t e VHS no auxílio diagnóstico, mas ainda necessita de outros estudos antes que seja incorporada à rotina de marcadores para diagnóstico de infecção (BERBARI et al., 2010a).

No líquido articular, a contagem de leucócitos totais, o percentual de leucócitos polimorfonucleares e níveis de esterase leucocitária são parâmetros que podem ser avaliados (OSMON et al., 2013). Técnicas estéreis para obtenção do aspirado articular devem ser utilizadas, uma vez que microrganismos saprófitas da pele, como *S. aureus*, podem penetrar na articulação e causar resultados falso-positivos e até mesmo infecção iatrogênica (SQUIRE et al., 2011). De acordo com um estudo, a contagem superior a 65% de neutrófilos representa sensibilidade de 97% e especificidade de 98% (TRAMPUZ et al., 2004). Quando a contagem de leucócitos totais no líquido articular (quadril e joelho) é de 4.200 células/mL, a sensibilidade é 84% e a especificidade 93% e se a contagem de leucócitos totais for de 1.100 células, a sensibilidade é de 98% e a especificidade 88% (PARVIZI et al., 2016). Na literatura, no entanto, existem diversas publicações que sugerem outros pontos de corte para contagem de leucócitos totais e do percentual de polimorfonucleares, e que podem variar ainda de acordo com a articulação acometida e o tempo entre a cirurgia e a artrocentese. O Consenso Internacional sugere pontos de corte diferenciados para infecção precoce (até 6 semanas de pós-operatório) e crônica, levando em consideração a reação inflamatória pós-operatória, mas não diferencia entre as articulações (OSMON et al., 2013).

Outro importante marcador que apresenta estreita relação com valores de VHS, PCR-t, contagem de leucócitos totais e percentual de polimorfonucleares no líquido articular é enzima esterase leucocitária. Liberada pelos neutrófilos em resposta à infecção, apresenta boa acurácia na detecção de infecção em diversos sítios. Trata-se de um exame simples que apresenta sensibilidade de 81% e especificidade de 100%, porém apresenta algumas limitações, como a necessidade de centrifugação prévia em caso de contaminação com sangue (AGGARWAL et al., 2013).

A alfa-defensina, também avaliada no líquido articular, é um peptídeo secretado por células humanas que apresenta efeito antimicrobiano via ataque à parede celular do

microrganismo e auxilia o sistema imunológico na defesa. Não é alterada em virtude de terapia antimicrobiana, doença inflamatória sistêmica e aspirado articular hemorrágico. Um estudo descreveu sensibilidade e especificidade de 100% e quando combinada com PCR-t apresenta um importante papel na detecção da IAIO pós artroplastia (DEIRMENGIAN et al., 2015). Entretanto, este exame ainda não se encontra disponível no Brasil.

A análise histopatológica do tecido periprotético constitui uma importante ferramenta diagnóstica complementar. A presença de 5-10 neutrófilos por campo em pelo menos 5 campos, ou 23 polimorfonucleares em 10 campos, determina uma reação inflamatória aguda e é um bom preditor de cultura microbiológica positiva (MORAWIETZ et al., 2009). Esta resposta inflamatória pode não ser vista no tecido quando a infecção for causada por microrganismos de baixa virulência, como *P. acnes* e SCN (TANDE e PATEL, 2014).

1.6. Diagnóstico Microbiológico

Recuperar o agente etiológico responsável pela IAIO, a partir de pelo menos dois espécimes clínicos, constitui um critério definitivo no diagnóstico destas infecções. Além disso, o diagnóstico microbiológico é fundamental para definir a conduta terapêutica.

1.6.1. Cultura do Fluido Sinovial

A aspiração pré-operatória ou intra-operatória do líquido articular é uma importante ferramenta diagnóstica. Quando realizada no período pré-operatório, pode auxiliar na estratégia terapêutica, incluindo modalidade cirúrgica e antibioticoterapia sistêmica e local, por meio do uso do cimento de polimetilmetacrilato com antibiótico direcionado (TANDE e PATEL, 2014). Num estudo realizado em 1996, no qual 171 aspirados articulares pré-operatórios foram incluídos, a cultura deste espécime utilizando meios de cultura sólidos e líquidos, apresentou

uma sensibilidade de 50% e especificidade de 88% e o tempo de incubação utilizado foi de (FEHRING e COHEN, 1996). De acordo com Yee e colaboradores (2013), a sensibilidade e especificidade da cultura do aspirado de quadril é de 50% e 86% respectivamente. Para o aspirado de joelho, a sensibilidade é de 88% e a especificidade de 96,1%. Parece que aumentar o tempo de incubação da cultura para duas semanas permite o isolamento de microrganismos de baixa virulência, tais como, *P. acnes*, *Peptostreptococcus* spp e outros BGP, que não seriam recuperados se este período fosse menor (YEE et al., 2013).

Outros trabalhos avaliaram a sensibilidade da cultura do líquido articular em frascos de hemocultura. Um estudo no qual foram avaliados 73 pacientes, comparando a cultura do líquido articular inoculado em frascos de hemocultura automatizados (BD BACTEC 9240 – Becton Dickinson, Oxford, UK), com a cultura do tecido periprotético intraoperatório inoculado em meios de cultura sólido e líquido, demonstrou que 23% dos pacientes tinham cultura intraoperatória do tecido positiva. A sensibilidade da cultura do líquido articular foi de 82% e a especificidade de 91% (ALI et al., 2006). Em outro estudo a sensibilidade da cultura de líquido articular utilizando frascos de hemocultura (BD BACTEC 9240 – Becton Dickinson, Oxford, UK) *versus* meios de cultura sólidos convencionais (agar sangue com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e agar chocolate) em 805 amostras foi avaliada. Nos frascos de hemocultura, 62 microrganismos patogênicos e apenas 1 contaminante foram isolados. Em meio de cultura sólido, foram isolados 51 patógenos e 11 contaminantes. A sensibilidade e a especificidade da cultura do líquido articular realizada em frascos de hemocultura foi superior à da cultura em meios de cultura sólidos convencionais. É importante considerar que os meios sólidos foram incubados em atmosfera contendo 5% a 7% de dióxido de carbono por 48 h e que a anaerobiose estrita não foi utilizada. O tioglicolato foi mantido em estufa por 5 dias e o frasco de hemocultura utilizado foi o do tipo pediátrico PEDS PLUS/F F (HUGHES et al., 2001).

Uma análise retrospectiva de 87 pacientes com IAIO pós artroplastia foi feita com objetivo de avaliar a sensibilidade da cultura do líquido articular inoculado em frasco de hemocultura, com a cultura do tecido periprotético e a cultura de *swabs*. A cultura do líquido articular foi positiva em 90% dos casos, do tecido periprotético em 82% e dos *swabs* em 68% (FONT-VIZCARRA et al., 2010).

1.6.2. Cultura do Tecido Periprotético

A cultura do tecido periprotético é extremamente valiosa na detecção de microrganismos para diagnóstico das IAIO. Resultados positivos são detectados em 65% a 94% dos casos (ZIMMERLI, 2006a), mas esta sensibilidade pode estar em torno de 39% a 70%, sendo influenciada pela cronicidade da infecção, já que nas infecções crônicas, a sensibilidade poderá ser menor. Os métodos de cultivo não são padronizados (PEEL et al., 2016).

O número de amostras coletadas também interfere no diagnóstico. Quando apenas uma amostra de tecido for cultivada, a sensibilidade pode ser baixa assim como a especificidade, uma vez que microrganismos de baixa virulência podem ser isolados, o que poderá ser considerado contaminação e não infecção (TANDE e PATEL, 2014).

A partir do estudo realizado por Kamme e Lindberg (1981), 5 amostras foram definidas como um número ideal para diferenciar cultura positiva de contaminação. Um estudo posterior incluiu 297 pacientes e utilizou modelagem matemática. Os autores concluíram que para estabelecer o diagnóstico de IAIO pós artroplastia a quantidade ideal de espécimes clínicos seria de 5 a 6 fragmentos. Quando 3 destes foram positivos para o mesmo microrganismo, a sensibilidade e especificidade foi de 65% e 99,6%, respectivamente, enquanto com 2 amostras a sensibilidade e a especificidade foi de 71% e 97%, respectivamente (ATKINS et al., 1998). Outros autores verificaram que a cultura positiva com o mesmo microrganismo em 3 ou mais espécimes de 5 coletadas apresentou uma sensibilidade de 80% e especificidade de 97%

(MARIN et al., 2012). Por fim, como já estabelecido nos critérios de infecção, a presença do mesmo microrganismo em 2 ou mais amostras entre 5 coletadas apresenta sensibilidade ainda maior, conforme estabelecido por alguns pesquisadores (SCHÄFER et al., 2008).

Quanto aos meios de cultura que devem ser utilizados pelo laboratório de microbiologia, o aumento da sensibilidade é alcançado combinando-se meios de cultura sólidos com meios de cultura líquidos (caldos). Este estudo utilizou os meios Agar sangue com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, Agar sangue anaeróbico com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, Agar chocolate e caldo tioglicolato pré-reduzido (PEEL et al., 2016).

Um estudo comparou a sensibilidade e a especificidade da cultura do tecido periprotético direto nas placas contendo meio de cultura sólido com a cultura em caldo de carne cozida (Cooked Meat Robertson's), caldo de enriquecimento anaeróbico e frascos de hemocultura Anaeróbico F e Aeróbico Plus/F (BD BACTEC 960 Platform – Becton Dickinson, Oxford, UK). Pérolas de vidro foram adicionadas às amostras que foram então submetidas a uma vigorosa agitação. A sensibilidade e a especificidade para a cultura realizada diretamente no meio de cultura em placa foi de 39% e 100%, para o caldo de carne cozida, 83% e 97%, para o caldo anaeróbico, 57% e 100%, e para o frasco de hemocultura, 87% e 98%, respectivamente (HUGHES et al., 2011). Outro estudo, cujo objetivo era otimizar a detecção de *P. acnes*, utilizou meios de cultura sólidos (incluindo Brucella Agar anaeróbico) e caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth) para o cultivo do tecido periprotético e também homogeneizou os fragmentos antes de cultivá-los. O caldo BHI mostrou-se superior na detecção em casos onde não havia suspeita de infecção, enquanto Brucella Agar foi superior nos casos reconhecidamente infectados (BUTLER-WU et al., 2011).

Shannon e colaboradores (2013) avaliaram a cultura em caldo tioglicolato com objetivo principal de recuperar *P. acnes* em líquido articular e tecido periprotético. No centro cirúrgico, os tecidos foram colocados imediatamente após a coleta em frascos estéreis com tampa de rosca

e cheios de dióxido de carbono. No laboratório foram homogeneizados em 3 mL de caldo BHI por 1 minuto. Alíquotas foram colocadas em caldo tioglicolato anaeróbio pré-reduzido e meio de cultura anaeróbio sólido. A capacidade de detecção do caldo tioglicolato foi superior à do meio de cultura sólido (SHANNON et al., 2013).

Peel e colaboradores (2016) compararam a sensibilidade e a especificidade da cultura do tecido periprotético em frascos de hemocultura automatizados Aeróbico Plus/F, Anaeróbico/F e Lytic/10 automatizados (BD BACTEC 9240 – Becton Dickinson, Oxford, UK), com meio de cultura sólido, aplicando análise estatística Bayesiana e critérios IDSA (padrão ouro) para definição de IAIO pós artroplastia. Um total de 369 pacientes participaram do estudo e 117 (32%) apresentaram critérios de infecção. A sensibilidade e a especificidade dos meios de cultura foram avaliadas individualmente e de forma combinada. Utilizando a análise Bayesiana, a inoculação do tecido periprotético em frascos de hemocultura apresentou uma sensibilidade de 92,1%, enquanto a sensibilidade do cultivo em meio sólido e caldo foi de 62,6%. Aplicando os critérios IDSA, a sensibilidade foi de 60,7% com os frascos de hemocultura e de 44,4%, utilizando o meio de cultura sólido e caldo (PEEL et al., 2016).

Alguns artigos foram publicados a respeito do tempo de incubação ideal para as amostras de tecido periprotético. Num estudo com 284 pacientes e suspeita de IAIO tardia pós artroplastia de quadril e joelho, amostras de tecido periprotético foram cultivadas em meios de cultura sólidos, caldo BHI e caldo de Schaedler para microrganismos aeróbios e anaeróbios, e observadas durante 14 dias. Infecção foi diagnosticada em 110 pacientes e os microrganismos detectados na primeira semana, na maioria das vezes, foram espécies do gênero *Staphylococcus*, enquanto a partir da segunda semana, microrganismos com crescimento mais lento, como BGP, espécies do gênero *Peptostreptococcus* e, principalmente, *P. acnes* foram detectadas. Havia uma evidente correlação entre o número de amostras de tecido positivas e resultados positivos

da análise histológica. Estes autores sugerem que a cultura do tecido periprotético deve ser realizada por um período de 2 semanas (SCHÄFER et al., 2008).

De acordo com Butler-Wu e colaboradores (2011), em um estudo com 198 pacientes submetidos à cirurgia para revisão da artroplastia, foram utilizados 28 dias de incubação do tecido periprotético em meios de cultura sólidos e BHI com objetivo principal de otimizar a detecção de *P. acnes*. Segundo os autores, os 19 pacientes com infecção comprovada envolvendo *P. acnes* tiveram o agente detectado até o 13º dia de incubação do tecido, todas as amostras isoladas após este período foram consideradas contaminantes. Apenas 20% das infecções foram detectadas no 7º dia e quase 30% das infecções não seriam detectadas se o tempo de cultura fosse ampliado apenas para pesquisa de microrganismos anaeróbios. Além de *P. acnes*, SCN também foram isolados, inclusive sendo mais frequentes onde não havia critérios para diagnóstico de infecção, assim como outros microrganismos, tais como, espécies do gênero *Bacillus*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Kokuria*, *Dermacoccus*, *Corynebacterium* e *Micromonospora*. Os autores concluem que o tempo de incubação ideal tanto para microrganismo aeróbios quanto anaeróbios equivale a 13 dias (BUTLER-WU et al., 2011).

Um estudo foi realizado com caldo tioglicolato anaeróbio e agar anaeróbio com objetivo de aumentar a detecção de *P. acnes*. Havia pelo menos 2 espécimes positivos em caldo, no 7º dia de incubação, nos 14 casos de infecção causada por este microrganismo. Os autores concluem que utilizando o caldo anaeróbio, as culturas podem ser mantidas incubadas por um período de 7 dias (SHANNON et al., 2013).

O tempo de positividade da cultura utilizando frascos de hemocultura (automatizada) também é avaliado. Hughes e colaboradores (2011) publicaram um pequeno estudo com 23 casos de IPA comparando 4 meios de cultura (caldo de carne cozida, frasco de hemocultura anaeróbico F e aeróbico plus/F BD Bactec 960 Platform - Becton Dickinson, Oxford, UK, caldo anaeróbio e meio sólido) durante 5 dias de incubação. Neste trabalho foram isolados cocos

Gram positivos (*Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp e *Streptococcus* spp) e BGN (*K. pneumoniae* e *E. coli*). Entre os 3 caldos de enriquecimento, o frasco de hemocultura foi o que apresentou menor tempo de detecção. Segundo os autores, esta diferença pode ser atribuída à detecção da produção de CO₂ que é mais rapidamente detectada pelo equipamento. Apesar de mais rápido, o meio sólido é o menos sensível entre os 4 meios testados (HUGHES et al., 2011).

No artigo publicado por Minissian e colaboradores (2014), os frascos de hemocultura foram incubados durante 14 dias. Não houve comparação com outros métodos e a definição de infecção foi feita com base nos achados histopatológicos. O tempo médio para detecção de *P. acnes* foi de 5 dias e, para detecção dos outros microrganismos, foi de 3 dias. Entre os 79 casos definidos como infectados, 66 (83,5%) foram positivos com 8 dias de incubação. Dos 13 casos negativos, seis pacientes haviam recebido antimicrobiano no momento da coleta ou até 10 dias antes. A sensibilidade do equipamento para detectar os casos infectados aumentou de 67,1% no primeiro dia para 82,3% no terceiro dia de incubação. Segundo os autores, inoculando os tecidos em frascos de hemocultura não são necessários 14 dias de incubação, mas é indispensável o uso de frascos aeróbios e anaeróbios uma vez que 14% dos microrganismos foram identificados apenas no primeiro frasco e 27%, apenas no segundo (MINASSIAN et al., 2014).

Segundo Peel e colaboradores (2016), o frasco de hemocultura aeróbio foi mais rápido (1 dia para positividade) na detecção dos microrganismos em comparação a qualquer outro meio de cultura, assim como o frasco anaeróbio, que só não foi mais rápido do que o frasco aeróbio. Nenhum frasco aeróbio foi positivo após 7 dias, porém, nos frascos anaeróbios, três casos adicionais de infecção foram encontrados com uma amostra positiva para *Propionibacterium granulosum* e 2 para *P. acnes*. Os três casos também foram detectados em caldo tioglicolato (PEEL et al., 2016).

1.6.3. Sonicação e Vortex do implante

O biofilme tem papel fundamental na patogênese das IAIO e representa uma barreira para o seu diagnóstico. Com objetivo de aumentar a detecção dos microrganismos que o formam, existem diferentes estratégias direcionadas à sua remoção da superfície do implante e ruptura de suas estruturas multicelulares, levando à liberação dos microrganismos com consequente aumento na sensibilidade dos métodos diagnósticos microbiológicos.

A Sonicação é uma técnica realizada através de banho ultrassônico, cujo objetivo é soltar, desalojar microrganismos que estão no interior de biofilmes aderidos à superfície do implante ortopédico. O processo consiste na transmissão de ondas de ultrassom de baixa frequência, que está além da capacidade de detecção da audição humana. Normalmente, a faixa utilizada para esta finalidade é de 40 ± 2 kHz. Essas ondas atravessam o líquido ao redor da prótese criando áreas de alta e baixa pressão. Durante o período de baixa pressão, bolhas microscópicas são geradas (cavitação), durante a fase de alta pressão, estas bolhas são rompidas (implosão) e liberam energia fazendo com que o microrganismo que está aderido à superfície do implante seja liberado. Após a sonicação, o fluido pode ser submetido à cultura ou outros métodos para detecção do microrganismo (TRAMPUZ et al., 2003, 2007).

A primeira publicação referente à sonicação foi realizada na década de 1990. Neste estudo foram incluídos 120 pacientes submetidos à revisão de artroplastia do quadril. A cultura foi positiva em 26 (22%) e *P. acnes* foi isolado sozinho ou em associação com espécies de *Staphylococcus* em 16 das 26 culturas positivas (62%). As próteses foram colocadas em bolsas estéreis e em jaras anaeróbias para transporte ao laboratório de microbiologia. Houve um aumento na sensibilidade em comparação à cultura do tecido periprotético, mas a falta de uma rigorosa definição de IAIO pós artroplastia limitou a aplicação destes dados (TUNNEY et al., 1998). Utilizando o protocolo desenvolvido por Tunney e colaboradores, mas com uma rigorosa definição de infecção, a sensibilidade da cultura do fluido sonicado mostrou-se superior à

cultura do tecido periprotético, porém a especificidade foi inferior devido ao vazamento das bolsas utilizadas para transporte (TRAMPUZ et al., 2006). Estudos posteriores utilizaram algumas modificações em relação ao protocolo inicial. Frascos rígidos de propileno no lugar de bolsas estéreis passaram a ser utilizados para evitar problemas de vazamento e contaminação. Além disso, uma etapa anterior à sonicação, de natureza mecânica, em que o implante é submetido à agitação com auxílio do vortex durante 30 segundos, foi adicionada para aumentar a remoção do microrganismo que pode estar aderido ao dispositivo. Utilizando estas modificações, um estudo realizado com 331 pacientes demonstrou uma sensibilidade maior da sonicação (79%) em comparação com a cultura do tecido periprotético (61%), mas a especificidade de ambos foi de 99% (TRAMPUZ et al., 2007). Resultados semelhantes foram publicados em relação ao papel da sonicação dos implantes explantados na otimização do diagnóstico de IAIO pós artrodese de coluna (MCDERMOTT et al., 2012).

Segundo Tande e Patel (2014), o protocolo de sonicação atualmente recomendado foi publicado em 2011 em um estudo realizado com implantes de cotovelo. Os implantes foram colocados em um frasco de 1 litro estéril e com 400 mL de solução de ringer lactato. O frasco foi submetido ao vortex (30 segundos) e à sonicação (5 minutos) em temperatura ambiente. Após a sonicação, o vortex foi novamente repetido (30 segundos). Uma alíquota de 50 mL da solução foi centrifugada e deste concentrado, 0,1 mL foram semeados em meios aeróbio e anaeróbio que então foram mantidos incubados de 2 a 4 dias (aeróbios) e 14 dias (anaeróbios). O ponto de corte para amostras centrifugadas é de 200 UFC/mL e para as que não são submetidas à centrifugação, de 1 a 50 UFC/mL. A maioria dos estudos utilizam o ponto de corte entre 1 a 10 UFC/mL. Dependendo do microrganismo isolado, o ponto de corte menor do que o padronizado deve ser levado em consideração, por exemplo, em casos onde *S. aureus* ou uma *Enterobacteriaceae* estiverem presentes, mesmo em contagens inferiores a 10 UFC (VERGIDIS et al., 2011; TANDE e PATEL, 2014).

Em laboratórios onde o uso de banho ultrassônico não é uma alternativa viável, a agitação mecânica com vortex pode ser utilizada na remoção do microrganismo da superfície do implante, principalmente na presença de pérolas de vidro (TRAMPUZ et al., 2003). Um estudo *in vitro* cujo objetivo foi avaliar a capacidade do vortex de liberar o microrganismo aderido ao implante sem a sonicação e comparar com a atividade do vortex seguida da sonicação foi realizado utilizando dois grupos controle: o controle 1 não foi submetido ao vortex e nem à sonicação e o controle 2 foi submetido ao vortex, mas não à sonicação. A sensibilidade do vortex foi superior quando comparada ao grupo controle que não foi submetido ao vortex e nem à sonicação. O uso do vortex antes da sonicação aumenta ainda mais esta sensibilidade (KOBAYASHI et al., 2009). Outro estudo feito com 135 pacientes comparou a atividade do vortex isoladamente com a atividade do vortex seguida de sonicação. Quando o *cutoff* estabelecido foi de 50 UFC/mL, a sensibilidade da sonicação foi de 60%, enquanto a sensibilidade do vortex isoladamente foi de 40%, porém, a especificidade foi a mesma, ou seja, 99%. Utilizando um *cutoff* de 1 UFC/ mL a sensibilidade foi quase a mesma: 69% vortex isoladamente e 71% vortex seguido de sonicação, mas a especificidade foi de 92% e 93% respectivamente. A remoção pode ser ainda mais eficiente se adicionar detergente (polissorbato 80) ou anticoagulante EDTA ao fluido do vortex (PORTILLO et al., 2013). No entanto, não existem estudos publicados avaliando a contribuição que a técnica de agitação com vortex da prótese isoladamente, sem fazer parte de um protocolo de sonicação, pode trazer em relação à cultura de tecido periimplante e líquido articular no diagnóstico da IAIO.

O composto sulfidril ditioneitol (DTT) é uma recente alternativa para laboratórios de microbiologia onde o vortex ou a sonicação não são viáveis. Trata-se de um forte agente redutor e desnaturante de proteínas comumente utilizado em materiais do trato respiratório inferior, com objetivo de facilitar a liberação dos microrganismos presos no interior de biofilmes. No diagnóstico das infecções periprotéticas, os tecidos periprotéticos são homogeneizados com

esta substância. Um estudo comparou a cultura do tecido periprotético em DTT e em solução salina. Um total de 70 pacientes (25 infectados e 45 não infectados) foram incluídos no estudo. Os espécimes tratados foram centrifugados por 10 min a 3000 rpm (rotações por min) e o *pellet* resultante semeado em meios sólidos e líquidos (aeróbios e anaeróbios). A concordância entre os dois métodos foi de 85,7%. A sensibilidade do DTT foi de 88% e da salina foi de 72%. A especificidade foi de 97,8% e 91,1% para DTT e salina, respectivamente (VECCHI et al., 2016).

1.6.4 Métodos Moleculares

Na maioria dos casos, as técnicas de cultivo otimizadas descritas são suficientes para o diagnóstico das IAIO, entretanto, em casos específicos como uso de antibioticoterapia prévia, infecção causada por microrganismos fastidiosos (*Legionella* spp, *Finnegoldia magna*, *Peptostreptococcus* spp, *Gardnerella vaginalis*, *Coxiella burnetii*) ou mesmo não cultiváveis, podem não ser diagnosticadas corretamente e métodos moleculares apresentam-se como uma alternativa, mesmo diante de suas limitações. O grande dilema em torno destes métodos é a incerteza de saber se o DNA (ácido desoxirribonucleico) presente na análise final representa o DNA presente no espécime clínico e se este DNA presente no espécime clínico representa um microrganismo responsável pela infecção (HARTLEY e HARRIS, 2014).

A técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR Multiplex) do fluido sonificado apresenta maior sensibilidade do que a cultura do fluido sonificado (96% e 67%, respectivamente). A melhor sensibilidade é alcançada utilizando as duas técnicas (100%) (MOHAJER e DAROUICHE, 2014). A ribotipagem é uma técnica rápida que apresenta elevada acurácia, porém, é cara e necessita de um isolamento prévio do microrganismo (ARCIOLA et al., 2011). Outra técnica promissora é a espectrometria de massas (MALDI-TOF MS – matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry). Fácil, rápida, barata e confiável, pode ser utilizada diretamente nos espécimes clínicos, tais como, sangue, líquido

sinovial e fragmento de tecido macerado (CORVEC et al., 2012). Um estudo demonstrou a rápida capacidade de detecção de *S. aureus* em pacientes com IAIO. Outra informação interessante foi a capacidade de detectar subespécies de SCN nestas amostras, demonstrando que esta técnica é capaz de recuperar microrganismos relacionados ou não relacionados entre diferentes morfotipos recuperados de vários espécimes do mesmo paciente incluindo variantes de colônias pequenas de *Staphylococcus* (SCV -small - colony variants) (HENRY et al., 2012).

1.7. IAIO e cultura microbiológica negativa

De acordo com a literatura, cerca de 15,8 a 21,3% dos pacientes que apresentam evidências não microbiológicas de infecção, como fístula, pus, inflamação aguda na análise histológica do tecido periprotético apresentam resultados negativos de cultura microbiológica (AGGARWAL et al., 2014; BJERKE-KROLL et al., 2014). Vários fatores podem influenciar a ocorrência deste cenário, como a incapacidade de recuperar certos agentes através das técnicas microbiológicas convencionais, tais como os microrganismos fastidiosos, anaeróbios estritos e aqueles encapsulados em biofilme, os fungos e as micobactérias, a administração local de antimicrobianos no momento da remoção do implante; e o uso prévio de antimicrobianos sistêmicos, sendo este último o fator mais importante (BERBARI et al., 2007). De acordo com Trampuz e colaboradores, a administração de antimicrobianos duas semanas antes de obter as amostras de tecido diminui a capacidade de detecção dos microrganismos através da cultura (TRAMPUZ et al., 2007). Entretanto, é importante distinguir entre administração terapêutica e profilática do antimicrobiano antes da cirurgia de revisão. O uso terapêutico é desaconselhado, porém, a interferência no resultado da cultura após o uso profilático ainda não está bem estabelecida (PARVIZI et al., 2014). Outro fator importante é o método como as amostras são obtidas e transferidas para o laboratório. Muitas vezes ocorre desidratação dos tecidos ou exposição a temperaturas extremas (MEERMANS e HADDAD, 2010). Introduzir substâncias

bacteriostáticas na cavidade articular no momento da aspiração também interfere no rendimento da cultura (BARRACK et al., 1997). Se no momento da aspiração nenhum fluido for obtido, o ideal é que seja feita uma segunda tentativa e não irrigar a articulação no momento intraoperatório (PARVIZI et al., 2014). Normalmente os resultados negativos ocorrem em infecções intermediárias ou tardias e somente 15% ocorre dentro dos primeiros 3 meses após a artroplastia (MALEKZADEH et al., 2010).

Parvizi e colaboradores (2014) publicaram estratégias pré-operatórias e intra-operatórias com objetivo de minimizar a taxa de culturas negativas nas infecções periprotéticas, tais como evitar a administração de antimicrobiano até que o diagnóstico da infecção periprotética seja confirmado ou refutado; aguardar 2 semanas após o término do antimicrobiano para realizar a aspiração do líquido articular; repetir o procedimento caso o resultado da primeira punção seja negativo; evitar início de antibioticoterapia pré-operatória caso o microrganismo não tenha sido isolado nesse período; obter de 3 a 5 amostras de tecido do canal intramedular e da interface cimento-osso pré-operatória, cada uma com instrumentos limpos e colocadas imediatamente em frasco estéreis, antes da irrigação da ferida ou tecidos mais profundos. Por fim, é importante que o laboratório de microbiologia tenha acesso às informações pertinentes para utilização de meios específicos de enriquecimento, mantenha as culturas incubadas durante 14 a 21 dias, caso o microrganismo não tenha sido isolado em período inferior e sempre que possível, transfira parte do líquido articular para frascos de hemocultura (PARVIZI et al., 2014).

Conclui-se, portanto, que o diagnóstico microbiológico das IAIO ainda é um grande desafio. Os métodos não são padronizados na literatura, e não existem diretrizes brasileiras; a adequação das recomendações encontradas nas diferentes diretrizes internacionais à nossa realidade é desconhecida. Mesmo no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO), referência nacional para o tratamento das patologias ortopédicas de alta

complexidade, incluindo as IAIO, ainda são utilizadas técnicas convencionais de cultivo, indicadas para o isolamento de bactérias planctônicas, porém pouco eficientes para o isolamento de bactérias sésseis. Isto pode levar a um percentual elevado de culturas falso negativas nas infecções associadas a biofilme, tais com as IAIO. Num estudo realizado em 2012, foram analisados 135 casos de IAIO pós artroplastias primárias de joelho e quadril tratados no INTO entre 2009 e 2011, dos quais 48% eram infecções precoces. O percentual de cultura negativa nesse estudo foi de 9% (SCHMALTZ et al., 2012).

Normalmente os fragmentos de tecido e/ou líquido sinovial são coletados no centro cirúrgico em frascos secos e não são imediatamente processados. Além deste fator, o cultivo é muitas vezes realizado apenas em meios sólidos e incubados em atmosferas que não são suficientes para recuperar microrganismos mais exigentes. O tempo de incubação dos espécimes pode ser insuficiente para detecção de microrganismos sésseis e são eles os mais frequentemente envolvidos nas IAIO. Acredita-se que tal problema ocorra na maioria dos laboratórios de microbiologia clínica no Brasil.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Relatos da literatura mundial evidenciam elevada frequência de resultados negativos em culturas de espécimes clínicos enviados aos laboratórios de microbiologia para investigação de IAIO. Além disso, a prevalência dos microrganismos anaeróbios na etiologia destas infecções pode estar subestimada, em virtude do uso de técnicas de cultivo inadequadas para o isolamento desse grupo de microrganismos pelos laboratórios de microbiologia clínica. Nesses casos, o manejo dessas infecções fica prejudicado, pois tanto o tratamento cirúrgico quanto o tratamento antimicrobiano adequados dependem da definição precisa do agente etiológico. Tal indefinição pode gerar procedimentos cirúrgicos e uso de antimicrobianos de largo espectro desnecessários, além de prolongar potencialmente o tempo de internação dos pacientes, já que não é recomendada a troca em tempo único em pacientes sem microrganismo previamente identificado e não é possível o descalonamento do esquema antimicrobiano empírico para esquemas de uso via oral na ausência de uma etiologia definida.

Tendo em vista o papel do INTO como consultor do Ministério da Saúde na padronização de novas tecnologias na área da traumatologia e ortopedia, destaca-se a necessidade do desenvolvimento e análise de técnicas microbiológicas que proporcionem melhoria no diagnóstico das IAIO, incluindo aquelas voltadas para o isolamento e a identificação de microrganismos anaeróbios e de bactérias presentes no biofilme.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

Estimar a prevalência dos microrganismos anaeróbios, em especial *P. acnes*, na etiologia das IAIO pós-artroplastias e osteossínteses de ombro, pós-artrodese de coluna e pós-artroplastias do quadril e joelho, em pacientes submetidos a cirurgia de revisão após falha desses procedimentos.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1. Descrever a população de pacientes com IAIO causada exclusivamente por anaeróbios estritos, comparando-a com a de pacientes sem infecção (falha asséptica) e com infecção causada por microrganismos facultativos.

3.2.2. Comparar o desempenho diagnóstico dos procedimentos implementados na rotina do laboratório de microbiologia do INTO com o desempenho dos procedimentos propostos no presente estudo para o diagnóstico de IAIO.

3.2.3. Avaliar o desempenho da cultura do fluido obtido pela técnica de vortex do implante explantado no diagnóstico de IAIO, quando comparado à cultura de líquido articular e tecido periprotético.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O projeto foi realizado de acordo com os padrões éticos da Comissão de Ética e Pesquisa com seres humanos do INTO (CEP/INTO) e encontra-se registrado sob número 0182551290000527 - Certificado de apresentação para apreciação ética (CAAE) (**Anexo 1**). Todos os pacientes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 2**).

4.2 Delineamento do estudo

Estudo transversal, com coleta de dados clínicos, demográficos e espécimes clínicos de forma prospectiva de pacientes submetidos à cirurgia para revisão de artroplastia do quadril e joelho, implantes do ombro em geral (placa, parafuso, prótese articular) e artrodese de coluna.

4.3 População do Estudo

O estudo foi realizado com pacientes submetidos à cirurgia de revisão pós artroplastia do ombro, procedimentos cirúrgicos na articulação do ombro que utilizaram implantes ortopédicos de fixação tais como: placas, parafusos, âncoras e hastes, sejam metálicos ou bioabsorvíveis, pelo Centro de cirurgia do ombro e cotovelo do INTO e que tenham evoluído com falha do implante, independente da suspeita clínica de infecção. O mesmo se aplica para pacientes com falha pós artroplastias de quadril e joelho (primária ou de revisão) e artrodese de coluna.

4.4 Local do estudo

O estudo foi realizado no INTO e na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O INTO é um Instituto Público, Federal, composto por 255 leitos de internação, 48 leitos de terapia intensiva e de pós-operatório, e é responsável por atender pacientes de alta complexidade na área de traumatologia e ortopedia, no âmbito do SUS. Na UFRJ, parte dos processos microbiológicos desenvolvidos nesse estudo foram realizados no Laboratório de Biologia dos Anaeróbios do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS).

4.5 Dados clínicos

Os dados clínicos e demográficos foram obtidos mediante consulta autorizada ao prontuário dos pacientes. De cada paciente, os seguintes dados foram coletados: dados demográficos, data da cirurgia original, presença de doenças crônicas, procedimentos cirúrgicos realizados, outros agentes microbiológicos isolados, uso de antimicrobianos para o tratamento da infecção atual, valores de PCR-t e VHS realizados antes da cirurgia de revisão. Para mensurar quantitativamente a presença de comorbidades, foi utilizado o escore de Charlson. Trata-se de um método para classificar comorbidades desenvolvido originalmente para ser utilizado como preditor de mortalidade em estudos longitudinais (QUAN et al., 2011). Os dados coletados foram anotados em ficha própria (**Anexo 3**). IAIO foi definida pela presença de um ou mais dos seguintes critérios: crescimento do mesmo microrganismo em duas ou mais culturas de espécimes intraoperatórios ou um espécime pré-operatório e outro intraoperatório; líquido articular purulento ou exsudato purulento no sítio de implantação; inflamação aguda no exame histopatológico do tecido periprotético; formação de fistula com comunicação entre espaço articular e a pele. Os pacientes que não preencheram os critérios acima foram considerados como falha asséptica (OSMON *et al.*, 2013).

4.6 Coleta e transporte dos fragmentos de tecido periprotético

Os espécimes clínicos foram colhidos pela equipe de cirurgiões (grupo do ombro, quadril, joelho e coluna) do INTO. Um conjunto de pinças Kelly estéreis foi separado para coleta, sendo uma para cada fragmento de tecido periprotético coletado. Um total de 5 espécimes de tecido ou 4 de tecido e 1 de líquido articular foram colhidos: membrana periimplante, fragmento ósseo e fluido sinovial (**Quadro 1**). Todos os espécimes, com exceção dos implantes explantados, foram coletados em duplicata, sendo encaminhado o mesmo conjunto de espécimes clínicos para o laboratório de microbiologia do INTO conforme rotina dos serviços.

Quadro 1. Tipos de espécimes clínicos coletados por grupo.

Grupo	Tipos de espécimes clínicos
Quadril	Quatro fragmentos de tecido: membrana periimplante do acetábulo, membrana periimplante do fêmur, fragmento ósseo do acetábulo e fragmento ósseo do fêmur. Além dos fragmentos, o líquido articular. Na ausência do líquido articular, mais um fragmento de tecido (membrana ou osso)
Joelho	Quatro fragmentos de tecido: membrana de interface da tíbia, membrana de interface do fêmur, fragmento ósseo da tíbia e fragmento ósseo do fêmur. Além dos fragmentos, o líquido articular. Na ausência do líquido articular, mais um fragmento de tecido (membrana ou osso)
Coluna	Cinco fragmentos ósseos
Ombro	Cinco fragmentos de tecido musculoesquelético (periimplante)

Imediatamente após a coleta, a pinça Kelly com fragmento de tecido e a seringa contendo fluido sinovial foram entregues a um membro da equipe de pesquisa presente no centro cirúrgico. Cada espécime foi inoculado em frasco contendo meio de cultura tioglicolato (MERCK, Brasil), (peptona de caseína – 19,5 g/L, extrato de levedura – 5,0 g/L, glicose – 6,0

g/L, cloreto de sódio – 2,7 g/L, L-cistina – 0,5 g/L, tioglicolato sódico – 0,5 g/L, ágar – 0,75 g/L) e perólas e vidro (**Figuras 1 e 2**).

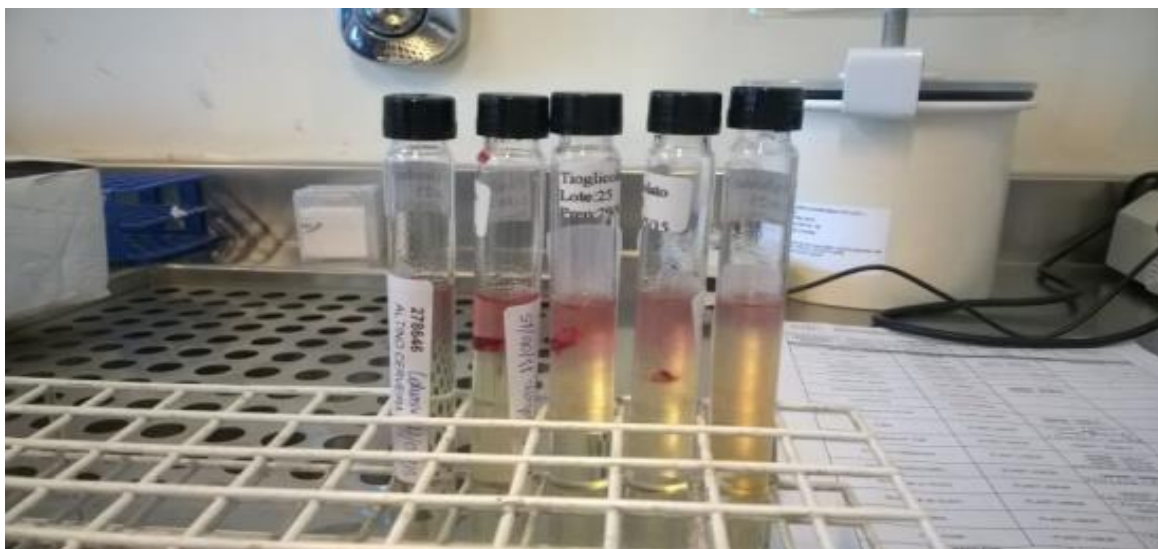


Figura 1. Meio de cultura tioglicolato contendo espécimes clínicos (antes da agitação).



Figura 2. Meio de cultura tioglicolato contendo espécimes clínicos (após agitação).

Os frascos foram identificados com as iniciais do participante do estudo e o tipo e espécime clínico. Após a coleta, os frascos contendo os espécimes clínicos foram mantidos em temperatura ambiente e transportados em maleta própria (**Figura 3**) para o Laboratório de

Biologia dos Anaeróbios no Instituto de Microbiologia Paulo de Goes (UFRJ) no prazo máximo de 2 horas.



Figura 3. Maleta para transporte dos espécimes clínicos.

4.7 Processamento e cultivo dos espécimes clínicos

No Laboratório de Biologia dos Anaeróbios, cada tubo contendo o espécime clínico inoculado no meio de tioglicolato foi submetido ao vortex (Even EVX2800-BI, Brasil) por 15 segundos (**Figura 4**).



Figura 4. Tioglicolato contendo espécime clínico sendo submetido ao vortex.

Todos os tubos foram mantidos em estufa bacteriológica (37°C). Após 24 h, o primeiro subcultivo foi realizado. Com auxílio de uma alça bacteriológica de 100 microlitros (µL), uma alíquota do tioglicolato foi retirada e semeada em agar sangue (5% de sangue de carneiro desfibrinado, base de agar sangue – 40 g/L, agar – 5 g/L) e agar sangue anaeróbico (5% de sangue de carneiro desfibrinado, base de agar sangue – 40 g/L, agar – 5 g/L, hemina – 10 mL/ L e menadiona – 5 gotas/L). A primeira placa foi incubada em atmosfera capnofílica (5% a 10% dióxido de carbono) e a segunda em anaerobiose estrita utilizando jarra de anaerobiose ou Glove Box (atmosfera contendo 10% de dióxido de carbono, 10% de hidrogênio e 80% de nitrogênio). A leitura das placas foi realizada com 24 h e em caso de crescimento, as colônias foram identificadas. Na ausência de crescimento, as mesmas foram reincubadas e uma nova leitura foi realizada com 72 h. O mesmo procedimento foi utilizado para todos os frascos de tioglicolato (totalizando 5 frascos). Os tubos de tioglicolato contendo os espécimes clínicos foram mantidos em estufa durante 14 dias. Subcultivos foram realizados após 72 h e sempre a cada 3 dias, sendo o último subcultivo realizado no 14º dia de incubação nos mesmos meios de cultura sólidos e atmosferas utilizados nas primeiras 24 h.

4.8 Identificação e teste de sensibilidade

A identificação dos microrganismos foi feita por duas metodologias: para os facultativos foi realizada a identificação e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos através do equipamento Vitek® 2 BioMérieux, Brasil. Os anaeróbios estritos foram identificados por espectrometria de massas com o equipamento Bruker Biotyper® MALDI-TOF, Germany [Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry]. A identificação dos facultativos foi realizada pelo laboratório terceirizado localizado no INTO. A identificação por espectrometria de massas foi feita na UFRJ. Para todas as solicitações de identificação havia um pedido médico assinado e carimbado (**Anexo 5**).

O ponto de corte em que se considerou fidedigna a identificação da espécie foi de 90% para o equipamento Vitek® 2 e entre o score 2,000 e 3,000 para o equipamento MALDI-TOF, de acordo com instruções dos fabricantes. A interpretação do score é feita da seguinte maneira: para scores na faixa de 2.300 a 3.000, é altamente segura a identificação do gênero e da espécie, de 2.000 a 2.299 é segura a identificação do gênero e provável a identificação da espécie. É provável a identificação do gênero com o score de 1.700 – 1.999 e de 0.000 – 1.699, o microrganismo não foi identificado. Ao término da cultura, laudos de pesquisa foram gerados (resultados negativos e positivos com o(s) microrganismo (s) isolado (s) e teste de sensibilidade aos antimicrobianos (**Anexo 4**).

4.9 Coleta, transporte e processamento dos Implantes

Além dos fragmentos de tecido e fluido sinovial, quando o implante era removido, o mesmo era imediatamente colocado em frasco rígido de polipropileno, com fechamento hermético, estéril e 500 mL de solução (Ringer lactato). Todos os frascos foram esterilizados pela Central de Esterilização de Materiais (CEMATE) localizada no INTO, através de um processo físico-químico a base de gás plasma de peróxido de hidrogênio (Sterrads®) e recebiam duas embalagens, de modo que a interna, estéril, só era aberta no momento em que o frasco estava em campo para receber os implantes (**Figura 5**).

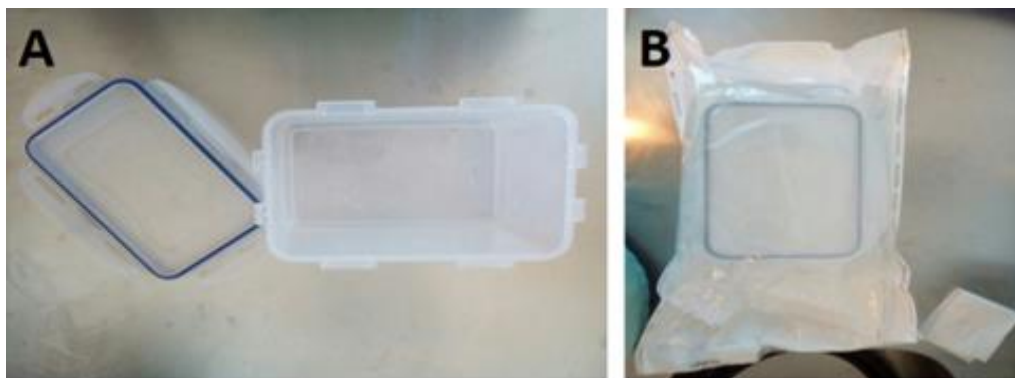


Figura 5. Frascos de polipropileno preparados para o armazenamento de implantes. Visão superior do recipiente antes da esterilização (A). Recipiente estéril preparado para armazenamento do implante (B).

No Laboratório de Biologia dos Anaeróbios os frascos contendo os implantes foram submetidos ao vortex por 1 minuto. Em seguida, o ringer lactato foi distribuído em 4 tubos de plástico cônicos, estéreis, cada um com 50mL, totalizando um volume final de 200 mL. Os tubos de plástico eram centrifugados durante 15 minutos a 1100 xg. Após centrifugados, os sobrenadantes foram desprezados e os *pellets* resultantes colocados em um único frasco cônico estéril. Uma alíquota de 1mL do *pellet* foi colocada em frasco contendo meio de cultura tioglicolato, outra de 0,1mL em meio agar sangue com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e mais 0,1mL em agar sangue com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, hemina e menadiona (agar sangue anaeróbio). A primeira placa foi incubada em atmosfera capnofílica (5% a 10% dióxido de carbono) e a segunda em anaerobiose estrita utilizando jarra de anaerobiose ou Glove Box (atmosfera contendo 10% de dióxido de carbono, 10% de hidrogênio e 80% de nitrogênio) a 37°C. A leitura dos meios sólidos foi feita com 24 h e em caso de crescimento, as colônias foram identificadas. Na ausência de crescimento, as mesmas foram reincubadas e uma nova leitura foi realizada com 72 h de incubação. O frasco de tioglicolato contendo o líquido do vortex foi mantido em estufa durante 14 dias. Subcultivos foram realizados após 72 h e sempre a cada 3 dias, sendo o último subcultivo realizado no 14º dia de incubação nos mesmos meios de cultura sólidos e atmosferas utilizados nas primeiras 24 h. Analisando a literatura, o ponto de corte de 10 UFC/mL foi estabelecido para contagem de colônias (PORTILLO et al., 2013).

4.10 Controle de qualidade dos insumos

Para controle de esterilidade do caldo tioglicolato foi utilizada solução salina 0,9% estéril e para avaliar a capacidade de recuperação dos microrganismos facultativos e anaeróbios estritos foram utilizadas as cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *B. fragilis* 25285. Este controle de qualidade foi realizado sempre a cada novo lote de meio de cultura preparado.

O controle de qualidade dos meios sólidos utilizados no estudo; Agar com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e Agar sangue anaeróbio também foi realizado para avaliar a capacidade de recuperação de microrganismos facultativos e anaeróbios estritos com as cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *B. fragilis* 25285, respectivamente e sempre a cada novo lote.

O controle de qualidade dos frascos utilizados para acondicionamento dos implantes foi feito da seguinte maneira: uma vez a cada semana dois frascos estéreis eram levados simultaneamente ao centro cirúrgico. Um deles recebia o implante e a solução de ringer lactato e o outro, simultaneamente, apenas ringer lactato. Ambos eram processados da mesma maneira com o objetivo de avaliar a esterilidade do frasco sem implante e a ocorrência de contaminação em alguma etapa do processo.

4.11 Procedimentos microbiológicos de rotina (grupo controle)

Não houve interferência da equipe de pesquisa do presente projeto nos procedimentos de transporte e processamento de espécimes clínicos no laboratório de microbiologia do INTO. Em linhas gerais, a rotina utilizada pelo laboratório terceirizado que prestava serviço no INTO na época em que as coletas de espécimes clínicos para o presente estudo estavam sendo realizadas era a seguinte: o mesmo número (5) e tipos de espécimes coletados para esta pesquisa foram coletados para o laboratório de rotina do INTO. Os espécimes eram coletados e colocados em frascos secos, estéreis e de boca larga sem adição de qualquer meio de cultura ou solução salina pela equipe do centro cirúrgico. Os mesmos eram identificados e encaminhados ao

laboratório, porém, não foi possível precisar o tempo decorrido entre a coleta e o processamento, uma vez que isto dependia dos serviços envolvidos no transporte até o laboratório e do próprio laboratório.

Os espécimes eram inoculados em tioglicolato no laboratório e mantidos em estufa 37°C por 24 h. Após este período, um subcultivo era realizado para os meios agar sangue com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e agar chocolate (peptona de caseína – 7,5 g/L, peptona de carne – 7,5 g/L, amido de milho – 1,0 g/L, fosfato dipotássico – 4 g/L, cloreto de sódio – 5,0 g/L, agar – 10,0 g/L, sangue de carneiro – 5%, polienriquecimento 10 mL/L). Os meios sólidos eram mantidos em estufa 37°C por 48 h somente em atmosfera capnófila e o caldo tioglicolato por 5 dias. Não foi possível avaliar de quanto em quanto tempo o subcultivo a partir do tioglicolato era realizado e não foi utilizada nenhuma técnica de maceração das amostras de tecido enviadas para o laboratório de rotina.

4.12 Tamanho amostral e análise estatística

Considerando os relatos de literatura de isolamento de *P. acnes* em pelo menos 60% dos casos de infecção pós artroplastia de ombro e quadril (TUNNEY et al., 1999) e 17,4% em pacientes com espondilodiscite pós-operatória (JIMÉNEZ-MEJÍAS et al., 1999) quando as técnicas adequadas para isolamento de anaeróbios são empregadas, e assumindo uma prevalência de 25% de infecção, foi calculado que seria necessário analisar espécimes clínicos de 164 pacientes com suspeita de infecção pós cirurgias de ombro, quadril, joelho e coluna que envolva instalação de implantes. Este valor foi calculado de modo que seja estimada a prevalência de *P. acnes* na população dos pacientes atendidos no INTO com um erro de 15% e um intervalo de confiança de 95%.

Todos os dados foram registrados em formulários padronizados e digitados em planilha Excel (Microsoft Excel 2013). Os dados foram armazenados no Excel e analisados no Stata

11.0 (STATA Corp. College Station, Texas, EUA). Para análise descritiva dos dados foram calculadas médias, medianas, intervalos interquartis (25-75%), proporções e taxas. Para análise do desempenho dos métodos diagnósticos foram calculadas a sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo e positivo, assim como as razões de verossimilhança positiva e negativa. As variáveis categóricas foram analisadas utilizando o teste do qui-quadrado ou o teste exato de *Fisher*. Variáveis contínuas foram analisadas pelo teste *TStudent* ou *Mann-Whitney*, quando indicado. Os valores de sensibilidade foram comparados através do teste de McNemar. Para avaliação da associação entre variáveis foram calculados riscos relativos. Como estatística de teste foram calculados intervalos de confiança de 95% e os valores de p . O valor de p foi considerado significativo quando menor que 0,05.

5. RESULTADOS

Um total de 67 pacientes submetidos a 68 cirurgias de revisão de implantes ortopédicos foram incluídos no estudo. No entanto, uma paciente submetida a duas cirurgias apresentou resultados de análises histopatológicas conflitantes nos dois procedimentos e foi excluída. Portanto, foram incluídos na análise final 66 pacientes, sendo 48 pacientes com implantes em quadril, 1 com implante em coluna, 12 em joelho e 5 em ombro. A maior parte da população era constituída por pacientes do sexo masculino (56,1%), com idade média de 64,0 anos. A principal doença articular de base foi osteoartrite (37,5%) e o tempo entre a cirurgia original e o início dos sintomas foi superior a 2 anos na maioria (72%). A maior parte dos pacientes apresentou escore de Charlson igual a zero (44 pacientes, 69%); o número (%) de pacientes que apresentou Charlson igual a 1, 2 e 3 foi 12 (19%), 5 (8%) e 3 (5%), respectivamente. A variável foi dicotomizada em 0 vs ≥ 1 para facilitar a análise comparativa entre os grupos. Dentre os sinais e sintomas, a dor (91%) e o afrouxamento do implante (77%) foram os mais significativos na população total (**Tabela 2**).

Tabela 2. Características clínicas e demográficas da população do estudo.

Variáveis % (n/N)	Total (N=66)
Sexo masculino	56% (37/66)
Tabagismo	13% (8/64)
Etilismo	22% (14/64)
Escore Charlson ≥ 1	31% (20/64)
Classificação	
< 3 meses	10% (6/62)
3m a 2 anos	18% (11/62)
2 anos ou mais	72% (45/62)
Articulação	
Quadril	73% (48/66)
Joelho	18% (12/66)
Ombro	8% (5/66)
Coluna	2% (1/66)
Fístula	20% (12/60)
Calor	31% (16/52)
Dor	91% (59/65)
Edema	43% (27/63)
Rubor	30% (18/60)
Secreção	30% (19/63)
Afrouxamento	77% (43/56)
Febre	8% (5/61)
Leucocitose	14% (9/65)

5.1 Definições utilizadas no processo de análise dos dados

Conforme descrição anterior, a definição de infecção associada ao implante ortopédico foi feita com base na presença de um ou mais critérios da IDSA. No entanto, alguns dados clínicos e demográficos não puderam ser obtidos, já que não houve interferência da equipe do projeto no manejo clínico do paciente, assim como resultados de análise histopatológica não estavam disponíveis em 37 dos 66 pacientes, não sendo possível confirmar ou descartar o diagnóstico de infecção com base nos critérios adotados em 19 dos pacientes incluídos. Portanto, para prosseguir na análise dos resultados, os pacientes foram classificados em 5 categorias diagnósticas (grupos), de acordo com os critérios de infecção que foram preenchidos (Tabela 3).

Tabela 3. Grupos criados com base nos critérios IDSA para definição de infecção.

Grupo	Definição	Total de pacientes
Asséptico	Pacientes sem critérios clínicos e microbiológicos para in realizado e negativo	12
A princípio asséptico	Pacientes sem critérios clínicos e microbiológicos de infe com histopatológico não realizado	13
Infecção possível	Cultura positiva com microrganismo de baixa virulência e patológico não realizado, portanto, o diagnóstico de infecção não pôde ser descartado.	5
Infecção provável	Cultura positiva para microrganismo virulento (<i>S.aureus</i>) com histopatológico negativo, porém, em outro componente (tíbia)	1
Infecção confirmada	Pacientes com um ou mais critérios de infecção	35

Tal categorização se justifica pelo fato da própria IDSA reconhecer que cultura positiva para microrganismo virulento de um único espécime clínico pode representar infecção e que a presença de apenas uma amostra de espécime intraoperatório com cultura positiva para microrganismo potencialmente contaminante não deve ser considerada evidencia definitiva de infecção, mas sim ser avaliada no contexto das outras evidências.

Uma vez que os pacientes tiveram seu *status* definido, dois cenários foram criados: Inclusivo e Exclusivo. No cenário Inclusivo os pacientes classificados como tendo o

diagnóstico de infecção confirmada, infecção possível e infecção provável foram alocados no grupo Infecção, e os classificados como assépticos e a princípio assépticos foram alocados grupo Falha asséptica. Neste cenário, 41 pacientes foram classificados como infecção, e 25 como falha asséptica. Já no cenário Exclusivo, os pacientes classificados como infecção possível e infecção provável foram alocados no grupo Falha asséptica, e não no grupo Infecção, como no primeiro cenário. No cenário exclusivo, portanto, 35 pacientes foram classificados como infecção e 31 pacientes como falha asséptica.

5.2 Perfil microbiológico dos espécimes clínicos e implantes submetidos ao protocolo otimizado de cultura

Dos 66 pacientes incluídos, 43 (65%) apresentaram cultura positiva de pelo menos um espécime intraoperatório (fragmento de tecido, líquido articular ou fluido de vortex da prótese) pelo protocolo otimizado de cultura, sendo que 8 (12%), apresentaram cultura positiva exclusivamente para microrganismos anaeróbios estritos (todos *P. acnes*) e 6 (9%) para anaeróbios estritos e facultativos. Além disso, 29 (44%) tinham culturas positivas apenas para microrganismos facultativos; 23 (35%) pacientes apresentaram culturas negativas (**Tabela 4**).

Dentre os anaeróbios estritos, 79% foram *P. acnes*; *C. bifermentans*, *P. distasonis* e *B. fragilis* foram isolados em 7% cada (**Tabela 5**).

Tabela 4. Visão geral dos resultados do diagnóstico microbiológico pelo protocolo otimizado de cultura.

Total de pacientes	Percentual	Classificação dos Microrganismos isolados
6	9%	Estritos e facultativos
8	12%	Anaeróbios estritos
23	35%	Culturas negativas
29	44%	Facultativos

Tabela 5. Espécies de anaeróbios estritos isoladas.

Anaeróbio estrito isolado	Total de pacientes	Percentual
<i>Propionibacterium acnes</i>	11	79%
<i>Clostridium bifermentans</i>	1	7%
<i>Parabacteroides distasonis</i>	1	7%
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	7%

Os 6 casos de culturas polimicrobianas com participação de anaeróbios estritos foram: *C. bifermentans* associado a *K. pneumoniae* e *Staphylococcus hominis*; *P. distasonis* com *S. aureus*; *B. fragilis* com *P. aeruginosa*; *P. acnes* com *S. aureus*; *P. acnes* com *S. warneri* e *S. lugdunensis* e *P. acnes* com *P. aeruginosa*.

Do total de 60 microrganismos isolados, 47% correspondeu ao gênero *Staphylococcus* spp, 10% *Streptococcus* spp, 2% *Clostridium bifermentans*, 18% *P. acnes*, 2% *Paenibacillus* spp e *C. jeikeium*, 2% *P. distasonis* e *B. fragilis*, 7% *P. aeruginosa*, 2% *E. coli* e *Serratia fonticola*, 3% *Enterobacter cloacae* (**Tabela 6**). As espécies *S. aureus* e *S. epidermidis* foram as mais isoladas do gênero, sendo a primeira ligeiramente mais prevalente. Apenas um caso de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) foi encontrado (paciente 57 – **Tabela 8**). Nenhuma enterobactéria, além da espécie *Enterobacter cloacae* produtora de carbapenemase isolada em apenas um caso, foi produtora desta enzima ou de outro mecanismo de resistência aos antimicrobianos. *P. aeruginosa* foi o único BGN não fermentador isolado pelo protocolo otimizado.

Entre os *Streptococcus* spp, as seguintes espécies foram encontradas: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius*, *Aerococcus viridans* e *Abiotrophia defectiva*, uma variante nutricional do gênero *Streptococcus* spp.

Tabela 6. Distribuição dos microrganismos isolados dos 66 pacientes submetidos ao protocolo otimizado de cultura (N=60).

Microrganismos	Total	Percentual
<i>Staphylococcus spp.</i>	28	47%
<i>Streptococcus spp.</i>	6	10%
Bacilos Gram positivos anaeróbios estritos		
<i>Clostridium bifermentans</i>	1	2%
<i>Propionibacterium acnes</i>	11	18%
Bacilos Gram positivos facultativos		
<i>Paenibacillus spp</i>	1	2%
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1	2%
Bacilos Gram negativos anaeróbios estritos		
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	2%
<i>Parabacteroides distasonis</i>	1	2%
Bacilos Gram negativos facultativos		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	3%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	7%
<i>Escherichia coli</i>	1	2%
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	3%
<i>Serratia fonticola</i>	1	2%

O tempo mínimo para isolamento de microrganismos anaeróbios estritos foi de 2 dias e o máximo de 14 dias. Os pacientes com infecção possível ou falha asséptica tiveram o isolamento realizado num tempo compatível com o tempo dos pacientes com infecção confirmada (6 e 10 dias). Entre as 11 cepas isoladas de *P. acnes*, 1 apresentou crescimento com 6 dias de incubação em anaerobiose estrita, 2 com 7 dias e para o crescimento das demais, foram necessários mais de 8 dias, havendo inclusive, cepas que cresceram com 13 e 14 dias de incubação em pacientes com infecção confirmada. Para o crescimento de *P. distasonis* foram necessários 8 dias no tecido e 2 dias no líquido do vortex do implante, 3 dias para *B. fragilis* e 5 dias para o crescimento de *C. bifermentans*. Entre os facultativos, o tempo mínimo para o isolamento foi de 1 dia; o tempo máximo foi de 8 dias, no caso de um único paciente com infecção provável por MRSA. Com exceção dessa cepa de MRSA, todos os demais microrganismos facultativos cresceram dentro dos primeiros seis dias em atmosfera capnofílica.

Os pacientes com infecção possível ou falha asséptica tiveram microrganismos facultativos isolados em cultura entre 2 e 4 dias (Figuras 6 e 7).

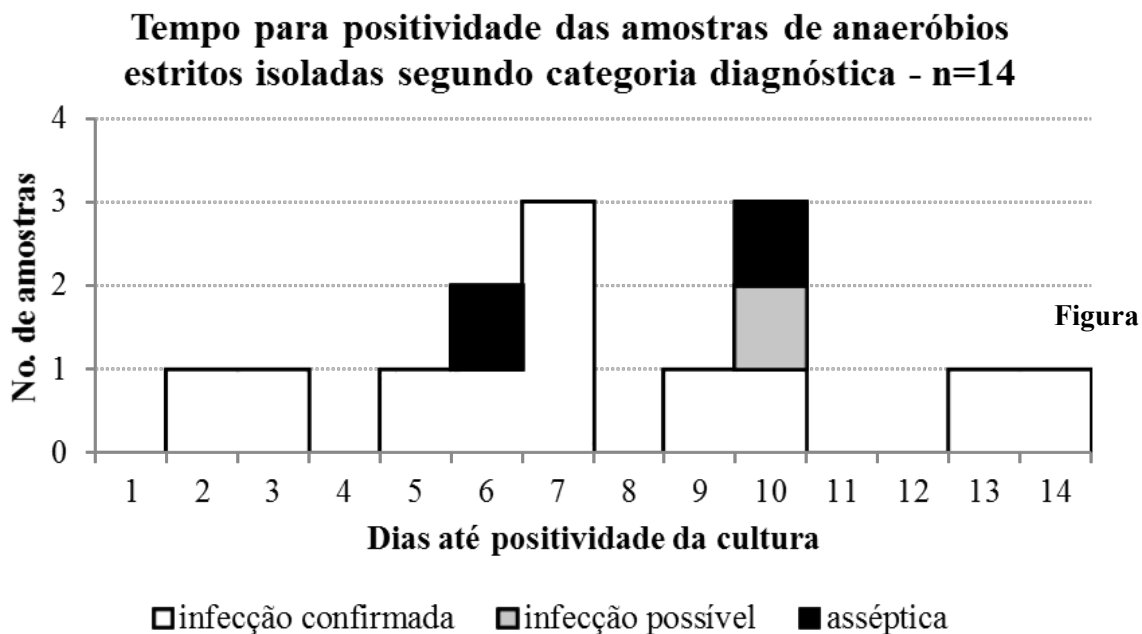


Figura 6. Tempo de positividade dos espécimes para microrganismos anaeróbios estritos.

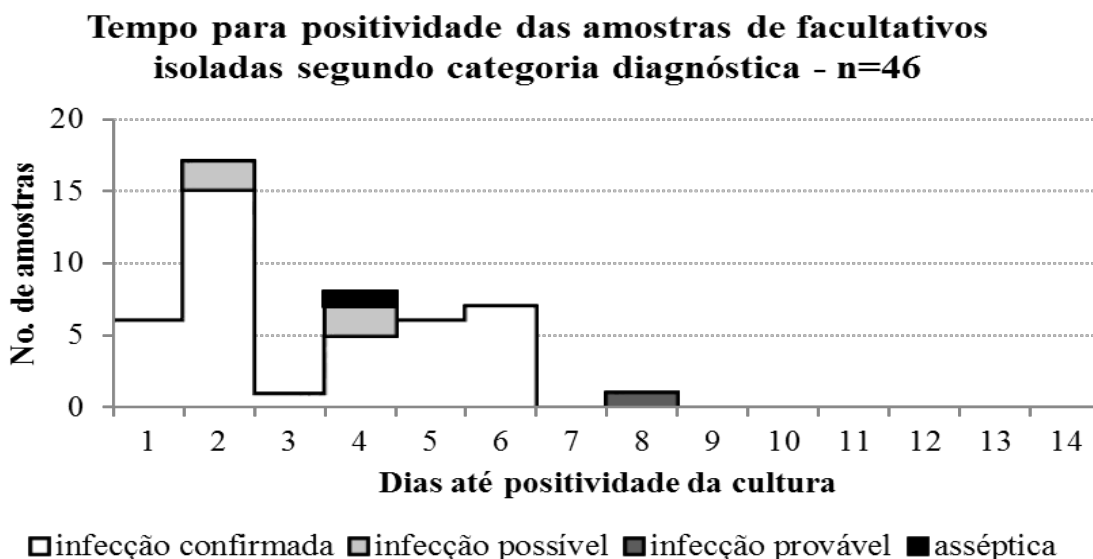


Figura 7. Tempo de positividade dos espécimes para microrganismos facultativos.

A mediana (IIQ) do tempo de incubação necessário para o isolamento dos microrganismos anaeróbios estritos foi de 7 (6-10) dias, estatisticamente superior ao tempo necessário para o isolamento de microrganismos facultativos [2,5 (2-5) dias, $p < 0,001$]. Entre os microrganismos facultativos, o tempo de incubação para isolamento a partir da cultura do fluido do vórtex da prótese foi estatisticamente inferior àquele a partir da cultura dos tecidos [mediana (IIQ): 2 (2-4) vs. 4(2-6) dias, $p = 0,013$] (**Tabela 7**).

Tabela 7. Tempo de incubação necessário para o isolamento de acordo com o microrganismo isolado, diagnóstico e espécime clínico.

Variável		Categorias	Mediana	IIQ	p
Microrganismo		Facultativo	2,5	2 - 5	<0,001
		Anaeróbio estrito	7	6 - 10	
Diagnóstico	Cenário inclusivo	Falha asséptica	6	4 - 10	0,147
		Infecção	4	2 - 6	
	Cenário exclusivo	Falha asséptica	4	4 - 8	0,191
		Infecção	4	2 - 6	
Espécime clínico	Facultativo	Tecido/LA	4	2 - 6	0,013
		Prótese	2	2 - 4	
	Anaeróbio estrito	Tecido/LA	8	6 - 10	0,320
		Prótese	7	3 - 9	

IIQ = Intervalo interquartilico/ p = valor de p

Em relação ao número de espécimes positivos na cultura de tecido otimizada *versus* cultura de tecido convencional, a cultura de tecido otimizada apresentou maior número de espécimes positivos em 7 pacientes (10, 23, 25, 29, 31, 37, 53), e a mesma quantidade de espécimes positivos que o protocolo convencional em 3 pacientes (9, 22, 47); em 19 pacientes, no entanto, a cultura otimizada foi positiva e nenhum espécime foi positivo pela cultura de tecido convencional (pacientes 1, 7, 8, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 26, 27, 28, 48, 51, 52, 57, 58, 62,

65) . A cultura de tecido convencional foi positiva e a cultura de tecido otimizada não apresentou nenhum espécime positivo nos pacientes 17, 41 e 67, porém, o paciente 67 apresentou cultura positiva do fluido do vortex com o mesmo microrganismo isolado na cultura convencional do tecido (**Tabela 8**).

5.3 Perfil microbiológico da cultura de tecido otimizada versus cultura do fluido do vortex

Dos 66 pacientes incluídos no estudo, 39 tiveram os implantes analisados: 26 (66,7%) com cultura do fluido do vortex positiva e 13 (33,3%), negativa. Nenhum paciente apresentou contagem de colônia inferior a 10 UFC/mL e a contagem máxima encontrada foi de 150 UFC/mL. Entre os 39 pacientes com cultura do fluido do vortex realizada, 12 (30,8%) apresentaram divergências em relação à cultura de tecido/LA, sendo o crescimento de microrganismo no fluido do vortex e não no tecido (cultura otimizada e convencional) a mais observada (58% - pacientes 40, 41, 49, 50, 60, 66, 67). Os microrganismos isolados no fluido do vortex e não isolados no tecido ou líquido articular foram: *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. dysgalactiae*, *P. acnes*. Em 1 caso (8% - paciente 57), o microrganismo *S. aureus* foi isolado no tecido, em apenas 1 espécime, mas não no vortex. Este paciente foi classificado como provavelmente infectado. Um paciente (nº 22), apresentou *E. coli* e *E. faecalis* isolados em 5 espécimes de tecido e no fluido do vortex, mas além destes, *S. anginosus* foi isolado apenas no fluido do vortex. O paciente 47 apresentou, respectivamente, *S. aureus*, *S. agalactiae* e *S. fonticola* em 4 espécimes de tecido e somente *S. aureus* no vortex. O paciente 62 apresentou *Aerococcus viridans* e *S. hominis* apenas em um 1 espécime de tecido e no fluido do vortex somente *S. hominis*. Dois pacientes (29 e 63) apresentaram diferentes microrganismos isolados nos espécimes de tecido e fluido do vortex. Paciente 29 apresentou *S. capitis* em 5 espécimes de tecido e *S. aureus* no fluido do vortex. Já o 63, apresentou

Corynebacterium jeikeium em 2 espécimes de tecido e *Paenobacillus* spp no fluido do vortex (Tabela 8).

5.4 Prevalência de anaeróbios estritos de acordo com os critérios estabelecidos

Dos 41 pacientes classificados como infecção de acordo com o cenário Inclusivo, 12 tiveram anaeróbios estritos isolados (11 com infecção confirmada e 1 com infecção possível), o que significa uma prevalência de 29,3% IC95% (16,1%-45,5%). Dos 35 pacientes classificados como infecção de acordo com o cenário exclusivo, 11 tiveram isolamento de anaeróbios estritos, o que significa uma prevalência de 31,4% (IC95% 16,9%-49,3%). É importante notar que nenhum microrganismo anaeróbio estrito foi isolado pelo protocolo de cultura convencional e em apenas 2 casos o diagnóstico foi de falha asséptica e em 1, de infecção possível (pacientes 15, 48 e 49), todos com cultura positiva para *P. acnes*. A infecção foi confirmada, portanto, em 8 dos 11 pacientes que apresentaram resultado de cultura positiva para *P. acnes*, sendo 1 paciente do ombro e 7 pacientes do quadril (Tabela 9).

Tabela 8. Resultados observados nos três métodos: cultura otimizada de espécimes clínicos, cultura do fluido do vortex da prótese, cultura convencional de espécimes clínicos, diagnóstico de falha, número de espécimes positivos nos métodos e articulação.

Paciente	Resultado da cultura otimizada de espécimes clínicos e n° espécimes positivos		Resultado da cultura do fluido do vortex da prótese	Resultado da cultura convencional de espécimes clínicos e n° espécimes positivos		Diagnóstico da falha	Articulação
1	<i>P. acnes</i>	2	NA	negativa	0	infecção	Ombro
2	negativa	0	NA	negativa	0	a princípio asséptica	Ombro
3	negativa	0	NA	negativa	0	a princípio asséptica	Ombro
4	<i>C. bifementans/K. pneumoniae/S. hominis</i>	1	NA	<i>K. pneumoniae/S. hominis</i>	3	infecção	Quadril
5	negativa	0	NA	negativa	0	a princípio asséptica	Quadril
6	<i>K. pneumoniae/E. cloacae</i>	4	NA	<i>K. pneumoniae/E. cloacae</i>	7	infecção	Quadril
7	<i>Abiotrophia defectiva</i>	1	NA	negativa	0	infecção	Quadril
8	<i>P. acnes</i>	4	NA	negativa	0	infecção	Quadril
9	<i>S. aureus</i>	5	NA	<i>S. aureus</i>	5	infecção	Quadril
10	<i>S. epidermidis</i>	2	NA	<i>K. pneumoniae</i>	1	infecção	Quadril
11	<i>S. lugdunensis</i>	5	NA	negativa	0	infecção	Quadril
12	negativa	0	NA	negativa	0	asséptica	Quadril
13	negativa	0	NA	negativa	0	a princípio asséptica	Quadril
14	<i>P. acnes</i>	2	NA	negativa	0	infecção	Quadril
15	<i>P. acnes</i>	1	NA	negativa	0	asséptica	Quadril
16	<i>P. aeruginosa/S. epidermidis</i>	4	NA	negativa	0	infecção	Quadril
17	negativa	0	NA	<i>S. capitis/S. agalactiae</i>	2	infecção	Quadril
18	<i>P. acnes</i>	2	NA	negativa	0	infecção	Quadril
19	<i>S. epidermidis</i>	4	NA	negativa	0	infecção	Quadril
20	negativa	0	NA	negativa	0	a princípio asséptica	Quadril
21	negativa	0	NA	negativa	0	a princípio asséptica	Quadril
22	<i>E. coli/E. faecalis</i>	5	<i>E. coli/E. faecalis/S. anginosus</i>	<i>E. coli/E. aerogenes</i>	5	infecção	Joelho
23	<i>S. aureus/Parabacteroides distasonis</i>	4	<i>S. aureus/Parabacteroides distasonis</i>	<i>S. aureus</i>	2	infecção	Quadril

24	<i>P. aeruginosa/P. acnes</i>	3	NA	<i>P. aeruginosa</i>	5	Infecção	Quadril
25	<i>P. aeruginosa</i>	5	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa/Acinetobacter spp.</i>	4	Infecção	Quadril
26	<i>S. aureus</i>	2	<i>S. aureus</i>	negativa	0	Infecção	Quadril
27	<i>S. intermedius</i>	2	<i>S. intermedius</i>	negativa	0	infecção	Quadril
28	<i>S.aureus/P.acnes</i>	2	NA	negativa	0	infecção	Quadril
29	<i>S. capitis</i>	5	<i>S. aureus</i>	<i>S. capitis</i>	1	infecção	Joelho
30	negativa	0	negativa	negativa	0	a princípio asséptica	Quadril
31	<i>E. cloacae</i>	5	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	2	Infecção	Quadril
33	negativa	0	NA	negativa	0	Asséptica	Quadril
34	negativa	0	NA	negativa	0	a princípio asséptica	Joelho
36	negativa	0	negativa	negativa	0	Asséptica	Quadril
37	<i>P. acnes</i>	3	<i>P. acnes</i>	<i>S. cohnii ssp ureolyticus/S. mitis</i>	2	Infecção	Quadril
38	negativa	0	negativa	negativa	0	Asseptica	Quadril
39	negativa	0	negativa	negativa	0	a princípio asséptica	Quadril
40	negativa	0	<i>S. haemolyticus</i>	negativa	0	asséptica	Quadril
41	negativa	0	<i>S. warneri</i>	<i>D. acidovorans</i>	1	infecção possível	Quadril
42	negativa	0	negativa	negativa	0	asséptica	Quadril
43	negativa	0	negativa	negativa	0	asséptica	Quadril
44	<i>S. warneri/S. lugdunensis/P. acnes</i>	2	<i>S. warneri/S. lugdunensis/P. acnes</i>	<i>S. epidermidis/S. lugdunensis</i>	5	infecção	Quadril
45	negativa	0	negativa	negativa	0	asséptica	Quadril
46	negativa	0	negativa	negativa	0	a princípio asséptica	Quadril
47	<i>S. aureus/S. agalactiae/S. fonticola</i>	4	<i>S. aureus</i>	<i>P. stuartii/S. aureus</i>	4	infecção	Quadril
48	<i>P. acnes</i>	1	NA	negativa	0	infecção	Quadril
49	negativa	0	<i>P. acnes</i>	negativa	0	asseptica	Joelho
50	negativa	0	<i>S. auricularis</i>	negativa	0	infecção	Joelho
51	<i>P. aeruginosa/B. fragilis</i>	2	<i>P. aeruginosa/B. fragilis</i>	negativa	0	infecção	Joelho
52	<i>S. epidermidis</i>	1	<i>S. epidermidis</i>	negativa	0	infecção	Quadril
53	<i>S. aureus</i>	5	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	2	infecção	Quadril

54	<i>S. aureus</i>	4	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	6	infecção	Quadril
55	negativa	0	negativa	negativa	0	a princípio asséptica	Joelho
56	negativa	0	negativa	negativa	0	a princípio asséptica	Joelho
57	<i>S. aureus</i>	1	negativa	negativa	0	Infecção	Joelho
58	<i>S. aureus</i>	4	<i>S. aureus</i>	negativa	0	Infecção	Joelho
59	negativa	0	negativa	negativa	0	a princípio asséptica	Ombro
60	negativa	0	<i>S. captis</i>	negativa	0	Infecção	Quadril
61	negativa	0	negativa	negativa	0	asséptica	Quadril
62	<i>Aerococcus viridans/S. hominis</i>	1	<i>S. hominis</i>	negativa	0	infecção	Ombro
63	<i>C. jejkeium</i>	2	<i>Paenobacillus spp</i>	<i>S. captis</i>	1	infecção	Quadril
64	negativa	0	negativa	negativa	0	asséptica	Quadril
65	<i>S. epidermidis</i>	1	<i>S. epidermidis</i>	negativa	0	infecção	Joelho
66	negativa	0	<i>S. epidermidis</i>	negativa	0	infecção	Quadril
67	negativa	0	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	6	infecção	Quadril
68	<i>S. pyogenes</i>	4	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pyogenes</i>	1	infecção	Joelho

Tabela 9. Pacientes com infecção por anaeróbios estritos - sumário dos resultados do protocolo de cultura otimizado e classificação da infecção.

Paciente (Nº estudo)	Anaeróbio (estrito)	Especime positivo (tipo e nº)	Outros microrganismos isolados	Classificação da Infecção (Possível, provável, confirmada)	Articulação
1	<i>P. acnes</i>	2 (tecido)	Não houve	Confirmada	Ombro
8	<i>P. acnes</i>	4 (tecido)	Não houve	Confirmada	Quadril
14	<i>P. acnes</i>	1 (tecido)	Não houve	Confirmada	Quadril
18	<i>P. acnes</i>	implante	Não houve	Confirmada	Quadril
23	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2 (tecido)	<i>S. aureus</i>	Confirmada	Quadril
24	<i>P. acnes</i>	3 (tecido)	<i>P. aeruginosa</i>	Confirmada	Quadril
28	<i>P. acnes</i>	2 (tecido)	<i>S. aureus</i>	Confirmada	Quadril
37	<i>P. acnes</i>	tecido)	Não houve	Confirmada	Quadril
44	<i>P. acnes</i>	implante	<i>S. lugdunensis</i> e <i>S. warneri</i>	Confirmada	Quadril
48	<i>P. acnes</i>	1 (tecido)	Não houve	Possível	Quadril
15	<i>P. acnes</i>	1 (Líquido)	Não houve	Asséptica	Quadril
49	<i>P. acnes</i>	implante	Não houve	Asséptica	Joelho
51	<i>Bacteroides fragilis</i>	4 (tecido)	<i>P. aeruginosa</i>	Confirmada	Joelho

5.5 Comparação das características clínicas e demográficas de pacientes com IAIO causada exclusivamente por anaeróbios estritos, com infecção causada por microrganismos facultativos e com falha asséptica

Os pacientes classificados como infecção possível ou provável foram excluídos da análise comparativa entre os pacientes com infecção monomicrobiana por agentes anaeróbios estritos (Grupo anaeróbio estrito - AnE, n=4), os com infecção por algum microrganismo facultativo (Grupo facultativo - Fac, n=21) e os com falha asséptica (Grupo falha asséptica - FA, n=25).

Dentre os indivíduos com infecção causada por microrganismo facultativo, 55% (17/31) eram do sexo masculino, enquanto no grupo com falha asséptica esse percentual foi de 72% (18/25). Todos os pacientes com infecção monomicrobiana comprovada por anaeróbio estrito (todos *P. acnes*) eram do sexo feminino, o que diferiu de forma estatisticamente significativa do observado nos demais grupos (Fac vs. AnE, $p=0,039$; FA vs. AnE, $p=0,006$).

O escore de Charlson foi ≥ 1 em 31% do total de pacientes avaliados (20/64). No grupo de indivíduos com infecção causada por microrganismos facultativos foi de 30% (9/30), 0% no grupo de indivíduos com infecção causada exclusivamente por anaeróbios estritos (0/3) e 32% (8/25) nos pacientes com falha asséptica. Não houve diferença estatisticamente significativa comparando os 3 grupos ($p=0,266$ – Fac vs AnE), ($p=0,873$ – Fac vs FA), ($p=0,246$ – AnE vs FA).

Do total de pacientes incluídos no estudo com infecção comprovada, 72% (45/62) apresentavam infecção tardia, assim como todos os pacientes com infecção causada por microrganismos anaeróbios estritos – 100% (3/3) e 64% (18/28) dos que tiveram infecção causada por microrganismos facultativos. Dentre os pacientes com falha asséptica, 76% (19/25) apresentaram sintomas após 2 anos da instalação do implante.

Do total de indivíduos avaliados, 20% (12/60) apresentaram fístula. No grupo dos pacientes com infecção causada por microrganismos facultativos esse percentual foi de 43%

(12/28). Nenhum paciente com infecção monomicrobiana causada por anaeróbio estrito apresentou fístula. Foi observada diferença estatisticamente significativa apenas comparando o grupo de pacientes com infecção causada por microrganismos facultativos com aqueles que apresentaram falha asséptica (43% vs. 0%, $p < 0,001$).

Outros sintomas que diferiram estatisticamente entre o grupo de pacientes com infecção por facultativos e o de falha asséptica foram rubor, secreção na ferida operatória e afrouxamento. Curiosamente, a leucocitose foi mais prevalente entre os pacientes com infecção por anaeróbio estrito comparado com aqueles que tiveram diagnóstico de falha asséptica (67% vs 8%, $p=0,045$). Os resultados das variáveis categóricas dos três grupos avaliados, e suas respectivas análises comparativas, encontram-se na **tabela 10**.

Na população total ($N=66$), a mediana (IIQ) da variável contínua PCR-t foi de 14 (4-32) mg/mL, sendo mais elevada na população de pacientes com infecção por microrganismos facultativos [22 (11-45) mg/mL] e no único paciente com infecção por anaeróbio estrito que teve avaliação de PCR-T antes da revisão (28 mg/mL) do que nos pacientes com falha asséptica [6 (2-15) mg/mL]. A diferença estatística foi significativa comparando Fac vs FA ($p=0,004$). Já a mediana (IIQ) da VHS na população total foi de 52,5 (23-89) mm/h e também mais elevada na população de pacientes com infecção causada por anaeróbios estritos [87,5 (80-95) mm/h] e por facultativos [65 (35-100) mm/h] do que nos pacientes com falha asséptica. A diferença foi estatisticamente significativa comparando os grupos AnE vs FA ($p= 0,044$) e Fac vs FA ($p=0,038$) (**Tabela 11**).

Tabela 10. Características demográficas e clínicas dos pacientes no estudo e de acordo com a etiologia da falha (asséptica vs infecção exclusivamente por anaeróbio estrito vs. infecção por algum facultativo) - variáveis categóricas.

Variáveis	Grupo Fac Facultativos (N=31)	Grupo AnE Anaeróbio Estrito Exclusivo (N=4)	Grupo FA Falha asséptica (N=25)	Fac vs AnE P	Fac vs FA P	AnE vs FA P
Sexo masculino	55% (17/31)	0% (0/4)	72% (18/25)	0,039	0,187	0,006
Tabagismo	16% (5/31)	0% (0/3)	13% (3/24)	1,000	1,000	1,000
Etilismo	23% (7/30)	0% (0/3)	28% (7/25)	1,000	0,692	0,551
Escore Charlson ≥ 1	30% (9/30)	0% (0/3)	32% (8/25)	0,266	0,873	0,246
Classificação						
< 3meses	11% (3/28)	0% (0/3)	12% (3/25)			
3m a 2 anos	25% (7/28)	0% (0/3)	12% (3/25)	0,673	0,469	1,000
2 anos ou mais	64% (18/28)	100% (3/3)	76% (19/25)			
Articulação						
Quadril	74% (23/31)	75% (3/4)	72% (18/25)			
Joelho	19% (6/31)	0% (0/4)	16% (4/25)	0,417	0,544	0,748
Ombro	3% (1/31)	25% (1/4)	12% (3/25)			
Coluna	3% (1/31)	0% (0/4)	0% (0/25)			
Fístula	43% (12/28)	0 % (0/2)	0% (0/24)	0,503	< 0,001	-
Calor	36% (9/25)	0% (0/2)	26% (5/19)	0,538	0,534	1,000
Dor	87% (27/31)	100% (3/3)	92% (23/25)	1,000	0,682	1,000
Edema	66% (19/29)	0% (0/3)	28% (7/25)	0,058	0,007	0,551
Rubor	55% (16/29)	0% (0/2)	9% (2/23)	0,226	< 0,001	1,000
Secreção	61% (19/31)	0% (0/2)	0% (0/24)	0,172	< 0,001	-
Afrouxamento	67% (18/27)	100% (1/1)	82% (18/22)	1,000	0,333	1,000
Febre	13% (4/30)	0% (0/3)	0% (0/23)	1,000	0,124	-
Leucocitose	16% (5/31)	67% (2/3)	8% (2/25)	0,101	0,443	0,045

Fac = Facultativo / AnE= anaeróbio estrito/ FA= falha asséptica/ p= valor de p

Tabela 11. Características demográficas e clínicas dos pacientes no estudo de acordo com a etiologia da falha (asséptica vs. infecção exclusivamente por anaeróbio estrito vs. infecção por algum facultativo) - variáveis contínuas.

Variáveis	Total (N=66)	Grupo Fac Facultativos (N=21)	Grupo AnE Anaeróbio Estrito Exclusivo (N=4)	Grupo FA Falha asséptica (N=25)	Fac vs AnE P	Fac vs FA P	AnE vs FA P
Mediana (IQ)							
PCR - T (mg/L) (n=47)	14 (4 - 32)	22 (11 - 45)	28 (28-28)	6 (2 -15)	0,842	0,004	0,260
VHS (mm/h) (n=30)	52,5 (23-89)	65 (35-100)	87,5 (80-95)	30 (16,5-62,5)	0,653	0,038	0,044
IMC (Kg/m²) (n=64)	26 (23-31)	27 (23-34)	25 (23-34)	25 (22-29)	0,957	0,132	0,694
Idade (anos) (n=66)	64 (55-75)	65 (55-74)	67 (61-75)	60 (53-75)	0,717	0,711	0,411

Fac = Facultativo / AnE= anaeróbio estrito/ FA= falha asséptica/ IQ = intervalo interquartilico/ p = valor de p

5.6 Comparação do desempenho da cultura otimizada (protocolo experimental) *versus* cultura convencional (controle) de espécimes clínicos intraoperatórios no diagnóstico de infecção associada a implante ortopédico

Dos 41 pacientes com infecção definida pelo critério Inclusivo, 35 tiveram cultura positiva pelo protocolo experimental (sensibilidade de 85,4%). Dos 25 com falha asséptica, 24 tiveram cultura negativa (especificidade de 96,0%). Já quando usamos o critério Exclusivo, a sensibilidade da cultura otimizada foi de 94,3%, enquanto a especificidade foi 90,3%.

A diferença foi estatisticamente significativa entre a sensibilidade e a acurácia da cultura convencional e a da cultura otimizada, com melhores resultados do protocolo experimental em relação ao controle. Não houve diferença significativa nos valores de especificidade entre os dois protocolos (**Tabela 12**).

Tabela 12. Desempenho da cultura dos espécimes clínicos intraoperatórios (tecido e líquido articular), comparando protocolo experimental com protocolo convencional.

Critério inclusivo*: Infecção=41 Falha asséptica=25				Critério exclusivo**: Infecção=35 Falha asséptica=31					
Cultura otimizada de espécime clínico (IC95%)		Cultura convencional de espécime clínico (IC95%)		P	Cultura otimizada de espécime clínico (IC95%)		Cultura convencional de espécime clínico (IC95%)		P
Sensibilidade	85,4% (70,8%-94,4%)	48,8% (32,9%-64,9%)	0,002	94,3% (80,8%-99,3%)	54,3% (36,6%-71,2%)	0,001			
Especificidade	96,0% (79,6%-99,9%)	100,0% (86,3%-100,0%)	1,000	90,3% (74,2%-98,0%)	96,8% (83,3%-99,9%)	0,625			
Acurácia	89,4% (79,4%-95,6%)	68,2% (55,6%-79,1%)	0,004	92,4% (83,2%-97,5%)	74,2% (62,0%-84,2%)	0,017			
Razão de verossimilhança positiva	21,34	∞	-	9,74	16,83	-			
Razão de verossimilhança negativa	0,15	0,512	-	0,06	0,47	-			

* Pacientes com diagnóstico de infecção possível ou provável foram incluídos no grupo Infecção.

** Pacientes com diagnóstico de infecção possível ou provável foram incluídos no grupo Falha asséptica

IC95% = Intervalo de confiança 95%

p = Valor de p

5.7 Comparação do desempenho da cultura otimizada de espécimes clínicos intraoperatórios versus cultura de vortex do implante no diagnóstico de IAIO

Dos 25 pacientes com infecção definida pelo critério Inclusivo, 24 tiveram cultura positiva do fluido do vortex da prótese (sensibilidade 96%). Dos 15 com falha asséptica, 13 tiveram cultura do fluido do vortex negativa (especificidade 86,7%).

Já quando usamos o critério Exclusivo, a sensibilidade do vortex foi de 100%, enquanto a especificidade foi 70%.

Considerando apenas os pacientes que tiveram a cultura do fluido do vortex da prótese realizado, a cultura otimizada de espécimes clínicos utilizando o protocolo experimental apresentou sensibilidade e especificidade de 80% e 100%, respectivamente, quando usamos o critério Inclusivo.

Quando usamos o critério Exclusivo, tanto a sensibilidade quanto a especificidade do protocolo otimizado de cultura de espécime clínico entre os pacientes que foram submetidos à cultura do fluido do vortex da prótese foi de 95%.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a sensibilidade, especificidade e acurácia da cultura do fluido do vortex da prótese e a da cultura otimizada, independente do critério de infecção utilizado (**Tabela 13**).

Tabela 13. Desempenho da cultura do vortex do implante e da cultura otimizada dos espécimes clínicos intraoperatórios (tecido e líquido articular) (N=40).

Critério inclusivo*: Infecção=25 Falha asséptica=15					Critério exclusivo**: Infecção=20 Falha asséptica=20				
Cultura do Vortex do implante		Cultura otimizada de espécime clínico		P	Cultura do Vortex do implante		Cultura otimizada de espécime clínico		P
(IC95%)		(IC95%)			(IC95%)		(IC95%)		
Sensibilidade	96,0% (87,7%-104,3%)	80,0%	(63,1%-96,9%)	0,219	100,0% (100,0%-100,0%)	95,0%	(84,5%-105%)	1,000	
Especificidade	86,7% (67,2%-106,2%)	100,0%	(100,0%-100,0%)	0,500	70,0% (48,0%-92,0%)	95,0%	(84,5%-105,5%)	0,125	
Acurácia	92,5% (84,0%-101,0%)	87,5%	(76,8%-98,2%)	0,727	85,0% (73,4%-96,6%)	95,0%	(87,9%-102,1%)	0,289	
Razão de verossimilhança positiva	7,20	∞		-	3,33	19,00		-	
Razão de verossimilhança negativa	0,05	0,20		-	0,00	0,05		-	

* Pacientes com diagnóstico de infecção possível ou provável foram incluídos no grupo Infecção.

** Pacientes com diagnóstico de infecção possível ou provável foram incluídos no grupo Falha asséptica. IC95% = Intervalo de confiança 95% p = Valor de p.

6. DISCUSSÃO

O estudo avaliou o impacto de um protocolo otimizado de cultura no diagnóstico de IAIO em 66 pacientes submetidos à cirurgia para revisão do implante ortopédico em um Instituto Nacional de referência em Ortopedia. Pouco mais da metade da população total era constituída por indivíduos do sexo masculino. Existem estudos que consideram esta variável um dos fatores de risco para infecção, porém, a plausibilidade biológica é incerta (ONG et al., 2009; JAMSEN et al., 2010) ou não está associada ao aumento do risco (ACHERMANN et al., 2011). Dentre os pacientes com infecção causada por microrganismos facultativos, 55% eram do sexo masculino. Curiosamente, todos os pacientes com infecção monomicrobiana comprovada pelo anaeróbio estrito *P. acnes* eram do sexo feminino, o que diferiu de forma estatisticamente significativa do observado nos demais grupos (Fac vs. AnE, $p=0,039$; FA vs. AnE, $p=0,006$). De acordo com a literatura, a carga bacteriana deste microrganismo é maior na pele de indivíduos do sexo masculino, o que favoreceria uma maior incidência de infecção provocada por *P. acnes* nesse grupo de pacientes, ao contrário do observado. Uma das fontes de contaminação é a microbiota cutânea dos profissionais da saúde no momento cirúrgico, o que talvez pudesse contribuir para o achado do presente estudo (ACHERMANN et al., 2014).

A osteoartrite foi a doença articular mais prevalente (37,5%), semelhante ao que foi observado por PEREIRA e colaboradores (2010). Artrite reumatóide é o fator de risco para infecção mais frequentemente relatado (BONGARTZ et al., 2008; ACHERMANN et al., 2011; TANDE e PATEL, 2014). Segundo ASLAM e DAROUICHE, 2012, o risco de infecção em pacientes com artrite reumatóide aumenta quase três vezes quando comparado com aqueles que apresentam osteoartrite. Na população do estudo não foi possível avaliar essa associação pois só havia um paciente com diagnóstico de artrite reumatóide.

As manifestações clínicas das IAIO variam e dependem de alguns fatores como a resposta imune do hospedeiro, a virulência do (s) microrganismo (s) envolvido (s) na infecção, a estrutura do tecido ao redor da articulação e qual a articulação envolvida. (TANDE e PATEL, 2014; DRAGO e VECCHI, 2017). No estudo, o grupo de pacientes com infecção por microrganismos facultativos apresentou frequência de fístula, edema rubor e secreção estatisticamente superior a do grupo de pacientes com falha asséptica. Não foi descrito, neste estudo, qualquer um destes sintomas no grupo de pacientes com infecção exclusiva por microrganismos anaeróbios estritos, composto unicamente por pacientes com infecção monomicrobiana por *P. acnes*. Esse achado corrobora o que é descrito em literatura para as infecções provocadas por esse microrganismo (ZAPPE et al., 2008), mas não para casos onde a espécie *B. fragilis* é encontrada. Nestas infecções, sintomas como febre, purulência e hiperemia são relatados (SANDERS e KAPLOWITZ, 1980; HICKEY et al., 1990; PATTISON et al., 1995). Vale ressaltar que o paciente com infecção por *B. fragilis* apresentou dor, edema, rubor, febre e fístula com secreção purulenta, porém teve isolamento concomitante de *P. aeruginosa*, não sendo possível atribuir os sintomas a uma ou a outra etiologia. A dor é o sintoma mais citado nos casos de infecção por *P. acnes*, e foi o sintoma mais prevalente em todos os grupos avaliados, estando presente em 100% dos pacientes com infecção exclusiva por anaeróbios estritos, em 87% dos que apresentaram infecção por microrganismos facultativos e 92% dos pacientes com falha asséptica. O único outro sinal presente no grupo de infecção exclusiva por anaeróbios estritos foi o afrouxamento, presente em 100% dos pacientes desse grupo. Esse sinal foi o segundo mais prevalente nos demais grupos, não havendo diferença significativa entre os mesmos.

VHS e PCR-t são marcadores inflamatórios utilizados como critério diagnóstico menor na definição de infecção (PARVIZI et al., 2011; OUSSEDIK et al., 2012; OSMON et al., 2013). Quando ambos são negativos, a probabilidade de infecção é baixa (BERBARI et al., 2010b).

Estes marcadores inflamatórios podem apresentar resultado falso negativo ou pouco alterado em casos de infecção por microrganismos anaeróbios estritos e microrganismos pouco virulentos (SHAH et al., 2015; PARVIZI et al., 2016). Previsivelmente, no presente estudo os valores de PCR-t e VHS foram mais elevados no grupo de pacientes com infecção por microrganismos facultativos, de forma estatisticamente significativa, em relação aos pacientes com falha asséptica. De forma surpreendente, no entanto, a VHS também se mostrou estatisticamente mais elevada no grupo de pacientes com infecção por anaeróbio estrito em relação aos pacientes com falha asséptica; o único paciente com infecção por anaeróbio estrito que teve PCR-t mensurada antes da revisão também apresentou valor de PCR-t elevado. Outro achado surpreendente foi o percentual de pacientes com leucocitose estatisticamente mais elevado (67% vs 8% p 0,045) em pacientes com infecção por anaeróbios estritos apenas quando comparado com aqueles pacientes com diagnóstico de falha asséptica. Apenas 16% dos pacientes com infecção causada por facultativos apresentou leucocitose. Uma possível explicação para estes achados, além do acaso, dado a pequena amostra, é o fato dos pacientes do grupo anaeróbio exclusivo que tiveram os valores de VHS e PCR-t aferidos antes da revisão e disponíveis para análise apresentarem IAIO tardia pós artroplastia de quadril. Como uma parte significativa da literatura a respeito de IAIO por *P. acnes* trata de IAIO pós cirurgias de ombro, o perfil de pouca reação inflamatória produzida pode se dever a um fenômeno mais relacionado às particularidades do sítio de infecção do que do agente etiológico propriamente dito.

O IMC é um fator de risco para infecção (TANDE e PATEL, 2014). O grupo de pacientes com infecção por microrganismos facultativos apresentou o IMC mais elevado entre os grupos (27 kg/m²), porém, não houve diferença estatística significativa entre os 3 grupos avaliados.

No presente estudo, 72% da população total com infecção comprovada apresentou sintomas em um período igual ou superior a 2 anos após a instalação do implante.

Enterobactérias, *S. aureus*, SCN, *P. aeruginosa*, *S. agalactiae* e *S. pyogenes* foram isolados em 64% destes pacientes. Todos os pacientes com infecção causada exclusivamente por anaeróbios estritos também apresentaram sintomas no período de 2 anos ou mais após instalação do dispositivo, assim como 76% (19/25) dos pacientes com falha asséptica. O perfil microbiológico e o tempo sugerem que a via de contaminação da maior parte dos indivíduos com infecção neste estudo foi hematogênica, conforme descrito em literatura (LEGOUT e SENNEVILLE, 2013b; SHAH et al., 2015).

Em relação ao perfil microbiológico, a maior parte dos pacientes (44%) apresentou cultura positiva com microrganismos facultativos e tinham infecção confirmada, principalmente com espécies do gênero *Staphylococcus* spp, assim como observado em outros estudos (GALLO et al., 2003; AGGARWAL et al., 2014). Não houve diferença significativa entre o total de culturas positivas para *Staphylococcus aureus* e espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa. De acordo com PHILLIPS e colaboradores (2006), os microrganismos mais prevalentes no seu estudo foram SCN (36%) e *S. aureus* (25%). Dos 14 pacientes que apresentaram cultura positiva com anaeróbios estritos, 11 (78%) tiveram infecção confirmada, das quais 6 (54%) eram polimicrobianas e 5 (45%) monomicrobianas. As espécies *C. bifermentans*, *P. distasonis*, *B. fragilis* foram isoladas em infecções polimicrobianas conforme cenário descrito em literatura para estes microrganismos (SHAH et al., 2015). A espécie *P. acnes* é mais frequentemente encontrada em cenários monomicrobianos de infecção (FIGA et al, 2017). No estudo, 8 pacientes tiveram infecção confirmada por *P. acnes* e destas, 4 eram monomicrobianas e 4 polimicrobianas em associação com *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. warneri* e *S. lugdunensis*, e *S. cohnii ssp urealyticus* e *S. mitis*. De acordo com Tyner e Patel (2016), quando isolado com outros patógenos, *P. acnes* é capaz de aumentar a virulência destes microrganismos e ainda produzir um fator ou promover um ambiente para o desenvolvimento

de biofilme em *S. aureus*. Nenhum estudo foi feito para avaliar esta capacidade com outros microrganismos.

Existem semelhanças entre os resultados encontrados e o que é descrito em literatura no que diz respeito ao tempo necessário de incubação dos espécimes clínicos para isolamento dos patógenos. Cepas de *P. acnes* foram isoladas no período de 6 dias a 14 dias de incubação. É importante considerar que as cepas isoladas no 13º e o no 14º dia eram de pacientes com infecção confirmada. A cepa de *C. bifermentans* foi isolada com 5 dias. *P. distasonis* a partir do tecido, foi isolado com 8 dias e a partir do fluido do vortex com 3 dias, ambos foram casos de infecção confirmada. Analisando o tempo para isolamento dos microrganismos facultativos, observa-se que a maioria foi isolada dentro da primeira semana de incubação e, em apenas 1 caso de provável infecção por *S. aureus*, o microrganismo foi isolado no 8º dia de incubação. Quando incubados em meios de cultura convencionais, a maior parte dos artigos sugere o período de 7 dias para o crescimento de microrganismos facultativos e 14 dias para o isolamento dos fastidiosos, como *P. acnes*, por exemplo (SCHÄFER et al., 2008; SHANNON et al., 2013). Se tivesse sido adotado esse critério, o caso de infecção provável por *S. aureus* não teria sido detectado. A relevância desse achado só poderá ser adequadamente avaliada de acordo com a evolução clínica do paciente. Até a elaboração desse manuscrito o paciente, que não foi tratado como infecção, não havia manifestado sinais e sintomas de infecção periprotética, o que sugere se tratar de um caso de falso positivo. Butler-Wu e colaboradores (2011), recomendam 13 dias de incubação tanto para microrganismos anaeróbios estritos quanto facultativos. Segundo este estudo, 30% das infecções não seriam detectadas se o tempo de cultura fosse ampliado apenas para anaeróbios estritos. Se esse critério tivesse sido adotado não teria sido feita a detecção de um dos casos de infecção confirmada por *P. acnes*. O fato de um paciente com infecção comprovada ter sido isolado no último dia de incubação levanta a hipótese desse tempo ter sido insuficiente para o diagnóstico de todos os casos de infecção por anaeróbio. Por outro lado,

nenhum facultativo foi isolado após o 8º dia, sugerindo ser o critério de 13 dias de incubação excessivo para o diagnóstico desse grupo de microrganismos. A mediana (IIQ) do tempo de incubação necessário para o isolamento dos microrganismos anaeróbios estritos foi de 7 (6-10) dias, estatisticamente superior ao tempo necessário para o isolamento de microrganismos facultativos [2,5 (2-5) dias, $p < 0,001$]. Entre os microrganismos facultativos, o tempo de incubação para isolamento a partir da cultura do fluido do vórtex da prótese foi estatisticamente inferior àquele a partir da cultura dos tecidos [mediana (IIQ): 2 (2-4) vs. 4(2-6) dias, $p = 0,013$]. É possível que o crescimento dos microrganismos de forma mais rápida a partir do fluido do vortex esteja relacionado com a remoção mais eficaz do biofilme diretamente do implante e de forma menos eficaz a partir dos tecidos.

Dentre as 39 culturas de fluido do vortex realizadas, 26 foram positivas. Há estudo que demonstra uma superioridade da sonicação quando se realiza o vortex do implante antes e após este procedimento e mesmo quando o vortex é realizado isoladamente sua sensibilidade é superior se comparada a um controle sem vortex e sonicação (KOBAYASHI et al., 2009). Outro estudo avaliou a sensibilidade do vortex isoladamente e seguida da sonicação. Dependendo do *cutoff*, a sensibilidade da sonicação foi superior ou quase a mesma do vortex (PORTILLO *et al*, 2013). A comparação da sensibilidade da cultura de fluido do vortex e a do tecido, no entanto, ainda não foi descrita em literatura. Embora tenha sido notada uma maior sensibilidade, acompanhada de uma menor especificidade da cultura do fluido do vórtex em relação à cultura de tecido, não houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros de sensibilidade, especificidade e acurácia entre ambas, tanto no critério inclusivo quanto no exclusivo. No entanto, qualitativamente a realização do vortex permitiu o isolamento de microrganismos diferentes, e potencialmente patogênicos, em 4 pacientes. Em 7 pacientes a cultura do fluido do vortex foi positiva e a cultura otimizada foi negativa. Além disso, esta cultura apresentou tempo de positividade significativamente menor do que a cultura de tecido para microrganismos

facultativos. Uma análise mais pormenorizada do impacto da realização do vortex no desfecho clínico, conduta terapêutica e tempo de internação dos pacientes está fora do escopo do presente trabalho e será tema de estudos futuros.

Quando a sensibilidade da cultura otimizada do tecido intraoperatório é comparada com a cultura convencional, tanto utilizando o critério inclusivo (85,4 % vs 48,8%,) quanto exclusivo (94,3% vs 36,6%) respectivamente, observa-se que o protocolo experimental apresenta sensibilidade superior ao convencional. Não é possível definir qual ou quais variáveis interferiram diretamente nesta sensibilidade. Algumas das medidas adotadas em outros estudos, e recomendadas para melhorar o desempenho do diagnóstico microbiológico das IAIO, foram utilizadas no presente, como inoculação em meio de cultura líquido com pérolas de vidro imediatamente após a coleta no centro cirúrgico, a quantidade de espécimes colhidos, agitação do tecido intraoperatório no vortex para desalojar o biofilme, aumento do tempo de incubação para aumentar as chances de recuperação de microrganismos fastidiosos (SCHÄFER et al., 2008; HUGHES et al., 2011; BUTLER-WU ., 2011; PEEL et al., 2016).

A prevalência de anaeróbios estritos foi estimada entre 29,3% (cenário inclusivo) e 31,4% (cenário exclusivo). *P. acnes* foi o microrganismo mais isolado (79,9%). As espécies *C. bifermentans*, *P. distasonis* e *B. fragilis* foram isoladas, cada uma, em 7% dos casos. De acordo com a literatura, a prevalência de anaeróbios em geral, varia de 1% a 12% (MARCULESCU e CANTEY , 2008; SHAH et al., 2015), sendo a espécie *P.acnes* a mais frequentemente encontrada (DRAGO e VECCHI, 2017). Em apenas 3 dos 14 casos de cultura positiva para anaeróbios, o diagnóstico não foi de infecção confirmada. A maior prevalência de anaeróbios na população do presente estudo pode refletir o uso de técnicas mais adequadas para o isolamento deste grupo de microrganismos, incluindo o período pré-analítico, através da inoculação do tecido periprotético e líquido articular em meios líquidos imediatamente no centro cirúrgico, conforme sugerido pelos resultados de publicações voltadas para o isolamento

de microrganismos anaeróbios em pacientes com IAIO. É importante notar que grande parte destes artigos quando descrevem melhorias implementadas para diagnóstico de anaeróbios, citam sempre a espécie *P. acnes*, tanto em relação ao tempo de incubação, quanto ao meio de cultura líquido utilizado em concomitância (HUGHES et al., 2011; BUTLER-WU et al., 2011; SHANNON et al., 2013; PEEL et al., 2016). Outra hipótese para essa alta prevalência é uma peculiaridade da população do estudo.

O estudo apresenta algumas limitações. O tamanho amostral reduzido, a natureza retrospectiva da coleta de dados clínicos e laboratoriais, a falta de dados de exames laboratoriais, da análise histopatológica e de dados clínicos disponíveis em prontuário, limitou a definição mais precisa do diagnóstico de infecção e a análise de fatores associados a um ou outro grupo estudado. No entanto, foi realizada uma análise de sensibilidade para o cálculo dos principais desfechos, com a criação de cenários extremos de maior e menor prevalências possíveis de infecção, análise essa que mostrou a robustez dos resultados apresentados. Com relação ao tamanho amostral, cabe comentar que apesar de inferior ao inicialmente calculado, a prevalência de infecção na população do estudo foi superior ao previsto e acabou por gerar um número de casos suficiente para fornecer uma estimativa da prevalência de anaeróbios com a precisão desejada.

Até onde foi possível averiguar, esse é o primeiro estudo na literatura Nacional que avaliou o impacto de medidas para aprimoramento do protocolo de cultivo de espécimes clínicos (fragmento de tecido e líquido articular) no diagnóstico microbiológico das IAIO, quando comparado a protocolos convencionais dedicados ao diagnóstico de infecções por microrganismos planctônicos. O outro estudo Nacional dedicado a avaliar técnicas para aprimorar o diagnóstico microbiológico das IAIO tinha como medida experimental a sonicação, e como população de estudo pacientes com IAIO pós osteossíntese de fraturas (YANO et al., 2014).

Similarmente, esse é o primeiro estudo Nacional dedicado a estimar a prevalência de anaeróbios na população de pacientes com IAIO. É também o primeiro estudo na literatura mundial a avaliar a contribuição do vortex dos implantes explantados no diagnóstico das IAIO, medida que apesar de já ter sido citada como uma recomendação em serviços que não dispunham de sonicação, não havia sido ainda formalmente avaliada (PORTILLO et al., 2013c).

7. CONCLUSÃO

A estimativa pontual da prevalência dos microrganismos anaeróbios na etiologia das infecções associadas aos implantes ortopédicos variou de 29,3% a 31,4%.

Comparados aos pacientes com infecção por microrganismos facultativos e com os pacientes com falha asséptica, os pacientes com infecção associada aos implantes ortopédicos causada por anaeróbios estritos são mais frequentemente encontrados no sexo feminino. Além disso, apresentam VHS e contagem de leucócitos no sangue mais elevados do que os pacientes com falha asséptica, o que pode servir como pista para o diagnóstico, já que não houve diferença quanto à presença de sinais e sintomas inflamatórios no sítio da infecção.

A sensibilidade do protocolo otimizado de cultura do espécime clínico foi superior aos procedimentos implementados na rotina do laboratório de microbiologia do INTO para o diagnóstico de IAIO, sem prejuízo significativo da especificidade.

Não houve diferença estatística significativa no desempenho da cultura do fluido obtido pela técnica de vortex do implante explantado no diagnóstico de IAIO em relação ao protocolo otimizado de cultura de líquido articular e tecido periprotético.

8. RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados do presente estudo, recomenda-se a adoção do protocolo otimizado para o diagnóstico microbiológico das IAIO.

Estudos para avaliação do impacto clínico do protocolo, de custo efetividade e com maior número de pacientes são recomendados, com objetivo de aprimorar o protocolo de cultivo microbiológico otimizado para diagnóstico das IAIO aqui descrito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHERMANN, Y.; GOLDSTEIN, E. J. C.; COENYE, T.; SHIRTLIFFA, M. E. Propionibacterium acnes: From Commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 419–440, 2014.
- ACHERMANN, Y.; VOGT, M.; SPORMANN, C.; et al. Characteristics and outcome of 27 elbow periprosthetic joint infections: results from a 14-year cohort study of 358 elbow prostheses. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 3, p. 432–438, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14638805>>. .
- AGGARWAL, V. K.; BAKHSHI, H.; ECKER, N. U. NTER; et al. Organism profile in periprosthetic joint infection: pathogens differ at two arthroplasty infection referral centers in Europe and in the United States. **The journal of knee surgery**, v. 27, n. 5, p. 399–406, 2014.
- AGGARWAL, V. K.; TISCHLER, E.; GHANEM, E.; PARVIZI, J. Leukocyte Esterase From Synovial Fluid Aspirate: A Technical Note. **Journal of Arthroplasty**, v. 28, n. 1, p. 193–195, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arth.2012.06.023>>. .
- ALI, F.; WILKINSON, J. M.; COOPER, J. R.; et al. Accuracy of Joint Aspiration for the Preoperative Diagnosis of Infection in Total Hip Arthroplasty. **The Journal of Arthroplasty**, v. 21, n. 2, p. 221–226, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0883540305004171>>. .
- ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; EHRLICH, G. D.; MONTANARO, L. Biofilm-based Healthcare-associated Infections. , v. 830, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-11038-7>>. .
- ARCIOLA, C. R.; MONTANARO, L.; COSTERTON, J. W. New trends in diagnosis and control strategies for implant infections. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 34, n. 9, p. 727–736, 2011. Disponível em: <<http://www.artificial-organs.com/Navigator.action?cmd=navigate&urlkey=Abstract&t=IJAO&UidArticle=BB21D39C-FC9C-4B8A-8772-EE361739A27C>>. .
- ASHER, M. A.; LAI, S. M.; BURTON, D. C. Analysis of instrumentation/fusion survivorship without reoperation after primary posterior multiple anchor instrumentation and arthrodesis for idiopathic scoliosis. **The Spine Journal**, v. 10, n. 1, p. 5–15, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1529943009008481>>. .
- ASLAM, S.; DAROUICHE, R. O. Prosthetic joint infections. **Current infectious disease reports**, v. 14, n. 5, p. 551–557, 2012. United States.
- ATKINS, B. L.; ATHANASOU, N.; DEEKS, J. J.; et al. Prospective Evaluation of Criteria for Microbiological Diagnosis of Prosthetic-Joint Infection at Revision Arthroplasty Prospective Evaluation of Criteria for Microbiological Diagnosis of Prosthetic-Joint Infection at Revision Arthroplasty. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2932–2939, 1998.
- BACHMEYER, C.; BLANCHARD, M.; ZELLER, V.; et al. Tibial chronic osteomyelitis due to Propionibacterium acnes in a patient with sickle cell anemia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. SUPPL. 3, p. 9712, 2010.

BARRACK, R. L.; JENNINGS, R. W.; WOLFE, M. W.; BERTOT, A. J. The Coventry Award. The value of preoperative aspiration before total knee revision. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 345, p. 8–16, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9418615>>. .

BARTZ, H.; NONNENMACHER, C.; BOLLMANN, C.; et al. Micromonas (Peptostreptococcus) micros: Unusual case of prosthetic joint infection associated with dental procedures. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, n. 7, p. 465–470, 2005.

BAYSTON, R.; NURADEEN, B.; ASHRAF, W.; FREEMAN, B. J. C. Antibiotics for the eradication of Propionibacterium acnes biofilms in surgical infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 1298–1301, 2007.

BERBARI, E. F.; MARCULESCU, C.; SIA, I.; et al. Culture-Negative Prosthetic Joint Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 9, p. 1113–1119, 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/522184>>. .

BERBARI, E.; MABRY, T.; TSARAS, G.; et al. Inflammatory Blood Laboratory Levels as Markers of Prosthetic Joint Infection. **The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume**, v. 92, n. 11, p. 2102–2109, 2010a. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00004623-201009010-00010>>. .

BJERKE-KROLL, B. T.; CHRIST, A. B.; MCLAWHORN, A. S.; et al. Periprosthetic Joint Infections Treated with Two-Stage Revision over 14Years: An Evolving Microbiology Profile. **The Journal of Arthroplasty**, v. 29, n. 5, p. 877–882, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0883540313007730>>. .

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. agr-Mediated Dispersal of Staphylococcus aureus Biofilms. (P. Cossart, Ed.) **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 4, p. e1000052, 2008. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000052>>. .

BONGARTZ, T.; HALLIGAN, C. S.; OSMON, D. R.; et al. Incidence and risk factors of prosthetic joint infection after total hip or knee replacement in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 59, n. 12, p. 1713–1720, 2008. United States.

BROWN, M. L.; DRINKWATER, C. J. Hematogenous Infection of Total Hip Arthroplasty With *Actinomyces* Following a Noninvasive Dental Procedure. **Orthopedics**, v. 35, n. 7, p. e1086–e1089, 2012. Disponível em: <<http://www.healio.com/doiresolver?doi=10.3928/01477447-20120621-27>>. .

BRÜGGEMANN, H. Insights in the pathogenic potential of Propionibacterium acnes from its complete genome. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 24, n. 2, p. 67–72, 2005.

BURNELL, C. D. C.; TURGEON, T. R.; HEDDEN, D. R.; BOHM, E. R. Paraneoplastic Clostridium septicum infection of a total knee arthroplasty. **The Journal of arthroplasty**, v. 26, n. 4, p. 666.e9-11, 2011. United States.

BUTLER-WU, S. M.; BURNS, E. M.; POTTINGER, P. S.; et al. Optimization of periprosthetic culture for diagnosis of Propionibacterium acnes prosthetic joint infection.

Journal of clinical microbiology, v. 49, n. 7, p. 2490–2495, 2011. United States.

CAPOOR, M. N.; RUZICKA, F.; MACHACKOVA, T.; et al. Prevalence of propionibacterium acnes in intervertebral discs of patients undergoing lumbar microdiscectomy: A prospective cross-sectional study. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–12, 2016.

CHAHOU, J.; KANAFANI, Z.; KANJ, S. S. Surgical Site Infections Following Spine Surgery: Eliminating the Controversies in the Diagnosis. **Frontiers in Medicine**, v. 1, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2014.00007/abstract>>. .

CORVEC, S.; LUCHETTA, J.; AUBIN, G. Is Hemolysis a Clinical Marker of Propionobacterium acnes Orthopedic Infection or a Phylogenetic Marker? **The American Journal of Orthopedics**, , n. March, p. E61–E62, 2015. Disponível em: <http://www.amjorthopedics.com/fileadmin/qhi_archive/ArticlePDF/AJO/04109E128.pdf>. .

CORVEC, S.; PORTILLO, M. E.; PASTICCI, B. M.; BORENS, O.; TRAMPUZ, A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. **The International journal of artificial organs**, v. 35, n. 10, p. 923–934, 2012. Italy.

CURTIS, L.; LIPP, M. J. Clostridium difficile infection of a prosthetic knee joint requiring amputation. **Surgical infections**, Feb. 2013. United States.

DEIRMENGIAN, C.; KARDOS, K.; KILMARTIN, P.; et al. The Alpha-defensin Test for Periprosthetic Joint Infection Responds to a Wide Spectrum of Organisms. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 473, n. 7, p. 2229–2235, 2015. United States.

DRAGO, L.; VECCHI, E. DE. Microbiological Diagnosis of Implant-Related Infections: Scientific Evidence and Cost/Benefit Analysis of Routine Antibiofilm Processing. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 971, p. 51–67, 2017. United States.

ENAYATOLLAHI, M. A.; PARVIZI, J. Diagnosis of infected total hip arthroplasty. **HIP International**, v. 25, n. 4, p. 294–300, 2015.

EVERTS, R. J.; CHAMBERS, S. T.; MURDOCH, D. R.; ROTHWELL, A. G.; MCKIE, J. Successful antimicrobial therapy and implant retention for streptococcal infection of prosthetic joints. **ANZ Journal of Surgery**, v. 74, n. 4, p. 210–214, 2004.

FEHLINGS, M. G.; TETREAULT, L.; NATER, A.; et al. The aging of the global population: The changing epidemiology of disease and spinal disorders. **Neurosurgery**, v. 77, n. 4, p. S1–S5, 2015.

FEHRING, K.; COHEN, B. A s p i r a t i o n a s a G u i d e t o S e p s i s i n R e v i s i o n T o t a l H i p A r t h r o p l a s t y . , v. 11, n. 5, 1996.

FERNANDES, A.; DIAS, M. The Microbiological Profiles of Infected Prosthetic Implants with an Emphasis on the Organisms which Form Biofilms. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, v. 7, n. 2, p. 219–223, 2013. India.

FIGA, R.; MUÑETON, D.; GÓMEZ, L.; MATAMALA, A.; LUNG, M.; CUCHI, E.; CORONA, PS. Periprosthetic joint infection by Propionibacterium acnes: Clinical differences between monomicrobial versus polymicrobial infection. **Anaerobe**, v. 44, p. 143–149, 2017.

FONT-VIZCARRA, L.; GARCIA, S.; MARTINEZ-PASTOR, J. C.; SIERRA, J. M.; SORIANO, A. Blood culture flasks for culturing synovial fluid in prosthetic joint infections. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 468, n. 8, p. 2238–2243, 2010. United States.

GALLO, J.; KOLAR, M.; NOVOTNY, R.; RIHAKOVA, P.; TICHA, V. Pathogenesis of prosthesis-related infection. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 147, n. 1, p. 27–35, 2003. Czech Republic.

GALLOWAY, W. R. J. D.; HODGKINSON, J. T.; BOWDEN, S.; WELCH, M.; SPRING, D. R. Applications of small molecule activators and inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 9, p. 449–458, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X12001138>>. .

GEIPEL, U. Pathogenic organisms in hip joint infections. **International journal of medical sciences**, v. 6, n. 5, p. 234–240, 2009. Australia.

GEROMETTA, A.; OLAVERRI, J. C. R.; BITAN, F. Infections in spinal instrumentation. **International Orthopaedics**, v. 36, n. 2, p. 457–464, 2012.

GOMEZ, M. M.; PARVIZI, J. Periprosthetic joint infection in total knee arthroplasty: Current concepts. **Current Orthopaedic Practice**, v. 26, n. 3, p. 247–251, 2015. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84957598073&partnerID=40&md5=f6d34cd34d890e290b489562e07409e8>>. .

HARTLEY, J. C.; HARRIS, K. A. Molecular techniques for diagnosing prosthetic joint infections. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69 Suppl 1, p. i21-4, 2014. England.

HEDKE, J.; SKRIPITZ, R.; ELLENRIEDER, M.; et al. Low-grade infection after a total knee arthroplasty caused by *Actinomyces naeslundii*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 1162–1164, 2012.

HENRY, B.; CORVEC, S.; CREMET, L.; et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus epidermidis* causing chronic relapsing prosthetic joint infections. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 44, n. 8, p. 610–614, 2012. England.

HICKEY, M. M.; DAVIES, U. M.; DAVE, J.; VOGLER, M.; WALL, R. A. Metronidazole resistant *Bacteroides fragilis* infection of a prosthetic hip joint. **The Journal of infection**, v. 20, n. 2, p. 129–133, 1990. England.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 322–332, 2010.

HØIBY, N.; CIOFU, O.; JOHANSEN, H. K.; et al. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 3, n. 2, p. 55–65, 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/ijos/journal/v3/n2/abs/ijos201110a.html>>. .

HOLMBERG, A.; LOOD, R.; MÖRGELIN, M.; et al. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 8, p. 787–795, 2009. European Society of Clinical Microbiology and

Infectious Diseases. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02747.x>>. .

HOURY, A.; BRIANDET, R.; AYMERLCH, S.; GOHAR, M. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. **Microbiology**, v. 156, n. 4, p. 1009–1018, 2010.

HOWLIN, R. P.; WINNARD, C.; ANGUS, E. M.; et al. Prevention of *Propionibacterium acnes* biofilm formation in prosthetic infections in vitro. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, v. 26, n. 4, p. 553–563, 2017. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jse.2016.09.042>>. .

HUDEK, R.; SOMMER, F.; KERWAT, M.; et al. *Propionibacterium acnes* in shoulder surgery: True infection, contamination, or commensal of the deep tissue? **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, v. 23, n. 12, p. 1763–1771, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jse.2014.05.024>>. .

HUGHES, H. C.; NEWNHAM, R.; ATHANASOU, N.; et al. Microbiological diagnosis of prosthetic joint infections: a prospective evaluation of four bacterial culture media in the routine laboratory. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1528–1530, 2011. England.

HUGHES, J. G.; VETTER, E. A.; PATEL, R.; et al. Culture with BACTEC Peds Plus / F Bottle Compared with Conventional Methods for Detection of Bacteria in Synovial Fluid. **Society**, v. 39, n. 12, p. 4468–4471, 2001.

JAMSEN, E.; VARONEN, M.; HUHTALA, H.; et al. Incidence of prosthetic joint infections after primary knee arthroplasty. **The Journal of arthroplasty**, v. 25, n. 1, p. 87–92, 2010. United States.

JIMÉNEZ-MEJÍAS, M. E.; COLMENERO, J. DE D.; SÁNCHEZ-LORA, F. J.; et al. Postoperative Spondylodiskitis: Etiology, Clinical Findings, Prognosis, and Comparison with Nonoperative Pyogenic Spondylodiskitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 2, p. 339–345, 1999. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/520212>>. .

JOHNSON, A. J.; ZYWIEL, M. G.; STROH, A.; MARKER, D. R.; MONT, M. A. Serological markers can lead to false negative diagnoses of periprosthetic infections following total knee arthroplasty. **International Orthopaedics**, v. 35, n. 11, p. 1621–1626, 2011.

KAMME, C.; LINDBERG, L. Aerobic and anaerobic bacteria in deep infections after total hip arthroplasty. Differential diagnosis between infectious and non-infectious loosening. **Clinical orthopaedics and related research**, v. No.154, n. 154, p. 201–7, 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7009009>>. .

KAUFMAN, M.; MEAIKE, J.; IZADDOOST, S. Orthopedic Prosthetic Infections: Diagnosis and Orthopedic Salvage. **Seminars in Plastic Surgery**, v. 30, n. 2, p. 066–072, 2016. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0036-1580730>>. .

KHAN, M.; OSMAN, K.; GREEN, G.; HADDAD, F. S. The epidemiology of failure in total knee arthroplasty: avoiding your next revision. **The Bone & Joint Journal**, v. 98–B, n. 1_Supple_A, p. 105–112, 2016. Disponível em:

<<http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/cgi/doi/10.1302/0301-620X.98B1.36293>>. .

KOBAYASHI, H.; OETHINGER, M.; TUOHY, M. J.; PROCOP, G. W.; BAUER, T. W. Improved detection of biofilm-formative bacteria by vortexing and sonication: A pilot study. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 467, n. 5, p. 1360–1364, 2009.

KURTZ, S. M.; ONG, K. L.; LAU, E.; et al. Prosthetic joint infection risk after TKA in the Medicare population. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 468, n. 1, p. 52–56, 2010. United States.

LANGE-ASSCHENFELDT, B.; MARENBACH, D.; LANG, C.; et al. Distribution of bacteria in the epidermal layers and hair follicles of the human skin. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, n. 6, p. 305–311, 2011.

LEGOUT, L.; SENNEVILLE, E. Periprosthetic joint infections: clinical and bench research. **TheScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 549091, 2013a. United States.

LEVY, P.; FENOLLAR, F.; STEIN, A.; BORRIONE, F.; RAOULT, D. *Finegoldia magna*: A Forgotten Pathogen in Prosthetic Joint Infection Rediscovered by Molecular Biology. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 8, p. 1244–1247, 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/605672>>. .

LIMA, A. L. L. M.; OLIVEIRA, P. R. D. DE. Atualização em infecções em próteses articulares. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 45, n. 6, p. 520–523, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-36162010000600002&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. .

LINA, G.; JARRAUD, S.; JI, G.; et al. Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the agr signal receptor in *Staphylococcus aureus*. **Molecular microbiology**, v. 28, n. 3, p. 655–62, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9632266>>. .

MALEKZADEH, D.; OSMON, D. R.; LAHR, B. D.; HANSEN, A. D.; BERBARI, E. F. Prior use of antimicrobial therapy is a risk factor for culture-negative prosthetic joint infection. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 468, n. 8, p. 2039–2045, 2010. United States.

MARCULESCU, C. E.; CANTEY, J. R. Polymicrobial prosthetic joint infections: risk factors and outcome. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 466, n. 6, p. 1397–1404, 2008. United States.

MARIN, M.; GARCIA-LECHUZ, J. M.; ALONSO, P.; et al. Role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 3, p. 583–589, 2012. United States.

MCCARTHY, J.; STINGEMORE, N. *Clostridium difficile* infection of a prosthetic joint presenting 12 months after antibiotic-associated diarrhoea. **The Journal of infection**, v. 39, n. 1, p. 94–96, 1999. England.

MCCONOUGHIEY, S. J.; HOWLIN, R.; GRANGER, J. F.; et al. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. **Future Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 987–1007, 2014. Disponível em:

<<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.14.64>>. .

MCDERMOTT, H.; BOLGER, C.; HUMPHREYS, H. Postprocedural discitis of the vertebral spine: challenges in diagnosis, treatment and prevention. **Journal of Hospital Infection**, v. 82, n. 3, p. 152–157, 2012. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670112002356>>. .

MEERMANS, G.; HADDAD, F. S. Is There a Role for Tissue Biopsy in the Diagnosis of Periprosthetic Infection? **Clinical Orthopaedics and Related Research®**, v. 468, n. 5, p. 1410–1417, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11999-010-1245-4>>. .

MINASSIAN, A. M.; NEWNHAM, R.; KALIMERIS, E.; et al. Use of an automated blood culture system (BD BACTEC) for diagnosis of prosthetic joint infections: easy and fast. **BMC infectious diseases**, v. 14, p. 233, 2014. England.

MOHAJER, M. AL; DAROUICHE, R. O. The expanding horizon of prosthetic joint infections. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2014. Disponível em: <<http://www.jab-fm.com/article/the-expanding-horizon-of-prosthetic-joint-infections>>. .

MOK, J. M.; CLOYD, J. M.; BRADFORD, D. S.; et al. Reoperation After Primary Fusion for Adult Spinal Deformity. **Spine**, v. 34, n. 8, p. 832–839, 2009. Disponível em:

<<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00007632-200904150-00016>>. .

MORAWIETZ, L.; TIDDENS, O.; MUELLER, M.; et al. Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening. **Histopathology**, v. 54, n. 7, p. 847–853, 2009.

MURDOCH, D. A. Gram-positive anaerobic cocci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 81–120, 1998.

MURDOCH, D. R.; ROBERTS, S. A.; FOWLER JR, V. G. J.; et al. Infection of orthopedic prostheses after Staphylococcus aureus bacteremia. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 32, n. 4, p. 647–649, 2001. United States.

OHLE, C. VON; GIESEKE, A.; NISTICO, L.; et al. Real-time microsensor measurement of local metabolic activities in ex vivo dental biofilms exposed to sucrose and treated with chlorhexidine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2326–2334, 2010.

ONG, K. L.; KURTZ, S. M.; LAU, E.; et al. Prosthetic joint infection risk after total hip arthroplasty in the Medicare population. **The Journal of arthroplasty**, v. 24, n. 6 Suppl, p. 105–109, 2009. United States.

OSMON, D. R.; BERBARI, E. F.; BERENDT, A. R.; et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: Clinical practice guidelines by the infectious diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 1, p. 1–25, 2013.

OUSSEDIK, S.; GOULD, K.; STOCKLEY, I.; HADDAD, F. S. Defining peri-prosthetic

infection: do we have a workable gold standard? **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 94, n. 11, p. 1455–1456, 2012. England.

PARVIZI, J.; ERKOCAK, O. F.; VALLE, C. J. DELLA. Culture-Negative Periprosthetic Joint Infection. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 96, n. 5, p. 430–436, 2014. Disponível em: <<http://jbjs.org/content/96/5/430.abstract>>. .

PARVIZI, J.; FASSIHI, S. C.; ENAYATOLLAHI, M. A. Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection Following Hip and Knee Arthroplasty. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 47, n. 3, p. 505–515, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ocl.2016.03.001>>. .

PARVIZI, J.; ZMISTOWSKI, B.; BERBARI, E. F.; et al. New definition for periprosthetic joint infection: From the workgroup of the musculoskeletal infection society. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 469, n. 11, p. 2992–2994, 2011.

PATTISON, R. M.; COOKE, R. P. D.; JAMES, S. E. Bacteroides fragilis infection of a knee prosthesis after haemorrhoidectomy. **The Lancet**, v. 346, n. 8982, p. 1097, 1995.

PEEL, T. N.; DYLLA, B. L.; HUGHES, J. G.; et al. Improved diagnosis of prosthetic joint infection by culturing periprosthetic tissue specimens in blood culture bottles. **mBio**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2016.

PEREIRA, L.; PIANO, A. DE; GOLMIA, R. P.; SCHEINBERG, M. Artroplastia total de quadril e joelho : aspectos clínicos na fase perioperatória. **Einstein**, v. 8, n. 11, p. 350–353, 2010.

PERSSON, E. Genital actinomycosis and Actinomyces israelii in the female genital tract. , v. 3, p. 115–123, 1987.

PETRINI, B.; WELIN-BERGER, T. Late infection with Actinomyces israelii after total hip replacement. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 10, n. 4, p. 313–4, 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/725541>>. .

PHILLIPS, J. E.; CRANE, T. P.; NOY, M.; ELLIOTT, T. S. J.; GRIMER, R. J. The incidence of deep prosthetic infections in a specialist orthopaedic hospital: a 15-year prospective survey. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 88, n. 7, p. 943–948, 2006. England.

PICHELMANN, M. A.; LENKE, L. G.; BRIDWELL, K. H.; et al. Revision Rates Following Primary Adult Spinal Deformity Surgery. **Spine**, v. 35, n. 2, p. 219–226, 2010. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00007632-201001150-00016>>. .

PORTILLO, M. E.; CORVEC, S.; BORENS, O.; TRAMPUZ, A. Propionibacterium acnes : An Underestimated Pathogen in Implant-Associated Infections. **BioMed Research International**, v. 2013a, p. 1–10, 2013a. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/804391/>>. .

PORTILLO, M. E.; SALVADÓ, M.; ALIER, A.; et al. Prosthesis failure within 2 years of

implantation is highly predictive of infection. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 471, n. 11, p. 3672–3678, 2013b.

PORTILLO, M. E.; SALVADO, M.; TRAMPUZ, A.; et al. Sonication versus vortexing of implants for diagnosis of prosthetic joint infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 2, p. 591–594, 2013c. United States.

POZO, J. L. DEL; PATEL, R. The Challenge of Treating Biofilm-associated Bacterial Infections. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 82, n. 2, p. 204–209, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1038/sj.clpt.6100247>>. .

POZO, J. L. DEL; PATEL, R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 8, p. 787–794, 2009. United States.

PRON, B.; MERCKX, J.; TOUZET, P.; et al. Chronic septic arthritis and osteomyelitis in a prosthetic knee joint due to *Clostridium difficile*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 599–601, 1995.

PULIDO, L.; GHANEM, E.; JOSHI, A.; PURTILL, J. J.; PARVIZI, J. Periprosthetic joint infection: The incidence, timing, and predisposing factors. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 466, n. 7, p. 1710–1715, 2008.

QUAN, H.; LI, B.; COURIS, C. M.; et al. Updating and Validating the Charlson Comorbidity Index and Score for Risk Adjustment in Hospital Discharge Abstracts Using Data From 6 Countries. **American Journal of Epidemiology**, v. 173, n. 6, p. 676–682, 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwq433>>. .

RIEBER, H.; SCHWARZ, R.; KRÄMER, O.; CORDIER, W.; FROMMELT, L. *Actinomyces neuii* subsp. *neuii* associated with periprosthetic infection in total hip arthroplasty as causative agent. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 4183–4184, 2009.

RUHE, J.; HOLDING, K.; MUSHATT, D. Infected total knee arthroplasty due to *Actinomyces naeslundii*. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 33, n. 3, p. 230–231, 2001.

SANDERS, K. L.; KAPLOWITZ, L. G. Late infection with *Bacteroides fragilis* in a prosthetic joint. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 12, n. 3, p. 235, 1980. England.

SCHÄFER, P.; FINK, B.; SANDOW, D.; et al. Prolonged Bacterial Culture to Identify Late Periprosthetic Joint Infection: A Promising Strategy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 11, p. 1403–1409, 2008. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/592973>>. .

SCHMALTZ, CAS.; MATOS, JA.; CARIJÓ, JH.; BERANGER, R.; TUYAMA, M.; COLETTI, C.; KALAB, L.; BARAUNA, IC.; MESQUITA, NM. Infecção Pós-Artroplastias Primárias de Quadril e Joelho: Descrição de Coorte Prospectiva e Análise de Fatores Associados a Desfecho Clínico Desfavorável. In: XII Congresso Brasileiro de Epidemiologia e Infecção Hospitalar, 2012, Santos. Journal of Infection Control, 2012. v. 1. p. 167-167.

SENDI, P.; BANDERET, F.; GRABER, P.; ZIMMERLI, W. Periprosthetic joint infection

following *Staphylococcus aureus* bacteremia. **The Journal of infection**, v. 63, n. 1, p. 17–22, 2011a. England.

SENDI, P.; BANDERET, F.; GRABER, P.; ZIMMERLI, W. Clinical comparison between exogenous and haematogenous periprosthetic joint infections caused by *Staphylococcus aureus*. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1098–1100, 2011b. England.

SHAH, N. B.; TANDE, A. J.; PATEL, R.; BERBARI, E. F. Anaerobic prosthetic joint infection. **Anaerobe**, v. 36, p. 1–8, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.08.003>>. .

SHANNON, S. K.; MANDREKAR, J.; GUSTAFSON, D. R.; et al. Anaerobic Thioglycolate Broth Culture for Recovery of *Propionibacterium acnes* from Shoulder Tissue and Fluid Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 731–732, 2013. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.02695-12>>. .

SIA, I. G.; BERBARI, E. F.; KARCHMER, A. W. Prosthetic joint infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 19, n. 4, p. 885–914, 2005.

SOUTHWOOD, R. T.; RICE, J. L.; MCDONALD, P. J.; HAKENDORF, P. H.; ROZENBILDS, M. A. Infection in experimental hip arthroplasties. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 67, n. 2, p. 229–231, 1985. England.

SQUIRE, M. W.; VALLE, C. J. DELLA; PARVIZI, J. Preoperative Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: Role of Aspiration. **American Journal of Roentgenology**, v. 196, n. 4, p. 875–879, 2011. Disponível em: <<http://www.ajronline.org/doi/10.2214/AJR.10.5160>>. .

STERN, S. H.; SCULCO, T. P. *Clostridium perfringens* infection in a total knee arthroplasty. A case report. **The Journal of arthroplasty**, v. 3 Suppl, p. S37-40, 1988. United States.

STOLL, T.; STUCKI, G.; BRÜHLMANN, P.; et al. Infection of a total knee joint prosthesis by *Peptostreptococcus micros* and *Propionibacterium acnes* in an elderly RA patient: Implant salvage with longterm antibiotics and needle aspiration/irrigation. **Clinical Rheumatology**, v. 15, n. 4, p. 399–402, 1996.

STOODLEY, P.; CONTI, S. F.; DEMEO, P. J.; et al. Characterization of a mixed MRSA/MRSE biofilm in an explanted total ankle arthroplasty. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 66–74, 2011.

STRAZZERI, J. C.; ANZEL, S. Infected total hip arthroplasty due to *Actinomyces israelii* after dental extraction. A case report. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, , n. 210, p. 128–131, 1986. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3757351>. .

TANDE, A. J.; PATEL, R. Prosthetic joint infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 302–345, 2014.

TRAMPUZ, A.; HANSSEN, A. D.; OSMON, D. R.; et al. Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. **American Journal of Medicine**, v. 117, n. 8, p. 556–562, 2004.

TRAMPUZ, A.; OSMON, D. R.; HANSSEN, A. D.; STECKELBERG, J. M.; PATEL, R. Molecular and Antibiofilm Approaches to Prosthetic Joint Infection. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 414, n. 414, p. 69–88, 2003. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003086-200309000-00012>>. .

TRAMPUZ, A.; PIPER, K. E.; HANSSEN, A. D.; et al. Sonication of Explanted Prosthetic Components in Bags for Diagnosis of Prosthetic Joint Infection Is Associated with Risk of Contamination Sonication of Explanted Prosthetic Components in Bags for Diagnosis of Prosthetic Joint Infection Is Associated with. **Society**, v. 44, n. 2, p. 628–631, 2006.

TRAMPUZ, A.; PIPER, K. E.; JACOBSON, M. J.; et al. Sonication of Removed Hip and Knee Prostheses for Diagnosis of Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 7, p. 654–663, 2007. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa061588>>. .

TUNNEY, M. M.; PATRICK, S.; CURRAN, M. D.; et al. Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3281–3290, 1999. United States.

TUNNEY, M. M.; PATRICK, S.; GORMAN, S. P.; et al. Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 80, n. 4, p. 568–72, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9699813>>. .

TYNER, H.; PATEL, R. Propionibacterium acnes biofilm - A sanctuary for Staphylococcus aureus? **Anaerobe**, v. 40, p. 63–67, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.05.014>>. .

UÇKAY, I.; LÜBBEKE, A.; EMONET, S.; et al. Low incidence of haematogenous seeding to total hip and knee prostheses in patients with remote infections. **Journal of Infection**, v. 59, n. 5, p. 337–345, 2009.

ULRICH, S. D.; SEYLER, T. M.; BENNETT, D.; et al. Total hip arthroplasties: What are the reasons for revision? **International Orthopaedics**, v. 32, n. 5, p. 597–604, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00264-007-0364-3>>. .

URIBE, J. S.; DEUKMEDJIAN, A. R. Visceral, vascular, and wound complications following over 13,000 lateral interbody fusions: a survey study and literature review. **European Spine Journal**, v. 24, n. S3, p. 386–396, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00586-015-3806-4>>. .

VECCHI, E. DE; BORTOLIN, M.; SIGNORI, V.; ROMAN??, C. L.; DRAGO, L. Treatment With Dithiothreitol Improves Bacterial Recovery From Tissue Samples in Osteoarticular and Joint Infections. **Journal of Arthroplasty**, v. 31, n. 12, p. 2867–2870, 2016.

VERGIDIS, P.; GREENWOOD-QUAINTANCE, K. E.; SANCHEZ-SOTELO, J.; et al.

Implant sonication for the diagnosis of prosthetic elbow infection. **Journal of shoulder and elbow surgery**, v. 20, n. 8, p. 1275–1281, 2011. United States.

WALDROP, R.; CHENG, J.; DEVIN, C.; et al. The burden of spinal disorders in the elderly. **Neurosurgery**, v. 77, n. 4, p. S46–S50, 2015.

WOOD, T. K.; KNABEL, S. J.; KWAN, B. W. Bacterial Persister Cell Formation and Dormancy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 23, p. 7116–7121, 2013. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02636-13>>. .

WÜST, J.; STEIGER, U.; VUONG, H.; ZBINDEN, R. Infection of a hip prosthesis by *Actinomyces naeslundii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 929–930, 2000.

YANO, M. H.; KLAUTAU, G. B.; SILVA, C. B. DA; et al. Improved Diagnosis of Infection Associated with Osteosynthesis by Use of Sonication of Fracture Fixation Implants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4176–4182, 2014. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.02140-14>>. .

YEE, D. K. H.; CHIU, K. Y.; YAN, C. H.; NG, F. Y. Review article: Joint aspiration for diagnosis of periprosthetic infection. **Journal of Orthopaedic Surgery**, v. 21, n. 2, p. 236–40, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24014792>>. .

ZAMAN, R.; ABBAS, M.; BURD, E. Late prosthetic hip joint infection with *Actinomyces israelii* in an intravenous drug user: case report and literature review. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4391–4392, 2002. United States.

ZAPPE, B.; GRAF, S.; OCHSNER, P. E.; ZIMMERLI, W.; SENDI, P. *Propionibacterium* spp. in prosthetic joint infections: A diagnostic challenge. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 128, n. 10, p. 1039–1046, 2008.

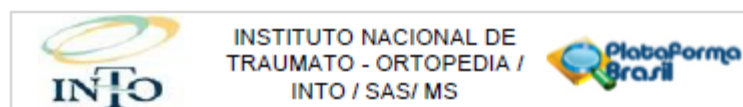
ZIMMERLI, W. Prosthetic-joint-associated infections. **Best Practice and Research: Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 6, p. 1045–1063, 2006a.

ZIMMERLI, W. Infection and musculoskeletal conditions: Prosthetic-joint-associated infections. **Best practice & research. Clinical rheumatology**, v. 20, n. 6, p. 1045–1063, 2006b. Netherlands.

ZIMMERLI, W.; SENDI, P. Pathogenesis of implant-associated infection: The role of the host. **Seminars in Immunopathology**, v. 33, n. 3, p. 295–306, 2011.

ZIMMERLI, W.; TRAMPUZ, A.; OCHSNER, P. E. Prosthetic-Joint Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 16, p. 1645–1654, 2004. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra040181>>. .

ANEXO 1: Comprovante de aprovação do projeto pelo CEP do INTO e número de registro



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Otimização do método de detecção de microorganismos anaeróbios no diagnóstico microbiológico de infecções associadas aos implantes ortopédicos no INTO

Pesquisador: Carla Ormundo Gonçalves Ximenes Lima

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 01825512.9.0000.5273

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Traumatismo - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.098.084

Data da Relatoria: 27/05/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto encontra-se bem delimitado dentro dos princípios éticos.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo foi parcialmente alterado, incluindo a análise de possíveis infecções em outras articulações tratadas no INTO.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos ao paciente que possam interferir no andamento do projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

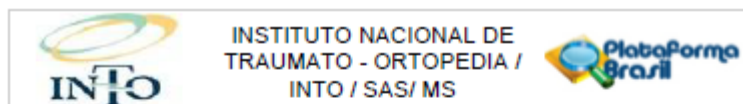
Sem considerações.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

O projeto é extremamente relevante para o INTO e o SUS, sendo pioneiro no aprofundamento do



Continuação do Parecer: 1.098.084

conhecimento em microbiologia e infectologia associadas às próteses ortopédicas.

Adendo aprovado sem restrições.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 09 de Junho de 2015

Assinado por:
Marisa Peter Silva
(Coordenador)

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

.....(De acordo com as normas da Resolução n°196, do Conselho Nacional de Saúde de 10/10/96)

→ Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa. Otimização do método de detecção de **microorganismos** anaeróbios no diagnóstico microbiológico de infecções associadas aos implantes ortopédicos no INTO. Você foi selecionado por apresentar características clínicas e laboratoriais de provável infecção e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a Instituição.

→ Os objetivos deste estudo são: identificar o (os) microrganismo (os) que causam infecção na prótese ortopédica e, com isso, contribuir para o tratamento correto da infecção relacionada a esta prótese. Sua participação nesta pesquisa consistirá em permitir a utilização dos espécimes clínicos coletados durante o ato cirúrgico para diagnosticar as infecções.

→ Não há riscos relacionados com sua participação nesta pesquisa.

→ Os benefícios relacionados com sua participação são: aumentar a possibilidade de detecção de microrganismos e melhorar o tratamento de infecções associadas aos implantes ortopédicos.

→ As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação, pois no estudo, apenas as iniciais do seu nome e o número do seu prontuário serão utilizados.

→ Você receberá uma cópia deste Termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de ____.

Assinatura do voluntário

Pesquisador responsável

ANEXO 3 – Ficha de coleta dos dados clínicos

FICHA DE COLETA DE DADOS CLINICOS – PROJETO ANAEROBIOS

0) Número no estudo: _____

1) Nome: _____

2) Prontuário: _____ 3) Data de Nasc.: ____/____/____

4) Sexo: () 0.fem. 1.masc.

5) Peso: _____ kg 6) Altura: _____ cm

7) Escore de morbidade de Charlson no momento da admissão: _____ (soma dos totais das colunas).

Escore 1		Escore 2		Escore 3		Escore 6	
Infarto do Miocárdio	()	Hemiplegia	()	Dç Hepática Moderada ou Grave	()	Tumor Sólido Metastático	()
Insuf. Cardíaca Congestiva	()	Dç Renal Severa ou Moderada	()			AIDS	()
Dç Vascular Periférica	()	Diabetes com Dano de Órgãos	()				
DçCérebro-Vascular	()	Qualquer Tumor	()				
Demencia	()	Leucemia	()				
DPOC	()	Linfoma	()				
Dç do Tecido Conectivo	()						
Úlcera	()						
Dça Hepática Leve	()						
Diabetes	()						
Total	()	Total	()	Total	()	Total	()

8) Tabagismo () 1. não () 0. sim () 99. não registrado

9) Etilismo () 1. não () 0. sim () 99. não registrado

10) Doença osteoarticular de base:

() 0. artrite reumatóide () 1. Osteoartrite (OA) idiopática

() 2. OA pós-artrite séptica () 3. OA pós-traumatismo () 4. Osteonecrose

() 5. Trauma agudo () 6. Sequelas de trauma

() 7. outros _____

() 99. não registrado

11) Data da cirurgia que originou a infecção: ____/____/____

12) Data de início dos sintomas do processo infeccioso: ____/____/____

13) Classificação quanto ao tempo entre a data da cirurgia e o início dos sintomas:

() 0. infecção precoce (< 3 meses) () 1. intermediária (3 meses a 2 anos) () 2. tardia (>2 anos)

14) Localização: () 0. infecção superficial (extra capsular) () 1. infecção profunda

Sinais e sintomas

15) Calor: () 0. sim () 1. não () 99. não registrado

16) Dor: () 0. sim () 1. não () 99. não registrado

17) Edema: () 0. sim () 1. não () 99. não registrado

18) Rubor: () 0. sim () 1. não () 99. não registrado

19) Presença de secreção na ferida operatória? () 0. sim () 1. não () 99. não registrado

20) Aspecto da secreção: () 0. purulenta () 1. não purulenta () 99. não registrado

21) Presença de fistula: () 0. sim () 1. não () 99. não registrado

22) Há sinais de afrouxamento da prótese: () 0. sim () 1. não () 99. não registrado

Sinais sistêmicos de infecção

23) Febre (Tax>38°C): () 0. sim () 1. não () 99. não registrado

24) Hipotermia (Tax<36°C): () 0. sim () 1. não () 99. não registrado

25) Leucocitose (>12.000 leucócitos/mm³): () 0. sim () 1. não () 99. não registrado

26) Leucopenia (<4.000 leucócitos/mm³): () 0. sim () 1. não () 99. não registrado

27) Taquicardia (FC>90bpm): () 0. sim () 1. não () 99. não registrado

28) Taquipnéia (>24 irpm): () 0. sim () 1. não () 99. não registrado

29) Hipotensão (PAS<90mmHg e/ou PAD<60mmHg): () 0. sim () 1. não () 99. Não registrado

Exames para avaliação de resposta inflamatória

30) VHS: valor inicial _____ (data: ____/____/____)

31) PCR-T: valor inicial _____ (data: ____/____/____)

32) Uso de antibiótico oral ou venoso nos últimos 14 dias antes da coleta de material para cultura ou da abordagem cirúrgica da infecção: () 0. sim () 1. não () 99. não registrado

33) Se usou, qual antibiótico? _____

Articulação: Ombro ()

Joelho ()

Quadril ()

Coluna ()

34) Bactéria(s) isolada(s) no laboratório de microbiologia do INTO:

a. _____

b. _____

c. _____

(perfil de sensibilidade em anexo)

35) Bactéria(s) isolada(s) no laboratório de microbiologia da UFRJ:

a. _____

b. _____

c. _____

(perfil de sensibilidade em anexo).

36) Qual o esquema antimicrobiano foi orientado pela equipe da AINFH apos o resultado da cultura liberado pelo laboratório de microbiologia da UFRJ?

ANEXO 4 - Modelos de resultados

 **MINISTÉRIO DA SAÚDE**
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE – SAS
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

PROJETO ANAERÓBIOS (N° CAAE: 01825512900005273)
LAUDO DE PESQUISA

Participante: J.L.C. Nº DO ESTUDO: 21
Prontuário: 137585 Data: 13/08/2015

PRÓTESE
FRAGMENTO DE MEMBRANA PERIPROTÉTICA DO ACETÁBULO
FRAGMENTO DE MEMBRANA PERIPROTÉTICA DO FÊMUR
FRAGMENTO ÓSSEO DO FÊMUR
FRAGMENTO ÓSSEO DO ACETÁBULO

EM TODAS AS AMOSTRAS: *CULTURA NEGATIVA*

CARLA ORMUNDO GONÇALVES XIMENES LIMA
(PESQUISADORA RESPONSÁVEL)

 **MINISTÉRIO DA SAÚDE**
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE – SAS
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

PROJETO ANAERÓBIOS (N° CAAE: 01825512900005273)
LAUDO DE PESQUISA

Participante: L.M.G. Nº DO ESTUDO: 10
Prontuário: 138193 Data: 17/06/2015

05 FRAGMENTOS PARTES MOLES DO QUADRIL (02 AMOSTRAS POSITIVAS)

MICROORGANISMO ISOLADO: 1 Staphylococcus epidermidis
2 Staphylococcus epidermidis

IDENTIFICAÇÃO E TESTE DE SENSIBILIDADE - EQUIPAMENTO VITEK 02

	1		2	
	MIC	CAT.	MIC	CAT.
Benzilpenicilina	>=0,5	R	>=0,5	R
Ciprofloxacina	>=8	R	>=8	R
Clindamicina	<=0,25	S	<=0,25	S
Eritromicina	<=0,25	S	<=0,25	S
Gentamicina	>=0,5	S	>=0,5	S
Linezolid	2	S	2	S
Moxifloxacina	2	R	R	R
Norfloxacina				
Oxacilina	>=4	R	>=4	R
Resist. Induzida a clindamicina	Neg	-	Neg	-
Rifampicina	>=32	R	>=32	R
Teicoplanina	4	S	4	S
Teste de Screening de cefoxitina	Pos	+	Pos	+
Tigeciclina	0,25	S	0,25	S
Trimetoprim/Sulfametoxazol	>320	R	>320	R
Vancomicina	2	S	2	S
Acido Fusídico	<=0,5	S	<=0,5	S

Legenda: S (sensível) / R (resistente) / I (intermediário) / N (não testado)

CARLA ORMUNDO GONÇALVES XIMENES LIMA
(PESQUISADORA RESPONSÁVEL)

ANEXO 5 – Modelo de requisição para identificação dos microrganismos

INFO

REQUISIÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO E TESTE DE SENSIBILIDADE BACTERIANA
PROJETO DE PESQUISA Nº _____

INICIAIS: _____ PRONTUÁRIO: _____

DATA: ____/____/____

TIPO DE EXAME: CULTURA E TESTE DE SENSIBILIDADE AUTOMATIZADOS

TIPO DE AMOSTRA: COLÔNIA BACTERIANA


Juliana Arruda de Moraes
Médica Infectologista
CRM 62.67903-1

MÉDICO SOLICITANTE
ASSINATURA E CARIMBO