



Detecção de microrganismos em dispositivos ortopédicos sonicados clínicos usando cultura convencional e qPCR

Detection of Microorganisms in Clinical Sonicated Orthopedic Devices Using Conventional Culture and qPCR

Victoria Stadler Tasca Ribeiro¹ Juliette Cieslinski¹ Julia Bertol² Ana Laura Schumacher²
João Paulo Telles² Felipe Francisco Tuon¹

¹ Laboratório de Doenças Infecciosas Emergentes (LEID), Escola de Medicina, Departamento de Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, PR, Brasil

² School of Medicine, Department of Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, PR, Brasil

Endereço para correspondência Felipe Francisco Tuon, PhD, Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, Paraná, Brazil, ZIP Code 80215-901 (e-mail: felipe.tuon@pucpr.br).

Rev Bras Ortop 2022;57(4):689–696.

Resumo

Objetivo Avaliar a sensibilidade e a especificidade da reação em cadeia de polimerase em tempo real quantitativa (*quantitative real-time polymerase chain reaction*, qPCR, em inglês) para a triagem do gene *rDNA 16S*, com a utilização do fluido sonicado de implantes ortopédicos.

Métodos Um estudo retrospectivo foi realizado em 73 fluidos sonicados obtidos de pacientes com infecção associada aos implantes ortopédicos. As amostras foram submetidas a cultura convencional e a teste molecular utilizando ionização e dessorção a laser assistida por matriz com espectrometria de massa por tempo de voo (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS, em inglês) e qPCR para o gene *rDNA 16S*. Os valores limiares do ciclo foram usados para definir um ponto de corte para a qPCR do gene *rDNA 16S* para culturas negativas e positivas.

Resultados Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos de cultura positiva e negativa com base no tempo desde a primeira cirurgia até a infecção ($p = 0,958$), na idade ($p = 0,269$), ou nas comorbidades em geral. No entanto, uma diferença estatística foi encontrada entre a duração média do uso de antibióticos antes da remoção do dispositivo (3,41 *versus* 0,94; $p = 0,016$). O DNA bacteriano foi identificado em todas as amostras dos fluidos sonicados. Os limiares do ciclo médio de culturas positivas e negativas foram de 25,6 e 27,3, respectivamente ($p < 0,001$).

Palavras-chave

- ▶ sonicação
- ▶ infecções
- ▶ qPCR
- ▶ espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz
- ▶ próteses e implantes

recebido

11 de Setembro de 2020

aceito

19 de Fevereiro de 2021

Publicado on-line

Outubro 1, 2021

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0041-1732386>

10.1055/s-0041-1732386.

ISSN 0102-3616.

© 2021. Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. All rights reserved.

This is an open access article published by Thieme under the terms of the Creative Commons Attribution-NonDerivative-NonCommercial-License, permitting copying and reproduction so long as the original work is given appropriate credit. Contents may not be used for commercial purposes, or adapted, remixed, transformed or built upon. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Thieme Revinter Publicações Ltda., Rua do Matoso 170, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20270-135, Brazil

Como uma ferramenta de diagnóstico, um corte do limite do ciclo de 26,89 demonstrou uma área sob a curva da característica de operação do receptor de 0,877 ($p \leq 0,001$).

Conclusão A presença de agentes antimicrobianos por mais de 72 horas diminuiu a positividade da cultura, mas não influenciou os resultados da qPCR. Apesar disso, a amplificação do *rDNA 16S* pode sobrestimar o diagnóstico de infecção.

Abstract

Objective To evaluate the sensitivity and specificity of the quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) for *16S rDNA* gene screening using sonicated fluid from orthopedic implants.

Methods A retrospective study was conducted on 73 sonicated fluids obtained from patients with infection associated with orthopedic implants. The samples were subjected to conventional culture and molecular testing using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and qPCR for *16S rDNA*. The cycle threshold values were used to define a cut-off of the qPCR of the *16S rDNA* for negative and positive cultures.

Results No statistical differences were observed between the positive and negative culture groups based on the time from the first surgery to infection ($p = 0.958$), age ($p = 0.269$), or general comorbidities. Nevertheless, a statistical difference was found between the mean duration of antibiotic use before device removal (3.41 versus 0.94; $p = 0.016$). Bacterial DNA was identified in every sample from the sonicated fluids. The median cycle thresholds of the positive and negative cultures were of 25.6 and 27.3 respectively ($p < 0.001$). As a diagnostic tool, a cycle threshold cut-off of 26.89 demonstrated an area under the curve of the receiver operating characteristic of 0.877 ($p \leq 0.001$).

Conclusion The presence of antimicrobial agents for more than 72 hours decreased culture positivity, but did not influence the qPCR results. Despite this, amplification of the *16S rDNA* may overestimate infection diagnosis.

Keywords

- ▶ sonication
- ▶ infections
- ▶ qPCR
- ▶ spectrometry, mass, matrix-assisted laser desorption-ionization
- ▶ prostheses and implants

Introdução

As infecções associadas aos implantes ortopédicos (IAIOs) e as infecções articulares periprotéticas (IAPs) estão relacionadas a morbidade e mortalidade altas, e a custos altos.¹ Os microrganismos associados aos biofilmes são os principais agentes etiológicos das IAIOs e das IAPs, incluindo os microrganismos *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e algumas espécies de *Enterobacteriales*.^{2,3} A estrutura dos biofilmes se desenvolve após uma fixação inicial de microrganismos a um substrato, em que os microrganismos aderem irreversivelmente à superfície e passam a produzir polímeros extracelulares, formando uma matriz estrutural que desempenha um papel essencial na patogênese das IAIOs e IAPs.⁴ A formação do biofilme não é apenas prevalente em dispositivos protéticos, como também ocorre nos ossos e/ou no cimento ósseo, no líquido sinovial, e no tecido fibroso.⁵

O diagnóstico preciso e a identificação precoce do agente infeccioso são vitais para o sucesso do tratamento. Múltiplas culturas de tecido peri-implantar são o padrão-ouro para a detecção microbiana das IAIOs e IAPs.^{6,7} No entanto, esse método apresenta baixa sensibilidade, com apenas 62% de

detecção de bactérias infecciosas,^{6,8} e são necessárias pelo menos 24 horas até que o crescimento microbiano possa ser avaliado.⁹ Além disso, a cultura convencional está associada a resultados falsos negativos em infecções de baixo grau ou em pacientes submetidos a tratamento antimicrobiano.¹⁰ No entanto, a sonicação do implante, que desaloja o biofilme do dispositivo, aumenta a sensibilidade da cultura em comparação com a biópsia ou a cultura do tecido peri-implantar.¹

Técnicas modernas, como os testes moleculares, redefiniram os métodos de investigação microbiológica. Várias técnicas foram descritas para a realização do exame molecular de fluidos sonicados, com o objetivo de melhorar a sensibilidade diagnóstica ou a detecção de infecção periprotética.¹¹⁻¹⁵ A reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR, em inglês), a PCR de DNA ribossômico (*ribosomal DNA*, rDNA, em inglês) 16S de amplo alcance, ou a PCR multiplex, por exemplo, oferecem vantagens significativas de detecção de microrganismos ativos e não viáveis (até mesmo nos casos em que os antibióticos foram administrados antes da amostragem).¹⁶ No entanto, os resultados podem ser controversos, devido à contaminação do DNA (durante a detecção de infecções mistas) ao usar a PCR de

amplo alcance; porém, são menos controversos com a PCR multiplex.¹⁷ Além disso, a ionização e dessorção a laser assistida por matriz com espectrometria de massa por tempo de voo (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS, em inglês) tem sido usada em vários ambientes para a detecção direta de amostras biológicas; ela identifica precocemente e de forma confiável os microrganismos, e é uma alternativa à cultura.¹⁸⁻²⁰

O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade e a especificidade da reação em cadeia de polimerase em tempo real quantitativa (*quantitative real-time polymerase chain reaction*, qPCR, em inglês) em rastrear o gene *rDNA 16S*, em amostras de fluidos sonicados obtidas de implantes ortopédicos.

Métodos

Ambiente

Este foi um estudo retrospectivo de centro único acompanhado da implementação de um método de sonicação após cirurgia ortopédica. O estudo levou em consideração o período de dezembro de 2018 a dezembro de 2019, e foi realizado em um hospital universitário com assistência médica e cirúrgica de alta complexidade, com capacidade para 206 leitos. O hospital é referência para pacientes traumatizados, com aproximadamente 1.100 pacientes sob o regime de internação/mês, e atende cerca de 4.800 pacientes por mês.

Pacientes e Dispositivos

Foram obtidos diferentes tipos de dispositivos ortopédicos, mediante condições cirúrgicas, após prévia recomendação médica (suspeita de infecção). Os critérios de infecção atenderam às definições do Grupo de Consenso Internacional sobre Articulação Periprotética e da Reunião de Consenso Internacional sobre infecção musculoesquelética.^{21,22} Os pacientes com dispositivos de fixação externa foram excluídos do estudo. Os dados clínicos foram avaliados para se fazer a análise de grupo.

Sonicação de dispositivos ortopédicos

Todos os dispositivos explantados foram colocados em sacos para coleta de amostras, estéreis e sem nuclease, produzidos em polietileno, com selo removível e sistema de fechamento com fio (Labplas, Sainte-Julie, Quebec, Canadá), que foram imediatamente encaminhados para sonicação. A sonicação foi realizada em solução de NaCl 0,9%, em quantidade suficiente para cobrir o dispositivo; ela foi sonicada por 5 min em um banho ultrassônico, usando a lavadora ultrassônica Soniclean 15 (Sanders Medical, Santa Rita da Sapucaí, MG, Brasil) em uma frequência de aproximadamente 40 kHz e 35°C.¹ Uma alíquota foi usada para os testes microbiológicos, e alíquotas de 50 mL foram armazenadas a -20°C para a realização dos testes moleculares. Foram utilizadas 39 amostras com crescimento bacteriano (detectado por cultura convencional), e 34 amostras sem crescimento bacteriano.

Testes laboratoriais

Para a cultura convencional, 100 µL do fluido sonicado foram espalhados em uma placa de ágar tríptico de soja, suplementada com 5% de sangue de ovelha e o meio de cultura ágar MacConkey (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), e incubados durante 5 dias a 35°C. A cultura anaeróbia foi realizada por 14 dias em meio anaeróbio padrão (Bactec, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). O crescimento da colônia foi avaliado usando um protocolo de detecção direta com a tecnologia MALDI-TOF MS.

A detecção direta de microrganismos com o uso de MALDI-TOF MS foi realizada em equipamento Vitek MS (bioMérieux, Durham, NC, EUA). O processo de extração da amostra foi adaptado a partir de um protocolo previamente descrito.²³ Resumidamente, 4 mL do fluido de sonicação foram centrifugados a 367 × g por 5 minutos, e o sedimento obtido foi lavado com água desionizada. O sedimento foi ressuspenso em 50 µL de água desionizada, e a ressuspensão foi seguida do acréscimo de 900 µL de álcool absoluto. Após o vórtice, o tubo foi centrifugado a 18.000 × g por 2 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Um total de 50 µL de ácido fórmico (70% v/v) e 50 µL de acetonitrila foram adicionados ao sedimento. Após o vórtice, o tubo foi centrifugado a 18.000 × g por 2 minutos. Em seguida, 1 µL do sobrenadante foi aplicado diretamente sobre a placa-alvo. Após a secagem, cada inóculo foi coberto com 1 µL da solução da matriz de ácido alfa-4-ciano-hidroxicinâmico (bioMérieux). Após a secagem, as amostras foram analisadas no Sistema VITEK MS. O controle de qualidade foi realizado usando uma cepa de referência de *Escherichia coli* ATCC 8739. Todos os procedimentos foram realizados em duplicata.

O DNA genômico (*genomic DNA*, gDNA, em inglês) microbiano foi detectado realizando a qPCR para a triagem do gene *rDNA 16S* (qPCR de amplo alcance). O DNA microbiano foi extraído com o uso do PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, usando 1 mL do fluido de sonicação, sendo extraídos 50 µL de DNA. Para a detecção molecular do *rDNA 16S*, usou-se o TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EUA); a detecção foi adaptada de um protocolo descrito anteriormente,²⁴ com o uso de iniciadores direto e reverso e uma sonda com as seguintes sequências: 5'-TGGAGCATGTGGTTTAATTGCA-3', 5'-TGCGGGACTTAACCCAACA-3', e (CY5)-5'-CAGGAGCTGACGACARCCATGCA-3'-(BHQ2).²⁵ A reação foi realizada em triplicata para cada amostra, usando 12,5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix, 8,7 µL de água ultrapura, 0,6 µL de cada iniciador (direto e reverso; 20 mM), 0,6 µL de sonda (10 mM), e 2 µL de DNA, perfazendo um volume total de 25 µL por cavidade. Além disso, nenhum controle de modelo (NCM, usando água em vez de DNA) e controles positivos foram incluídos, e as reações foram executadas no instrumento de PCR em tempo real ABI-7500 Fast (Applied Biosystems, Inc.), usando as seguintes etapas: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, e de 60°C por 1 minuto.

Curvas padrão usando bactéria Gram-negativa, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Laborclin), e bactéria Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Laborclin) foram geradas

pelo *rDNA 16S* para determinar a eficiência e a sensibilidade analítica do ensaio. Resumidamente, o soro fisiológico foi inoculado com *S. aureus* e *P. aeruginosa* em diluições progressivas de 10⁸ a 10² UFC/mL (realizadas em triplicata) para determinar a curva padrão. Os valores do limiar do ciclo (*cycle threshold*, Ct, em inglês) foram usados para calcular o desempenho da qPCR do *rDNA 16S*. As três últimas concentrações detectadas na curva padrão (102 ± 1) foram amplificadas com 30 repetições para definir o limite de detecção (LDD), o qual deve amplificar 100% dos alvos moleculares, a fim de garantir uma detecção mínima com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). As diluições foram realizadas antes de cada experiência. A curva padrão foi traçada a partir do gráfico $Cq \times \log_{10}$ da concentração/reação do gene alvo com base na determinação do número de cópias do gene 16S nas cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Após a regressão linear dos pontos obtidos, R² e a equação para a reta ($y = mx + n$) foram determinados com o uso da seguinte equação:

$$Cq = \text{declive} \times \log(n) + \text{interceptação em } y,$$

em que: **Cq** = ciclo de quantificação;

declive = coeficiente angular da reta;

log (n) = logaritmo da base 10 das cópias do gene por reação; e

interceptação em y = coeficiente linear.

Análise Estatística

As variáveis contínuas foram expressas como médias com desvios padrão (DPs), e analisadas usando o teste *t* de Student. As variáveis categóricas foram expressas como frequências absolutas e proporções, e foram analisadas mediante o teste do Qui-quadrado ou de Fisher. A sensibilidade, especificidade e os valores preditivos positivos e negativos foram calculados usando a cultura como referência (infecção por cultura positiva *versus* infecção por cultura negativa). O Ct foi determinado para melhorar a precisão da PCR usando culturas como o padrão-ouro. A área sob a curva de característica de operação do receptor (COR) foi calculada para quantificar a capacidade discriminativa da qPCR. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$. Para a análise estatística, usou-se o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, IBM Corp., Armonk, NY, EUA).

Resultados

Características Gerais

Foram coletados 148 fluidos sonicados. As características clínicas estavam presentes em 132 amostras (52 culturas positivas; 80 culturas negativas). No entanto, 59 amostras armazenadas não puderam ser recuperadas para o qPCR. Portanto, somente 73 fluidos sonicados foram incluídos na análise final.

A mediana de idade foi de 54 anos (variação: 39 a 64 anos) e 68,4% dos pacientes ($n = 50$) eram do sexo masculino. O tempo médio entre o primeiro procedimento cirúrgico e a infecção foi de 220 dias (variação: 30,5 a 962 dias). Os implantes sonicados eram constituídos de partes das próteses (de quadril e joelho) e de dispositivos de fixação (parafusos, placas, fios e pinos). As principais comorbidades

foram hipertensão arterial (41%), trauma (36,9%), e diabetes mellitus (15%). Antes da coleta das amostras, 30 pacientes (41%) receberam terapia antimicrobiana. As principais características clínicas dos pacientes estão listadas na **Tabela 1**.

Culturas e Etiologias

Pelo método de cultura convencional, 39 amostras (53,5%) foram consideradas positivas. Infecções por *Staphylococcus* spp. foram encontrados em 64% ($n = 25$) das amostras. Destes, 68% ($n = 17$) foram devido a *S. aureus* sensível à meticilina (SASM) e 28% ($n = 7$) foram devido a *S. aureus* resistente à meticilina (SARM). Os bacilos Gram-negativos (BGNs) estavam presentes em 25,6% ($n = 10$) das amostras, principalmente BGNs não fermentadores, como *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* ($n = 4$). As infecções mistas (polimicrobianas) foram encontradas em 10% ($n = 4$) dos casos. As principais etiologias estão listadas na **Tabela 2**.

Não houve diferenças estatísticas entre os grupos positivo e negativo com base no tempo transcorrido entre a primeira cirurgia e a infecção ($p = 0,958$), na idade ($p = 0,269$), ou nas comorbidades gerais. No entanto, uma diferença estatística foi encontrada entre a duração média da ingestão dos antibióticos antes da remoção do dispositivo (3,41 *versus* 0,94; $p = 0,016$) (**Tabela 1**).

qPCR do *rDNA 16S*

O DNA bacteriano foi identificado em todas as amostras de fluidos sonicados, independentemente dos resultados da cultura. As medianas do Ct de culturas positivas e negativas foi de 25,6 e 27,3, respectivamente ($p < 0,001$), e as de *S. aureus* e BGNs foram $25,07 \pm 2,97$ e $23,53 \pm 3,31$, respectivamente ($p = 0,123$). Como uma ferramenta de diagnóstico, um corte de Ct de 26,89 demonstrou uma área sob a curva (ASC) da COR de 0,877 ($p \leq 0,001$) (**Fig. 1**). Os valores de corte de Ct estão listados na **Tabela 3**.

Em geral, observamos que as amostras de pacientes que receberam terapia antimicrobiana por mais de 3 dias antes do procedimento cirúrgico apresentaram maior probabilidade de resultar em culturas negativas ($p = 0,016$). No entanto, a qPCR do *rDNA 16S* foi positiva em todas as amostras, até mesmo nos pacientes com resultados de culturas negativas. Além disso, o uso do corte de Ct de 26,89 como uma ferramenta de diagnóstico demonstrou uma ASC de 0,877 ($p \leq 0,001$).

Discussão

Apesar dos avanços no diagnóstico das infecções associadas aos implantes ortopédicos, a cultura de tecidos continua sendo a ferramenta padrão-ouro. Portanto, os critérios padrão para o diagnóstico das IAPs estão intimamente relacionados ao tipo e ao número das amostras coletadas. Embora as culturas de pus possam apresentar maior sensibilidade do que as de outras amostras, nenhuma amostra de tecido é confiável para os critérios das IAPs.²⁶ Portanto, tradicionalmente, várias culturas são necessárias para atingir

Tabela 1 Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com infecção e cultura negativa ou positiva dos dispositivos ortopédicos sonicados

	Cultura negativa			Cultura positiva			Valor de p
	n = 34			n = 39			
	Média ou N	Desvio padrão ou %	Mediana	Média ou N	Desvio padrão ou %	Mediana	
Limiar do ciclo	27,22	0,89	27,35	24,51	3,14	25,64	< 0,001
Tempo da cirurgia até a infecção (dias)	1.649	7.355	126	2.715	9.158	240	0,958
Idade (anos)	55,82	18,58	57,50	51,12	17,37	48,00	0,269
Duração da antibioterapia antes da remoção do implante (dias)	3,41	5,96	1,00	0,94	1,65	1,00	0,016
Dispositivo sonicado							
<i>Prótese de quadril</i>	15	44%		9	23%		
<i>Prótese de joelho</i>	3	9%		5	13%		
<i>Prótese de ombro</i>	0	0%		1	3%		
<i>Placa e parafusos</i>	4	12%		9	23%		
<i>Somente parafusos</i>	8	24%		9	23%		
<i>Somente placa</i>	3	9%		6	15%		
<i>Fios</i>	1	3%		0	0%		
Sexo masculino	23	68%		27	69%		0,542
Trauma	13	38%		14	36%		0,514
Tabagismo	4	12%		6	15%		0,460
HIV	0	0%		0	0%		–
Diabetes mellitus	5	15%		6	15%		0,274
Insuficiência renal crônica	1	3%		0	0%		–
Insuficiência cardíaca	2	6%		0	0%		–
Doença vascular periférica	1	3%		3	8%		0,361
Acidente vascular cerebral prévio	2	6%		3	8%		0,566
Doença pulmonar crônica	1	3%		0	0%		–
Hipertensão arterial	15	44%		13	33%		0,241
Neoplasia	0	0%		1	3%		–
Doenças hepáticas	1	3%		0	0%		–
Antibioterapia sob amostra	16	47%		14	36%		0,233

maior sensibilidade. Além disso, a positividade da cultura é diretamente influenciada pelo meio de crescimento usado. As amostras inoculadas diretamente na hemocultura durante o procedimento cirúrgico deram resultados dentro de 48 a 72 horas, com sensibilidade comparável aos métodos convencionais.^{27,28} No entanto, mesmo com melhores coletas de amostras, de inoculação, e dos métodos de processa-

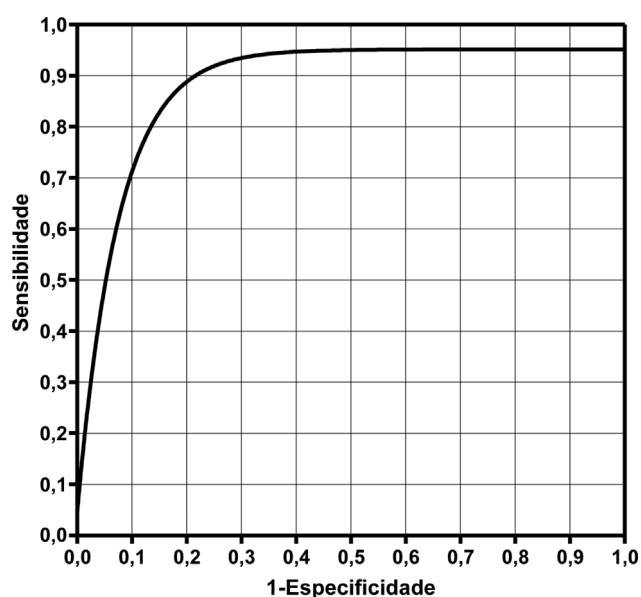
mento, como a sonicação, a presença de agentes antimicrobianos no sítio cirúrgico por mais de três dias antes do procedimento reduz a positividade da cultura.

Dadas as dificuldades associadas ao tratamento clínico das IAPs, as culturas nem sempre podem ser obtidas na ausência de antibióticos. Assim, ferramentas moleculares, como a PCR, podem ser vantajosas em relação às técnicas

Tabela 2 Etiologia da cultura positiva dos dispositivos ortopédicos sonicados de pacientes com infecção

Microrganismos	N
<i>Staphylococcus</i> spp.	25
<i>S. aureus</i> sensível à meticilina	17
<i>S. aureus</i> resistente à meticilina	7
<i>S. epidermidis</i>	1
Bacilos Gram-negativos	10
<i>Enterobacter</i> spp.	2
<i>Morganella morganii</i>	1
<i>Proteus</i> spp.	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2
Mistos	4
<i>Enterobacter</i> spp. + <i>S. aureus</i>	1
<i>Enterococcus</i> spp. + <i>S. aureus</i>	1
<i>Klebsiella</i> spp. + <i>S. pyogenes</i>	1
<i>Serratia</i> spp. + <i>P. aeruginosa</i>	1

tradicionais de cultura, uma vez que o DNA pode ser amplificado durante a fase inicial do tratamento clínico.¹⁶ No entanto, dependendo da técnica molecular, a especificidade pode diminuir devido à contaminação.¹⁷ Em nosso estudo, todas as amostras foram positivas para *rDNA 16S*. Uma vez que essa técnica amplifica qualquer gene bacteriano, é provável que apresente baixa especificidade quando indis-

**Fig. 1** Curva da característica de operação do receptor do limiar do ciclo de 26,9, para separar as culturas positivas e negativas a partir do fluido sonicado dos dispositivos ortopédicos.**Tabela 3** Valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), sensibilidade, especificidade, e precisão de diferentes valores do limiar do ciclo (Ct), considerando as infecções positivas para cultura versus as negativas

Valor Ct	26,25	26,89	27,17	27,45
Sensibilidade	62%	79%	90%	97%
Especificidade	94%	85%	68%	47%
VPP	92%	86%	76%	68%
VPN	68%	78%	85%	94%
Precisão	77%	82%	79%	74%

criminada e amplamente utilizada. No entanto, quando testes moleculares avançados, como o rRNA 16S ou o sequenciamento de última geração são usados, eles podem apresentar benefícios de acordo com critérios clínicos e laboratoriais.^{29,30} Curiosamente, em comparação com os métodos tradicionais, o rRNA 16S deixou de identificar a infecção polimicrobiana.³⁰ Portanto, em virtude das complexidades que surgem durante a avaliação das infecções ortopédicas (como infecções mal diagnosticadas e contaminações), uma combinação de técnicas é importante para chegar a um diagnóstico final.³¹

Tunney et al.¹¹ afirmaram que a incidência da infecção da prótese articular é muito subestimada pelos métodos atuais de detecção de cultura, e os testes moleculares devem ser incluídos na rotina. Apesar da recomendação, Ryu et al.¹⁵ confirmaram que a PCR apresenta baixa sensibilidade, mas alta especificidade. Assim, para o diagnóstico etiológico, podemos concluir que a PCR pode não ser o teste ideal; porém, um teste negativo exclui a presença de infecção. Em contraste, Gomez et al.¹³ relataram que a PCR é equivalente à cultura. Acreditamos que esses resultados inconsistentes podem estar associados ao método interno usado para a qPCR. Infelizmente, os métodos utilizados em cada estudo não podem ser comparados diretamente.

É necessário melhorar as ferramentas de diagnóstico para estabelecer o tratamento correto e diminuir a adversidade terapêutica. Uma vez que *S. aureus*, principalmente o SARM, foi associado a um prognóstico desfavorável na IAP.³² A escolha correta da terapia antimicrobiana (com propriedades antibiograma, por exemplo) pode ser considerada o alicerce do tratamento. Estudos futuros devem explorar a aplicabilidade das ferramentas moleculares em pacientes com maior risco de insucesso terapêutico (como aqueles com imunossupressão) com cultura negativa, apesar de os resultados clínicos e laboratoriais sugerirem a presença de uma infecção.

Este estudo tem algumas limitações. Em primeiro lugar, por conta do desenho retrospectivo, pode ter sido sobrestimada a “suspeita de infecção”. Em segundo lugar, após dois a três anos, os resultados clínicos não foram avaliados, a fim de estabelecer a significância da positividade do *rDNA 16S* em pacientes com cultura negativa. Ainda assim, nosso estudo destaca a importância da coleta adequada de amostras e o papel de técnicas laboratoriais

especializadas, realizadas por um especialista em doenças infecciosas. A qPCR do *rDNA 16S* não consegue identificar as espécies, e é usada apenas para identificar a presença ou ausência de DNA bacteriano. Esse teste deve ser complementado com o sequenciamento genético a fim de identificar as espécies.

Conclusão

Em conclusão, a presença de agentes antimicrobianos por mais de 72 horas diminuiu a positividade da cultura, sem influenciar os resultados da qPCR. Apesar disso, a amplificação do *rDNA 16S* pode sobrestimar o diagnóstico da infecção. Mais estudos são necessários para avaliar o papel da qPCR do *rDNA 16S* no diagnóstico das IAPs.

Suporte Financeiro

Este estudo foi apoiado por uma bolsa do MCTIC/CNPq, número 28/2018, nível B.

Conflito de interesses

Felipe Tuon é um investigador do CNPq.

Referências

- Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med* 2007; 357(07):654–663
- Zhao L, Ashraf MA. Influence of Silver-hydroxyapatite Nanocomposite Coating on Biofilm Formation of Joint Prosthesis and Its Mechanism. *West Indian Med J* 2015;64(05):506–513
- Boles BR, Horswill AR. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends Microbiol* 2011;19(09):449–455
- Marques SC, das Graças Oliveira Silva Rezende J, de Freitas Alves LA, et al. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz J Microbiol* 2007;38(03): 538–543
- Stoodley P, Conti SF, DeMeo PJ, et al. Characterization of a mixed MRSA/MRSE biofilm in an explanted total ankle arthroplasty. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011;62(01):66–74
- Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, et al; The OSIRIS Collaborative Study Group. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. *J Clin Microbiol* 1998;36(10):2932–2939
- Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, et al; Infectious Diseases Society of America. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2013;56(01): e1–e25
- Dudareva M, Barrett L, Figtree M, et al. Sonication versus Tissue Sampling for Diagnosis of Prosthetic Joint and Other Orthopedic Device-Related Infections. *J Clin Microbiol* 2018;56(12): e00688–e00718
- Moran E, Byren I, Atkins BL. The diagnosis and management of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother* 2010;65 (Suppl 3):iii45–iii54
- Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004;351(16):1645–1654
- Tunney MM, Patrick S, Curran MD, et al. Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 1999;37(10):3281–3290
- Achermann Y, Vogt M, Leunig M, Wüst J, Trampuz A. Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. *J Clin Microbiol* 2010;48 (04):1208–1214
- Gomez E, Cazanave C, Cunningham SA, et al. Prosthetic joint infection diagnosis using broad-range PCR of biofilms dislodged from knee and hip arthroplasty surfaces using sonication. *J Clin Microbiol* 2012;50(11):3501–3508
- Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, et al. Rapid molecular microbiologic diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol* 2013;51(07):2280–2287
- Ryu SY, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Mandrekar JN, Patel R. Low sensitivity of periprosthetic tissue PCR for prosthetic knee infection diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;79(04): 448–453
- Dora C, Altwegg M, Gerber C, Böttger EC, Zbinden R. Evaluation of conventional microbiological procedures and molecular genetic techniques for diagnosis of infections in patients with implanted orthopedic devices. *J Clin Microbiol* 2008;46(02): 824–825
- Onsea J, Depypere M, Govaert G, et al. Accuracy of Tissue and Sonication Fluid Sampling for the Diagnosis of Fracture-Related Infection: A Systematic Review and Critical Appraisal. *J Bone Jt Infect* 2018;3(04):173–181
- Chen JH, Ho PL, Kwan GS, et al. Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol* 2013;51(06):1733–1739
- Bazzi AM, Rabaan AA, El Edaily Z, John S, Fawarah MM, Al-Tawfiq JA. Comparison among four proposed direct blood culture microbial identification methods using MALDI-TOF MS. *J Infect Public Health* 2017;10(03):308–315
- Barberino MG, Silva MO, Arraes ACP, Correia LC, Mendes AV. Direct identification from positive blood broth culture by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Braz J Infect Dis* 2017;21(03): 339–342
- Parvizi J, Gehrke T. Proceedings of the Second International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection. Brooklandville, Maryland: Data Tracer Publishing Company; 2018
- Parvizi J, Gehrke T. International Consensus Group on Periprosthetic Joint Infection. Definition of periprosthetic joint infection. *J Arthroplasty* 2014;29(07):1331
- Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48(06):2110–2115
- Yang S, Lin S, Kelen GD, et al. Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens. *J Clin Microbiol* 2002;40(09): 3449–3454
- Tasca Ribeiro VS, Tuon FF, Kraft L, et al. Conventional culture method and qPCR using 16S rDNA for tissue bank: a comparison using a model of cardiac tissue contamination. *J Med Microbiol* 2018;67(11):1571–1575
- Walker LC, Clement ND, Wilson I, Hashmi M, Samuel J, Deehan DJ. The Importance Of Multi-site Intra-operative Tissue Sampling In The Diagnosis Of Hip And Knee Periprosthetic Joint Infection - Results From A Single Centre Study. *J Bone Jt Infect* 2020;5(03): 151–159
- Sanabria A, Røkeberg MEO, Johannessen M, Sollid JE, Simonsen GS, Hanssen AM. Culturing periprosthetic tissue in Bact/Alert® Virtuo blood culture system leads to improved and faster detection of prosthetic joint infections. *BMC Infect Dis* 2019;19(01): 607
- Duployez C, Wallet F, Migaud H, Senneville E, Loiez C. Culturing Periprosthetic Tissues in Bact/Alert® Virtuo Blood Culture

- Bottles for a Short Duration of Post-operative Empirical Antibiotic Therapy. *J Bone Jt Infect* 2020;5(03):145–150
- 29 Cai Y, Fang X, Chen Y, et al. Metagenomic next generation sequencing improves diagnosis of prosthetic joint infection by detecting the presence of bacteria in periprosthetic tissues. *Int J Infect Dis* 2020;96:573–578
- 30 Kuo FC, Lu YD, Wu CT, You HL, Lee GB, Lee MS. Comparison of molecular diagnosis with serum markers and synovial fluid analysis in patients with prosthetic joint infection. *Bone Joint J* 2018;100-B(10):1345–1351
- 31 Stylianakis A, Schinas G, Thomaidis PC, et al. Combination of conventional culture, vial culture, and broad-range PCR of sonication fluid for the diagnosis of prosthetic joint infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;92(01):13–18
- 32 Shohat N, Goswami K, Tan TL, et al. ESCMID Study Group of Implant Associated Infections (ESGIAI) and the Northern Infection Network of Joint Arthroplasty (NINJA) 2020 Frank Stinchfield Award: Identifying who will fail following irrigation and debridement for prosthetic joint infection. *Bone Joint J* 2020;102-B (7_Supple_B):11–19