associazione microbiologi clinici italiani

Ente del Terzo Settore

Rif.2023-14

PERCORSO DIAGNOSTICO

INFEZIONI DI PROTESI ARTICOLARI E MEZZI DI OSTEOSINTESI

Gruppo di Lavoro Organizzativo dei Percorsi Diagnostici (GLOPD)

Coordinatore: Cristina Giraldi
c.giraldi54@gmail.com
Proprietà intellettuale di AMCLI ETS.

Nel caso i contenuti siano utilizzati è necessario citare il Percorso Diagnostico nel seguente modo: AMCLI ETS. Percorso Diagnostico - Infezioni di protesi articolari e mezzi di osteosintesi Rif. 2023-14.

Associazione Microbiologi Clinici Italiani ETS (AMCLI ETS)
Via C. Farini 81 - 20159 Milano - T. 02 66801190 - segreteriaamcli@amcli.it N. 26168 iscrizione RUNTS - sez. "G - altri enti del Terzo Settore" - Iscrizione REA MI - 1969948 C.F. 06653690153 - P.I. 12404560158

REFERENTE ED ESTENSORE

Lorenzo Drago, Laboratorio di Microbiologia Clinica,
Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano

REVISORI INTERNI

Giancarlo Basaglia, Coordinatore gruppo di lavoro per le infezioni correlate all'assistenza e dei dispositivi impiantabili – (GLICADI) – AMCLI.

Giuseppe Sessa, Past-President Società Italiana di Ortopedia e Traumatologia (SIOT) e Past-Coordinatore Linea Guida SIOT sulla Diagnosi di infezione peri-protesica.

REVISORI ESTERNI

Francesca Greco, Microbiologia e virologia AO Cosenza

Saveria Dodaro, Microbiologia e virologia AO Cosenza

Cristina Giraldi, Coordinatore Gruppo di Lavoro Organizzativo dei Percorsi Diagnostici (GLOPD)

Sara Tedeschi, Malattie Infettive, IRCCS AOU-BO, Università di Bologna

Eleonora Zamparini, Malattie Infettive, IRCCS AOU-BO, Università di Bologna

Massimiliano De Paolis, Ortopedia e Traumatologia, IRCCS AOU-BO, Università di Bologna

Sommario

1. PREMESSA 5
2. INTRODUZIONE 6
3. DEFINIZIONE DI INFEZIONE DELLA PROTESI ARTICOLARE 8
4. CLASSIFICAZIONE DELLE INFEZIONI DI PROTESI ARTICOLARI 10
5. CLASSIFICAZIONE DELLE INFEZIONI DEI MEZZI DI OSTEOSINTESI 10
6. MICRORGANISMI ASSOCIATI A INFEZIONE DI PROTESI ARTICOLARI E MEZZI DI OSTEOSINTESI 12
7. CRITICITÀ NEL PROCESSO DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO 14
8. DIAGNOSI MICROBIOLOGICA 16
8.1 INDAGINI MICROBIOLOGICHE PRE-OPERATORIE 16
8.2 INDAGINI MICROBIOLOGICHE INTRA-OPERATORIE 16
8.3 INDAGINI MICROBIOLOGICHE POST- OPERATORIE 16
9. GESTIONE E TIMING DI PROFILASSI E TERAPIA ANTIBIOTICA 17
9.1 PROFILASSI PERIOPERATORIA 17
9.2 TERAPIA ANTIBIOTICA 17
10. FASE PRE-ANALITICA 18
10.1 MODALITÀ DI RACCOLTA DELL'ASPIRATO ARTICOLARE 18
10.2 MODALITÀ DI RACCOLTA DEI TESSUTI PERIMPLANTARI 18
10.3 MODALITÀ DI RACCOLTA DELLE COMPONENTI PROTESICHE/MEZZI DI OSTEOSINTESI 18
10.4 TRASPORTO E CONSERVAZIONE 19
10.5 MATERIALI NON IDONEI 19
Pus da fistola 19
Materiale perimplantare raccolto con tampone 19
Liquido di drenaggio 19
11. FASE ANALITICA 20
11.1 COLTURA DEL LIQUIDO ARTICOLARE 20
11.2 COLTURA DEI TESSUTI PERIMPLANTARI 21
11.3 COLTURA DELLE COMPONENTI PROTESICHE/MEZZI DI OSTEOSINTESI 21
11.4 TEMPI DI INCUBAZIONE 23
11.5 IDENTIFICAZIONE DEI MICRORGANISMI 23
11.6 COLTURE NEGATIVE IN CASI CON EVIDENZA CLINICA DI INFEZIONE 24
11.7 INFEZIONI CAUSATE DA MICROORGANISMI A BASSO GRADO DI PATOGENICITÀ 24

AMCLI Associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

11.8 MICRORGANISMI INUSUALI O FASTIDIOUS ASSOCIATI AD INFEZIONI PROTESICHE/MEZZI DI OSTEOSINTESI 25
11.9 PROVA DI SENSIBILITÀ AGLI ANTIMICROBICI 25
11.10 STUDI DI CONFRONTO TRA SONICAZIONE E DITIOTREITOLO (DTT) 25
11.11 BIOLOGIA MOLECOLARE E ALTRE TECNICHE DI RILEVAMENTO DIRETTO DEI MICRORGANISMI DAI CAMPIONI 26
12. FASE POST-ANALITICA 28
12.1 REFERTAZIONE 28
12.2 TESSUTI PERIMPLANTARI E/O LIQUIDO ARTICOLARE E/O COMPONENTI PROTESICHE E/O MEZZI DI OSTEOSINTESI 28
12.3 SONICATO DELLA PROTESI/MEZZI DI OSTEOSINTESI 28
12.4 ELUATO DELLA PROTESI/MEZZI DI OSTEOSINTESI 29
13. TEST DI LABORATORIO AGGIUNTIVI ALLE INDAGINI MICROBIOLOGICHE 30
13.1 ESTERASI LEUCOCITARIA 30
13.2 ALFA-DEFENSINA 30
13.3 PROTEINA C REATTIVA (PCR) 30
13.4 CONTA LEUCOCITARIA E DIFFERENZIALE NEL LIQUIDO SINOVIALE 31
13.5 D-DIMERO 31
14. BIBLIOGRAFIA 32

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

1. PREMESSA

Il presente documento aggiorna e sostituisce il Percorso diagnostico "INFEZIONI DELLE PROTESI ARTICOLARI E DEI MEZZI DI OSTEOSINTESI" del 3 maggio 2017, integrandolo con le recenti evidenze scientifiche pubblicate e le odierne evoluzioni in tema di tecniche di biologia molecolare.

Nello specifico, il documento propone i seguenti punti di integrazione e aggiornamento:

- criticità nel percorso diagnostico microbiologico;
- influenza di profilassi perioperatoria e terapia antibiotica nella diagnostica microbiologica dei casi di infezione protesica;
- metodiche di arricchimento per il liquido di sonicazione e l'eluito di ditiotreitolo dalla protesi al fine di aumentare la sensibilità colturale e ridurre i tempi di positivizzazione delle colture;
- metodiche per il trattamento dei campioni di tessuto periprotesico;
- affrontare il problema delle contaminazioni dei campioni biologici;
- descrivere gli studi a confronto tra l'uso della sonicazione e il ditiotreitolo;
- spettrometria di massa MALDI-TOF per l'identificazione dei microrganismi responsabili di infezioni delle protesi e dei mezzi di osteosintesi;
- procedure diagnostiche microbiologiche aggiuntive per campioni a coltura negativa in pazienti con diagnosi clinica di infezione protesica;
- ruolo della biologia molecolare nella diagnostica delle infezioni protesiche e le evoluzioni future della Next Generation Sequencing (NGS);
- test di laboratorio aggiuntivi a supporto della diagnostica microbiologica.

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

2. INTRODUZIONE

L'infezione di protesi articolare rappresenta una grave complicanza in chirurgia protesica ortopedica e richiede una accurata diagnosi microbiologica per assicurare la corretta gestione clinica dell'evento infettivo.

Il tasso di infezione per le protesi di ginocchio è dello 0.8-1.9%, mentre per le protesi totali d'anca è dello 0.3-1.7% *[Del Pozo 2009].* Va inoltre considerato che con l'invecchiamento della popolazione e il miglioramento delle procedure chirurgiche, il numero degli interventi di protesi articolare è destinato ad aumentare e con esso il numero di infezioni protesiche.

Diversa è l'incidenza delle infezioni associate ai dispositivi per osteosintesi (chiodi endomidollari, placche, viti, fili, perni di fissazione transcutanei) che varia da 1-2% per fratture chiuse a oltre il 30% per quelle esposte *[Del Pozo 2009].* Il percorso diagnostico per le infezioni delle protesi articolari e dei mezzi di osteosintesi presenta comunque metodiche comuni e criteri simili che permettono di armonizzare buona parte delle procedure di prelievo dei campioni e di coltura dei materiali.

Recentemente *[Wildelman, 2019]* è stato descritto che la mortalità a 10 anni per tutte le cause è più alta per i pazienti con infezioni protesiche (45%), rispetto ai pazienti senza infezioni (29%). Questo può essere dovuto alla naturale evoluzione degli impianti, ma anche alla difficoltà di gestire queste infezioni anche dal punto di vista microbiologico. La definizione di infezione protesica non ha ancora trovato un totale consenso, essendo tante quelle proposte e talvolta differenti l'una da dall'altra. Un ruolo fondamentale nella diagnosi è svolto dalle valutazioni di tipo clinico, nel setting pre- ed intraoperatorio. Le indagini di laboratorio concorrono all'identificazione dei casi infetti, permettendo l'isolamento e l'identificazione dei microrganismi responsabili di infezione e la definizione del pattern di sensibilità antibiotica.

Gli impianti e i mezzi di sintesi generalmente impiegati chirurgicamente possono agire come superfici abiotiche nel corpo umano, facilitando così la colonizzazione e l'insediamento di molte specie microbiche. I microbi vengono spesso eliminati dai meccanismi immunitari innati dell'ospite, ma a volte possono essere causa di infezioni gravi, anche potenzialmente letali, generalmente chiamate infezioni associate all'impianto (IAI). La ragione principale di queste infezioni è correlata al fatto che i batteri che aderiscono alle superfici dell'impianto sono meno suscettibili all'uccisione/eliminazione da parte del sistema immunitario *[Zimmerli 2011].* Inoltre, questi batteri possono sopravvivere sulle superfici implantari e sviluppare biofilm che riducono l'effetto degli agenti antimicrobici determinando una colonizzazione persistente che conferisce loro uno "status di inclusione nel biofilm", quindi difficile da rimuovere e identificare. Al fine di rilevare i veri agenti patogeni, la rottura e la demolizione dei biofilm dovrebbero infatti precedere i metodi microbiologici standard *[Drago 2017].*

Le cosiddette infezioni da "impianto correlate al biofilm" sono alla continua ricerca di linee guida definitive e di approcci diagnostici risolutivi, occorre quindi porre la massima attenzione nell'affrontare questi argomenti, sicuramente controversi e da migliorare ulteriormente. Questo percorso ha l'obiettivo di descrivere i principali strumenti microbiologici per migliorare la diagnosi ed evitare risultati inaffidabili.

Al fine di fornire un valido supporto al clinico ortopedico e all'infettivologo, il microbiologo deve disporre di campioni multipli da sottoporre ad indagine microbiologica, prelevati da zone definite e con tecniche idonee atte a prevenire la contaminazione crociata, nonché, quando possibile, in assenza di terapia antibiotica per un adeguato periodo di tempo. Le tecniche colturali devono prevedere trattamenti del campione e l'utilizzo di procedure e strumentazione adeguati in funzione della tipologia del materiale da esaminare. Le informazioni ottenute e i relativi referti vanno interpretati alla luce dei risultati delle indagini preoperatorie e intraoperatorie con criteri specifici al fine di poter ottimizzare la sensibilità e allo stesso tempo identificare eventuali microrganismi contaminanti.

L'incubazione delle colture, in atmosfera diversificata, dovrebbe essere protratta fino a 5-10 giorni per i terreni solidi e fino a 14 giorni per i terreni liquidi.

I microrganismi isolati vanno correttamente identificati per stabilirne la significatività come agenti eziologici di infezione e, di conseguenza, l'interpretazione delle colture e la refertazione da parte del microbiologo sono un momento critico e cruciale.

Il saggio di sensibilità agli antibiotici deve comprendere farmaci che permettano al clinico di impostare una terapia antibiotica ottimale che va protratta per tempi idonei e alle giuste concentrazioni.

Va sottolineato tuttavia che solo attraverso un approccio multidisciplinare (ortopedico, infettivologico e microbiologico) la probabilità di eradicazione dell'infezione aumenta significativamente.

AMCLI
associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

3. DEFINIZIONE DI INFEZIONE DELLA PROTESI ARTICOLARE

Sebbene ancora dibattuta *[Osmon 2013; Parvizi 2011; Corvec 2012b]*, quella più citata in letteratura è la definizione di infezione protesica secondo il "II International Consensus Meeting on Periprosthetic Joint Infection" *[Parvizi and Gherke 2018, Zmistowski 2014]* , che prevede il riscontro di **almeno uno dei seguenti criteri:**

a due colture da materiali periprotesici positive per microrganismi fenotipicamente identici;
b la presenza di un tragitto fistoloso in comunicazione con la protesi;
c riscontro di almeno tre dei seguenti cinque criteri minori:

- valori ematici elevati di VES e PCR *[Schinsky 2008; Parvizi 2006; Berbari 2010]*.
- elevato numero di leucociti nel liquido articolare *[Trampuz 2004; Parvizi 2011; Dinneen 2013]* o riscontro di un risultato "++" al test dell'esterasi leucocitaria su striscia reattiva effettuato su liquido articolare *[Parvizi 2011b; Aggarwal 2013b]*.
- elevata percentuale di neutrofili nel liquido articolare *[Trampuz 2004; Parvizi 2011; Dinneen 2013]*.
- infiammazione acuta dei tessuti periprotesici all'esame istologico *[Tsaras 2012]*.
- Isolamento di microrganismi dalla coltura di un singolo campione.

NOTA: La presenza di materiale purulento nello spazio periprotesico è stata spesso considerata patognomonica di infezione periprotesica. Tuttavia la purulenza è riscontrabile anche in casi di reazione avversa dei tessuti ai frammenti da usura o ai prodotti di corrosione degli impianti con accoppiamento metallo-metallo di protesi d'anca. Per tale motivo questo criterio è stato rimosso dall'elenco dei criteri minori *[Mikhael 2009]*.

NOTA: *[Parvizi and Gherke 2018]*

Infezioni acute:

- PCR > 100mg/L
- Conteggio leucociti totali nel liquido articolare >10000/µL e polimorfonucleati neutrofili >90%
- Infezioni croniche:
- VES > 30mm/h
- PCR > 10mg/L
- Conteggio leucociti totali nel liquido articolare >3000/µL e polimorfonucleati >80%.
- Va considerato che questi marker sono influenzati da sesso, età e comorbidità del paziente e possono rimanere elevati fino a 6 settimane dopo il più recente intervento chirurgico.

NOTA: Nell'analisi istologica dei tessuti periprotesici, un valore ≥ 5-10 polimorfonucleati neutrofili per 5 o più campi ad alto ingrandimento è criterio minore per la diagnosi di infezione periprotesica (esclusi i 3 mesi postoperatori e la presenza di patologie articolari infiammatorie) *[Tsaras 2012]*.

Nella tabella 1 vengono descritti i principali criteri diagnostici di infezione ortopedica ad oggi considerati dalle varie Società scientifiche.

Le tabelle 2 e 3 riportano invece i criteri secondo una recente classificazione che tiene conto dei diversi gradi (Low-, High-) di infezione e delle caratteristiche cliniche del paziente con infezione protesica. In particolare, la World Association Against Infection in Orthopaedics and Trauma (W.A.I.O.T.) *[Romanò 2019]* ha studiato una possibile soluzione alternativa, basata su tre parametri:

1. la capacità di ciascun test diagnostico o procedura di escludere e/o di includere una infezione;
2. le caratteristiche cliniche dell'infezione;
3. la distinzione tra reperti pre/intraoperatori e le eventuali conferme di quelli postoperatori.

Secondo tale definizione, a un test positivo (con una specificità > 90%) viene assegnato uno score +1, mentre a un test negativo (con una sensibilità > 90%) viene assegnato -1. Quando in un determinato paziente vengono eseguiti almeno due test, sulla base della somma (score finale) tra test positivi e/o negativi si possono identificare cinque diverse condizioni:

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

- assenza di infezione (punteggio < 0)
- contaminazione (punteggio < 0 con isolamento di un microorganismo contaminante)
- malfunzionamento dell'impianto correlato al Biofilm (punteggio < 0)
- infezione protesica di basso grado (punteggio ≥ 0)
- infezione protesica di alto grado (punteggio ≥ 1)

In particolare:con un punteggio < 0 (assenza di infezione o contaminazione) i sintomi possono essere correlati a usura, detriti, metallosi, lussazione ricorrente, o instabilità articolare, frattura, mal posizionamento, dolore neuropatico; con un punteggio < 0 oppure ≥ 0, uno o più sintomi "difficilmente spiegabili", ad esempio dolore, gonfiore, rigidità, possono essere correlati alla presenza di Biofilm che fa funzionare male l'impianto o ad una infezione di basso grado; con un punteggio ≥ 1 si hanno due o più dei seguenti sintomi, dolore, gonfiore, arrossamento, calore, *functio laesa.*

Tale classificazione è stata validata clinicamente e retrospettivamente *[Bozhkova 2020]* su un totale di 210 pazienti, sottoposti a chirurgia di revisione dell'anca (n = 86) o del ginocchio (n = 124) in sei centri ortopedici situati in Africa, Asia, Europa e Sud America, con un follow-up minimo di due anni dopo l'intervento chirurgico.

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

4. CLASSIFICAZIONE DELLE INFEZIONI DI PROTESI ARTICOLARI

Classicamente le infezioni protesiche possono essere suddivise in base al tempo di insorgenza dei sintomi dopo l'impianto in:

- **Infezioni precoci** (*early infections*) con tempo di insorgenza <4-6 settimane *[Zmistowsky 2014]* o, secondo alcuni autori, fino a 3 mesi dal posizionamento della protesi *[Corvec 2012b; Osmon 2013]*. Vengono normalmente acquisite durante l'intervento per shedding microbico sul campo operatorio. Più raramente possono essere espressione di diffusione ematogena da focolai infettivi distali non bonificati prima dell'intervento. Sono più spesso causate da microrganismi ad alta patogenicità (*S. aureus*, bacilli gram negativi). Se diagnosticate precocemente (< 3 settimane) si presuppone che la colonizzazione batterica possa essere ancora limitata, sebbene sia noto che il biofilm batterico si formi già dopo poche ore o giorni dall'impianto protesico; in tali casi è ritenuto possibile perseguire un approccio combinato medico-chirurgico di tipo conservativo, con debridement, eventuale rimozione delle componenti modulari protesiche e ritenzione della protesi, associato a terapia antibiotica long-term di massima performance. Tuttavia il semplice criterio temporale non consente di formulare una prognosi adeguata, poiché il risultato del trattamento conservativo dipende anche dalla localizzazione batterica (se in un'area raggiungibile dalla pulizia chirurgica o no).
- **Infezioni ritardate** (*delayed infections*) con tempo di insorgenza tra 3 e 24 mesi dal posizionamento dell'artroprotesi. *[Corvec 2012b; Osmon 2013]*. Sono considerate ad acquisizione esogena per shedding microbico sul campo operatorio o per via ematogena (soprattutto in pazienti con fattori di rischio). Sono causate più spesso da microrganismi a bassa-media patogenicità (stafilococchi coagulasi negativi, *Enterococcus spp*, *Corynebacterium spp*, *Propionibacterium acnes*) ovvero da microrganismi ad elevata patogenicità con bassa carica infettante.

Poiché si presuppone che in tali infezioni il biofilm sia ormai ben strutturato, la strada terapeutica più condivisa è rappresentata da un approccio combinato medico-chirurgico non conservativo con rimozione dell'artroprotesi, posizionamento di cemento spaziatore, tempo intermedio occupato da terapia antibiotica di massima performance e riposizionamento dell'artroprotesi una volta accertata l'eradicazione dell'infezione.

Riguardo la durata della terapia, le linee guida IDSA indicano un tempo medio di 4-6 settimane. Tuttavia la durata della terapia antibiotica non dovrebbe essere rigidamente predefinita, ma guidata dall'andamento della PCR, con sospensione correlata alla negativizzazione stabile di tale parametro.

Si sottolinea che l'intervento chirurgico di riposizionamento dell'artroprotesi viene effettuato solamente a fronte di una ragionevole certezza di eradicazione dell'infezione

- **Infezioni tardive** (*late infections*) (> 24 mesi) *[Corvec 2012b; Osmon 2013]*. Sono considerate a patogenesi ematogena, da siti di infezione remoti o traslocazione batterica da siti con elevata presenza di microrganismi (intestino, cavo orale, ecc) Applicando un concetto di early diagnosis in relazione alla durata dei sintomi, per questo tipo di infezioni è stato preso in considerazione un approccio conservativo (una diagnosi precoce entro 3 settimane dall'insorgenza del quadro clinico, farebbe presupporre un biofilm ancora non del tutto strutturato e quindi consentirebbe ancora un approccio di tipo conservativo analogo a quello perseguibile per le forme early), tuttavia in particolare in presenza di infezione da S.aureus sono stati osservati tassi di fallimento elevati, pertanto sono necessari ulteriori studi per stabilire la strategia chirurgia ottimale per questo tipo di infezioni *[Davis JS 2022; Wouthuyzen-Bakker 2020]*.

5. CLASSIFICAZIONE DELLE INFEZIONI DEI MEZZI DI OSTEOSINTESI

Le infezioni dei mezzi di osteosintesi possono essere classificate in base al tempo di insorgenza dei sintomi dopo l'intervento chirurgico in: *[Trampuz 2006]*

- **Infezioni precoci** (*early infections*) con tempo di insorgenza < 2 settimane. Vengono acquisite prevalentemente durante il trauma o l'intervento chirurgico. Sono causate da microrganismi ad alta virulenza (*S. aureus*, bacilli Gram-negativi).
- **Infezioni ritardate** (*delayed infections*) con tempo di insorgenza tra 2 e 10 settimane. Vengono acquisite durante il trauma o l'intervento chirurgico e sono causate prevalentemente da microrganismi a bassa virulenza (stafilococchi coagulasi negativi).
- **Infezioni tardive** (*late infections*) (> 10 settimane) vengono acquisite durante il trauma o l'intervento chirurgico e sono causate di solito da microrganismi a bassa virulenza (es. stafilococchi coagulasi negativi). Possono essere causate occasionalmente da disseminazione ematogena da siti di infezione remoti.

AMCLI
associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

6. MICRORGANISMI ASSOCIATI A INFEZIONE DI PROTESI ARTICOLARI E MEZZI DI OSTEOSINTESI

I microrganismi comunemente associati a infezione di protesi articolari e mezzi di osteosintesi sono riportati in Tabella 4.

Gli stafilococchi sono i microrganismi isolati più frequentemente sia nelle infezioni precoci, sia nelle ritardate che nelle tardive.

Per i casi di infezioni delle protesi articolari prevalgono gli stafilococchi coagulasi negativi (30-43%), tra cui *S.epidermidis*, ma anche *S. lugdunensis, S. capitis, S.t hominis, S. caprae,* seguiti da *S. aureus* (12-23%) *[Drago 2016; Becker 2014; Moran 2010; Trampuz 2005]*. Streptococchi ed enterococchi vengono isolati circa nel 10% dei casi; i batteri Gram-negativi in circa 10-17%, mentre in altre casistiche nell'8% dei casi *[Moran 2010]*. Tra i batteri anaerobi, *Cutibacterium acnes* è il microrganismo con maggior frequenza di isolamento. Esso, inoltre, è il principale microrganismo isolato nelle infezioni correlate alle infezioni della spalla. Il 10-20% delle infezioni possono essere sostenute da più di un microrganismo *[Trampuz 2005]*.

Nelle infezioni di origine ematogena *S. aureus* ha un ruolo dominante, seguito da Streptococcaceae e batteri gram negativi *[Stefansdottir 2009]*; gli Stafilococchi coagulasi negativi vengono comunque isolati in un terzo di esse.

Ovviamente possono essere tante le vie di partenza dei vari microrganismi, che poi per via ematogena possono provocare una infezione osteoarticolare e protesica *[Izakovica 2019]*.

- *Streptococcus pneumoniae*, dal tratto respiratorio;
- *Salmonella*, *Bacteroides*, *Streptococcus* da infezioni o disbiosi gastrointestinali;
- *Escherichia spp*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp*. dalle vie urinarie;
- *Streptococchi del gruppo viridans, da procedure odontoiatriche.*

Per i casi di infezione dei mezzi di osteosintesi si ha una prevalenza di *S. aureus* ed una alta frequenza di infezioni polimicrobiche *[Trampuz 2006]*.

Numerosi altri microrganismi possono essere introdotti per inoculo diretto o per via ematogena, compresi micobatteri e funghi. Le infezioni micotiche (stimate nell'ordine del 1-3%) rappresentano spesso delle complicanze e possono essere associate a pazienti con comorbidità. La stragrande maggioranza delle infezioni è dovuta dalla *Candida spp*. e in particolare da *C.albicans*.

In conclusione, qualsiasi microrganismo isolato dalla coltura di un campione associato a una protesi articolare o ad altro dispositivo ortopedico può quindi essere un potenziale agente eziologico di infezione *[PHE 2016]*.

La diagnosi di infezione è spesso complicata dall'impossibilità di isolare il patogeno responsabile dell'infezione con le tradizionali tecniche di campionamento. Ciò è principalmente dovuto al fatto che i batteri responsabili dell'infezione si organizzano in strutture complesse, conosciute con il termine di biofilm.

I microrganismi organizzati in biofilm sulle superfici delle componenti protesiche e dei mezzi di osteosintesi presentano caratteristiche particolari con implicazioni rilevanti nella diagnosi e nella terapia:

- Diversità fenotipica: si può esprimere in sottopopolazioni con colonie piccole a lenta crescita, di difficile identificazione da parte del laboratorio. Sul versante clinico la crescita lenta aumenta il rischio di fallimento terapeutico e giustifica la somministrazione prolungata di antibiotici.
- Produzione di matrice polisaccaridica extracellulare: crea un microambiente dove la comunicazione tra cellule è facilitata, la persistenza dei microrganismi favorita, la fagocitosi inibita.

- Aderenza dei microrganismi alle superfici protesiche: riduce anche la possibilità di isolamento dei microrganismi dal liquido articolare. Per tale ragione, ai fini diagnostici sono necessari campioni multipli protesici e tissutali.

E' molto difficile esercitare una efficace azione biocida nei confronti dei microrganismi organizzati all'interno del biofilm ed è pertanto arduo eradicare l'infezione senza rimuovere la protesi o il mezzo di osteosintesi. Se la componente colonizzata è mantenuta in sede, si utilizzeranno antibiotici efficaci nei confronti dei microrganismi presenti all'interno di questa struttura, capaci di penetrarla, anche se la sensibilità rilevata con i metodi standard non è spesso predittiva dell'attività antimicrobica richiesta. Le metodiche per la valutazione dell'attività in vitro degli antimicrobici nei confronti dei microrganismi organizzati in biofilm non sono attualmente disponibili presso i laboratori di routine *[PHE 2016]*, tuttavia molto si sta cercando di fare a livello societario (ad esempio ESCMID), e almeno in casi specifici di valutare e stabilire le MCI e le MCB anche in presenza di biofilm.

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

7. CRITICITÀ NEL PROCESSO DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO

Considerata la complessità delle tipologie di infezione che riguardano la protesica, i mezzi di sintesi e l'apparato osteoarticolare, sono diversi gli aspetti critici associati alla loro diagnosi di laboratorio. La fase pre-analitica in particolare e i percorsi che seguono i campioni biologici, incluse le informazioni clinico-anamnestiche del paziente, se non affrontati e considerati attentamente, possono condurre a una errata diagnosi e al conseguente inappropriato approccio terapeutico al paziente, nonché portare a dei costi aggiuntivi enormi per il sistema sanitario.

Le principali criticità, che verranno affrontate anche nei paragrafi successivi del presente documento, sono da riscontrarsi a livello di:

- ***Numero di campioni prelevati***: solitamente si ritiene che siano necessari in genere almeno 3-6 campioni di tessuto periprotesico per giungere all'isolamento del patogeno responsabile dell'infezione con ragionevole certezza *[Osmon 2013, Drago 2018]*. Un recente studio indica come ottimale un numero di 4 campioni di tessuto periprotesico che possono essere ridotti a 3 nel caso in cui si impieghino metodiche colturali che prevedono l'omogeneizzazione del tessuto e l'inoculo dell'omogenato in flaconi per emocoltura *[Peel 2016a]*. I campioni raccolti possono essere portati a 6 o più in caso di infezione di basso grado o infezioni correlate al Biofilm *[Drago 2018, Romanò 2019]*, proprio per aumentare la possibilità di ritrovare il microrganismo responsabile. In genere, l'isolamento dello stesso microorganismo da almeno due campioni è considerato uno dei criteri maggiori per la definizione di infezione. Deve però essere sottolineato che, se da una parte disporre di un congruo numero di campioni può aumentare la sensibilità dell'analisi, dall'altra ogni prelievo, se non effettuato in maniera corretta, è di per sé associato al rischio di contaminazione, e quindi di isolamento di microrganismi non direttamente coinvolti nell'infezione. L'isolamento di anche un solo microrganismo da un singolo campione, se associato ad altri criteri, è considerato tuttavia patognomonico di infezione *[EBJIS 2018, WAIOT 2018]*. La distinzione tra patogeno e contaminate è una delle fasi più delicate della procedura diagnostica di questo tipo di infezioni. Di conseguenza un numero eccessivo di campioni, se non prelevati in maniera idonea, potrebbe essere associato a un elevato rischio di isolamento di contaminanti.
- ***Modalità di prelievo***: altrettanto importanti sono le modalità con cui viene effettuato il prelievo sia dell'impianto protesico o dei mezzi di osteosintesi sia dei tessuti perimplantari. È stato dimostrato come la contaminazione di campioni di tessuto possa causare dal 3 al 52% di risultati falsi positivi. Le maggiori fonti di contaminazione sono rappresentate dall'ambiente della sala operatoria, nonostante la presenza di un appropriato controllo della ventilazione, e dal contatto dei campioni con altre superfici prima del processamento. Un recente studio ha evidenziato come l'inserimento del materiale biologico in contenitori sterili idonei ed ermeticamente chiusi direttamente al letto operatorio riduca in maniera significativa la frequenza di isolamento di microrganismi contaminanti rispetto all'utilizzo di passaggi intermedi quali il posizionamento dei campioni su un vassoio fuori dal campo chirurgico o il trasferimento dal primo operatore ad altro personale prima dell'inserimento in contenitori sterili [Chen 2016]. Un altro studio [Uzun 2020] ha evidenziato che il rischio di contaminazione aumenta esponenzialmente con il tempo, ed è prevenibile se almeno gli strumenti chirurgici sono coperti o si usano tutte le precauzioni per eliminare i passaggi di campioni in diversi contenitori e le processazioni/manipolazioni di tipo manuale. I più comuni batteri responsabili di contaminazione sono gli Stafilococchi coagulasi negativi (60.4%), lo Staphylococcus aureus (22.9%), e lo Streptococcus agalactiae (16.7%).
- ***Tipologia di materiale:*** studi di comparazione tra colture allestite con tessuti perimplantari e tamponi (classici o floccati) hanno dimostrato come l'analisi dei tessuti permette l'isolamento del patogeno con una frequenza più elevata rispetto all'analisi eseguita sui tamponi [Aggarwal 2013, Calori 2016]. Per quanto riguarda l'aspirato articolare, uno dei principali problemi riguarda la quantità di materiale biologico prelevata: infatti è frequente, soprattutto quando l'infezione è localizzata a livello dell'anca, che l'aspirazione articolare anche se ecoguidata non permetta di ottenere una quantità apprezzabile di materiale. In questi casi è usuale eseguire un lavaggio con

soluzione fisiologica. Tuttavia è stato dimostrato che il liquido di lavaggio ottenuto non è idoneo per eseguire la conta dei leucociti, in particolare in presenza di spaziatori e cementi antibiotati [Newman 2016].

AMCLI
associazione
microbiologi
clinici italiani
Ente del Terzo Settore

8. DIAGNOSI MICROBIOLOGICA

La coltura e l'isolamento del microrganismo infettante è tuttora il criterio maggiore per la diagnosi di infezione della protesi articolare. I materiali disponibili per la coltura sono rappresentati da: tessuti periprotesici, liquido articolare, componenti protesiche rimosse durante l'intervento di revisione.

8.1 INDAGINI MICROBIOLOGICHE PRE-OPERATORIE

COLTURA DEL LIQUIDO ARTICOLARE

Il prelievo va effettuato mediante artrocentesi. Vanno allestite le colture per microrganismi aerobi e anaerobi.

NOTA: L'analisi del liquido articolare dovrebbe prevedere il conteggio totale dei leucociti e differenziale dei polimorfonucleati neutrofili.

EMOCOLTURA

Le emocolture per microrganismi aerobi e anaerobi vanno eseguite se è presente febbre, un esordio acuto dei sintomi, oppure un'infezione concomitante che rende probabile la presenza di batteriemia *[Osmon 2013, Corvec 2012b]*.

COLTURA DEI TESSUTI PERIMPLANTARI PRELEVATI CON BIOPSIA PERCUTANEA

Con il supporto dell'ecografia o altri sistemi a immagine continua, quale la fluoroscopia, si può ottenere una biopsia del tessuto peri-protesico. Se la protesi è mobilizzata, la biopsia potrebbe essere prelevata dall'interfaccia cemento-osso o da quella protesi-osso. Rispetto alla raccolta del solo materiale liquido, il prelievo di biopsie con tecnica percutanea consente il campionamento multiplo e l'esame istologico (minimo di 3 o 4 campioni di tessuto perimplantare) *[PHE 2016]*. Vanno allestite le colture per microrganismi aerobi e anaerobi.

8.2 INDAGINI MICROBIOLOGICHE INTRA-OPERATORIE

COLTURA DEL LIQUIDO ARTICOLARE

Il prelievo va effettuato mediante artrocentesi o comunque a capsula articolare chiusa. Vanno allestite le colture per microrganismi aerobi e anaerobi.

NOTA: L'analisi del liquido articolare dovrebbe prevedere conteggio totale dei leucociti e differenziale dei polimorfonucleati neutrofili.

COLTURA DEI TESSUTI PERIMPLANTARI

Un minimo di 3 o 4 campioni di tessuto perimplantare (3 nel caso si allestiscano colture di omogenato in flaconi per emocoltura) *[Peel 2016a]* vanno raccolti durante l'intervento di pulizia o rimozione della protesi/mezzo di osteosintesi per l'esecuzione delle colture in aerobiosi e anaerobiosi.

COLTURA DELLE COMPONENTI PROTESICHE/DEI MEZZI DI OSTEOSINTESI

Tutte le componenti protesiche/mezzi di osteosintesi rimossi vanno raccolti per l'analisi colturale di microrganismi aerobi e anaerobi dopo trattamento con metodiche adeguate a favorire il distacco dei patogeni dal biofilm microbico.

8.3 INDAGINI MICROBIOLOGICHE POST- OPERATORIE

COLTURA DEI FISSATORI ESTERNI

In caso di infezione di un perno di fissazione transcutaneo è raccomandato il prelievo dell'essudato con siringa sterile lungo il perno *[Corvec 2012b]*.

9. GESTIONE E TIMING DI PROFILASSI E TERAPIA ANTIBIOTICA

9.1 PROFILASSI PERIOPERATORIA

Il posticipo della profilassi perioperatoria non è giustificata nei casi in cui il patogeno sia già stato identificato con esami preoperatori *[Burnett 2010, Tetrault 2014]*. Nei casi in cui c'è diagnosi o sospetto clinico di infezione e il microrganismo non sia stato ancora identificato, l'impiego e il timing della profilassi antibiotica rimane una scelta in carico al clinico *[Zmistowsky et al 2014]*. Studi recenti hanno mostrato che la profilassi antibiotica può essere somministrata al paziente sottoposto a intervento di revisione artroprotesica senza compromettere la sensibilità diagnostica delle colture da campioni di tessuto periprotesico *[Bedencic et al 2016; Tetrault et al 2014]*.

9.2 TERAPIA ANTIBIOTICA

La somministrazione di antibiotici al paziente è associata ad una alterazione dei markers ematici (VES, PCR) e sinoviali (conta leucocitaria e % PMN) e a un aumento di falsi negativi all'esame colturale *[Shai et al 2015]*.

Quando possibile, è raccomandato raccogliere i campioni prima della terapia antimicrobica *[PHE 2016]*.

Nelle infezioni precoci e tardive diagnosticate precocemente, se il paziente è clinicamente stabile, la terapia antibiotica, non va somministrata prima della pulizia chirurgica e del prelievo dei campioni intraoperatori per esame colturale.

Nelle infezioni ritardate e tardive, la terapia antibiotica deve essere sospesa, compatibilmente con il quadro clinico del paziente, almeno 2 settimane prima dell'espianto delle componenti protesiche/mezzi di osteosintesi *[Corvec 2012b, Osmon 2013]*.

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

10. FASE PRE-ANALITICA

10.1 MODALITÀ DI RACCOLTA DELL'ASPIRATO ARTICOLARE

La procedura richiede asepsi e preferibilmente dovrebbe essere effettuata mediante aspirazione articolare percutanea (possibilmente eco guidata) o comunque a capsula articolare chiusa (se eseguita durante l'intervento di revisione). Anche se non frequentemente impiegata, nel caso di mezzi di osteosintesi è anche possibile recuperare l'eventuale fluido accumulato in zona perimplantare mediante aspirazione preoperatoria.

Sono possibili due percorsi alternativi:

Opzione 1: Inoculare immediatamente dopo il prelievo un'aliquota (≥1ml per flacone) in flaconi da emocoltura per microrganismi aerobi e anaerobi *[Hughes 2001; Font-Vizcarra 2010; Bemer et al 2016]*.

Trasferire l'aspirato rimanente in contenitori sterili con o senza anticoagulante per le successive analisi colturali e con EDTA per la conta totale dei leucociti e differenziale dei polimorfonucleati neutrofili. Per la determinazione di eventuali altri markers fare riferimento al paragrafo "Test di Laboratorio aggiuntivi alle indagini microbiologiche".

Opzione 2: Trasferire l'aspirato in contenitori sterili con o senza anticoagulante per le successive analisi colturali e con EDTA per la conta totale dei leucociti e differenziale dei polimorfonucleati neutrofili. Per la determinazione di eventuali altri markers fare riferimento al paragrafo "Test di Laboratorio aggiuntivi alle indagini microbiologiche".

10.2 MODALITÀ DI RACCOLTA DEI TESSUTI PERIMPLANTARI

Il prelievo di campioni bioptici multipli è indispensabile al fine di aumentare la sensibilità dei metodi colturali e distinguere i microrganismi contaminanti dai patogeni.

Ogni singola biopsia di tessuto perimplantare va prelevata preferibilmente con strumentazione separata *[Bemer et al 2016; Zmistowski 2014]*, evitando accuratamente il contatto con la cute e con le telerie del campo operatorio, inserendola quindi direttamente in un contenitore sterile, chiuso ermeticamente, per prevenire il rischio di contaminazione.

Prelevare un numero ≥ 3 e □6 di biopsie perimplantari *[Osmon 2013]*. Nel caso di protesi articolari includere preferibilmente campioni prelevati dalla interfaccia protesi-osso, dalla capsula articolare e da eventuali aree con segni di infiammazione *[Bemer et al 2016]*. Nel caso di mezzi di osteosintesi prelevare campioni di tessuto perimplantare e di eventuali aree con segni di infiammazione.

NOTA: si consiglia di prelevare campioni bioptici di tessuto con volume di circa 1 cm^3 al fine di agevolare le procedure analitiche.

NOTA: (indagini istopatologiche) *[Tsaras 2012]* Nei medesimi punti prelevare un numero equivalente di biopsie per la valutazione dello stato infiammatorio mediante esame istologico. Inviare le biopsie tal quali se disponibile l'analisi istologica estemporanea, altrimenti inserire le biopsie in contenitori preriempiti con formalina tamponata per una analisi istologica su sezioni permanenti.

10.3 MODALITÀ DI RACCOLTA DELLE COMPONENTI PROTESICHE/MEZZI DI OSTEOSINTESI

Le componenti protesiche rimosse (stelo femorale, cotile, scudo femorale, piatto tibiale, inserto in polietilene, stelo omerale, glenoide, ecc.), il cemento di fissazione, i mezzi di osteosintesi (viti, placche, chiodi endomidollari, fili ecc.), i fili di sutura non riassorbibili, i sostituti ossei, sono materiali adatti per la coltura e l'isolamento di batteri organizzati in biofilm.

Particolare attenzione deve essere posta alla raccolta delle componenti protesiche/biomateriali, al fine di evitarne la contaminazione. Componenti che siano accidentalmente venuti in contatto diretto con la cute del paziente durante la loro estrazione/rimozione, o che siano prelevati con strumenti o

con le mani dell'operatore, che si ritiene possano aver avuto un contatto diretto con la cute, devono essere esclusi dalla raccolta.

Porre quindi le componenti protesiche o i mezzi di osteosintesi, in contenitori non perforabili, sterili, a tenuta, di idonee dimensioni e preferibilmente che non richiedano l'ulteriore manipolazione del campione. Chiudere il contenitore e inviare al laboratorio. Per aumentare la specificità della coltura, porre ciascuna componente in contenitori separati e sterili ermeticamente chiusi *[Janz et al 2013]*.

NOTA: Qualora si preveda di impiegare la sonicazione per la rimozione dei microrganismi organizzati in biofilm dalle superfici delle componenti protesiche e dei mezzi di osteosintesi è possibile ricoprire la componente per almeno il 90 % del suo volume con soluzione di Ringer o soluzione fisiologica sterile direttamente in sala operatoria in campo sterile, immediatamente dopo la rimozione *[Janz et al 2013; Holinka et al 2011; Caola et al 2013; Yano et al 2014]*.

NOTA: Qualora si impieghi la sonicazione, è consigliabile prevedere a intervalli regolari, l'allestimento di controlli negativi, costituiti da contenitori sterili non perforabili vuoti o riempiti con soluzione di Ringer o soluzione fisiologica sterile da inviare al laboratorio per l'esame colturale con le medesime procedure impiegate per le componenti protesiche *[Janz et al 2015]*.

10.4 TRASPORTO E CONSERVAZIONE

Consegnare i campioni in laboratorio nel minor tempo possibile. Se ciò non fosse possibile, conservare i campioni di tessuto e le componenti protesiche (o i mezzi di osteosintesi) a 4°C *[PHE 2016]* e inviare appena possibile compatibilmente con gli orari di apertura del servizio, aggiungendo, per campioni di dimensioni ridotte, qualche goccia di soluzione fisiologica sterile. I flaconi inoculati con liquido articolare possono essere conservati a temperatura ambiente fino a 48h.

E' raccomandato inviare al laboratorio le informazioni di data e ora del prelievo, nome di un referente per i prelievi, sede anatomica e informazione cliniche (antibiotico-terapia, pregressi infettivologici), specificando eventuali richieste di test microbiologici mirati (es. ricerca micobatteri) *[Corvec 2012b]*.

10.5 MATERIALI NON IDONEI

Pus da fistola

Le colture della secrezione da fistola non sono utili perché i microrganismi isolati spesso rappresentano la popolazione microbica colonizzante della cute e non sono predittivi dell'agente causale dell'infezione profonda, con eccezione di *S. aureus* *[Trampuz 2005]*.

Materiale perimplantare raccolto con tampone

Vanno evitati i prelievi di materiale perimplantare mediante tampone poiché la sensibilità colturale è bassa e inferiore a quella dei campioni di tessuto perimplantare *[Aggarwal, 2013]* e dell'eluito dalla protesi anche se vengono impiegati tamponi floccati *[Calori 2016]*.

Liquido di drenaggio

L'allestimento di colture dai drenaggi o dai liquidi di drenaggio non è raccomandato per l'elevato rischio di contaminazione dei materiali da popolazione microbica cutanea *[Corvec 2012b]*.

Associazione Microbiologi Clinici Italiani
Ente del Terzo Settore

11. FASE ANALITICA

I materiali per la diagnosi di infezione della protesi o dei mezzi di osteosintesi vanno manipolati in cabina biologica di sicurezza di classe 2. Per contenere il più possibile la possibilità di contaminazione del campione durante le fasi di processazione del campione, è necessario ridurre al minimo la manipolazione e il numero di aperture di ciascun contenitore *[PHE 2016]*.

Il tecnico deve indossare sovracamice e guanti monouso (da sostituire durante lavorazioni prolungate). L'osservazione delle colture deve essere effettuata nelle medesime condizioni *[Corvec 2012b]*.
I metodi colturali prevedono l'impiego di terreni solidi e l'arricchimento in terreno liquido *[PHE 2016, Huges 2011]* con tempo di incubazione non inferiori a 5 giorni per le colture in aerobiosi e fino a 14 giorni per le colture in anaerobiosi. L'incubazione prolungata risulta di particolare utilità nelle infezioni tardive sostenute da microrganismi a lenta crescita e da batteri anaerobi *[Bemer 2016; Butler Wu 2011; Drago 2015; Schwotzer 2014]*.

Diversi studi degli ultimi anni riportano i vantaggi dell'utilizzo dei flaconi per emocoltura per liquido articolare, omogenato di tessuto periprotesico e fluido di sonicazione o di eluizione con DTT dalla protesi. L'inoculo di flaconi per emocoltura permette il monitoraggio in continuo della crescita, la possibilità di inoculare maggiori volumi di campione rispetto ai terreni solidi, la presenza di sistemi di rimozione degli antimicrobici e di agenti litici che favoriscono il rilascio dei microrganismi fagocitati *[Huges 2011; Minassian 2014; Jordan 2014; Shen 2015; Velay 2010, Portillo 2015, Peel 2016b; Bemer 2016, PHE 2016]*. Mediante l'utilizzo dei flaconi per emocoltura e dei sistemi di monitoraggio continuo e' stata evidenziata una riduzione dei tempi di positivizzazione delle colture *[Portillo 2015, Portillo 2014]*. In caso di utilizzo dei flaconi per emocoltura non è necessaria la subcoltura delle negative a fine incubazione *[Minassian et al 2014]*.

11.1 COLTURA DEL LIQUIDO ARTICOLARE

Opzione 1:

Centrifugare l'aliquota di liquido articolare raccolta in provetta a 3000 g per 10 min. Eliminare il surnatante e riportare il sedimento a un volume di 0,5-1 ml con soluzione fisiologica sterile (in ragione al numero di terreni da inoculare).

Inoculare:

- 0,1 ml in agar sangue e agar cioccolato. Incubare in atmosfera con 5% CO_2 per 5 giorni a 36±1°C
- 0,1 ml in agar Schaedler. Incubare in anaerobiosi per 7-10 giorni a 36±1°C

Incubare i flaconi per emocoltura, inoculati con il liquido articolare immediatamente dopo il prelievo, in strumentazione dedicata per 7 giorni (flacone per aerobi) *[Minassian 2014]* e 14 giorni (flacone per anaerobi) *[Peel 2016b; Achermann 2016]*.

NOTA: L'impiego di flaconi per emocoltura per l'inoculo di liquido articolare direttamente al letto del paziente durante i prelievi preoperatori o in sala operatoria durante l'intervento di revisione è importante perché nelle forme croniche il numero dei microrganismi liberi (planctonici) può essere ridotto e la sensibilità colturale dell'aspirato articolare può quindi risultare scarsa. Inoltre favorisce lo sviluppo di microrganismi a vitalità ridotta o a lenta crescita a seguito di pregressi trattamenti antibiotici e/o per le caratteristiche metaboliche dei microrganismi sessili. *[Corvec 2012b, PHE 2016]*

Opzione 2:

Centrifugare il campione a 3000 g per 10 min. Eliminare il surnatante e riportare il sedimento a un volume di 0,5-1 ml con soluzione fisiologica sterile (in ragione al numero di terreni da inoculare).

Inoculare:

- 0,1 ml in agar sangue e agar cioccolato. Incubare in atmosfera con 5% CO_2 per 5 giorni a 36±1°C
- 0,1 ml in agar Schaedler. Incubare in anaerobiosi per 7-10 giorni a 36±1°C

- 0,1 ml in brodo per aerobi/anaerobi esigenti; incubare per 14 giorni a 36±1°C Subcoltivare in agar sangue, agar cioccolato e agar Schaedler quando il brodo diventa torbido e a fine incubazione *[Butler Wu 2011, Drago 2015]*.

Se disponibile, allestire un preparato microscopico dal sedimento del liquido articolare. Nelle infezioni acute potrebbe essere utile una colorazione di Gram dell'aspirato articolare, sebbene un risultato negativo non escluda la possibilità d'infezione *[PHE 2016]*. In generale la colorazione di Gram ha elevata specificità, ma bassa sensibilità (SE 26%, SP 97% *[Zimmerli 2004]*].

NOTA: L'ulteriore inoculo di 0,1 ml del liquido articolare concentrato in terreni selettivi può essere eseguito in accordo con le procedure dei singoli laboratori.

11.2 COLTURA DEI TESSUTI PERIMPLANTARI

Opzione 1:

Eluire con soluzione sterile 0,1% (w:v) di ditiotreitolo *[De Vecchi 2016]* oppure omogeneizzare in 3 ml di brodo (es. Brain Heart Infusion broth) *[Trampuz 2007]* i frammenti bioptici mantenendo l'asepsi .

Inoculare:

- 0,5 ml di eluito/omogenato in una piastra o suddiviso in più piastre di agar sangue e agar cioccolato. Incubare in atmosfera con 5% CO_2 per 5 giorni a 36±1°C
- 0,5 ml di eluito/omogenato in una piastra o suddiviso in più piastre di agar Schaedler. Incubare in atmosfera anaerobia per 7-10 giorni a 36±1°C
- 0,5 ml di eluito/omogenato in brodo per aerobi/anaerobi esigenti (es.: tioglicollato, Schaedler broth); incubare per 14 giorni a 36±1°C. Subcoltivare in agar sangue, agar cioccolato e agar Schaedler quando il brodo diventa torbido e a fine incubazione *[Butler Wu 2011; Drago 2015; Swotzer 2014]*.

Opzione 2:

Omogeneizzare i frammenti bioptici in 5 ml di brodo (es. Brain Heart Infusion broth) utilizzando un omogenizzatore dedicato e mantenendo l'asepsi *[Peel 2016b]*.

Inoculare:

- 0,1 ml di omogenato in agar sangue e in agar cioccolato. Incubare in atmosfera con 5% CO_2 per 5 giorni a 36±1°C
- 0,1 ml di omogenato in agar Schaedler. Incubare in atmosfera anaerobia per 7-10 giorni a 36±1°C
- ≥ 1 ml di omogenato in flaconi da emocoltura per aerobi e anaerobi. Incubare in strumentazione dedicata per 7 giorni (flacone per aerobi) *[Minassian et al 2014]* e 14 giorni (flacone per anaerobi) *[Peel 2016a Peel 2016b; Achermann 2016]*.

Metodi alternativi:

La letteratura indica l'omogenizzazione come procedura di riferimento per il trattamento dei tessuti, pur con differenti metodiche e strumentazioni *[Roux 2010; Redanz 2015; Peet 2016; Bemer 2016; Bedencic 2016]* Tuttavia la pratica comune indica una certa difficoltà nella procedura di omogeneizzazione e si limita alla vortexazione del campione in terreno liquido. E' anche possibile eseguire una frammentazione con bisturi sterile sotto cappa a flusso laminare. Ovviamente tali procedure manuali e i vari passaggi inerenti possono essere a rischio di contaminazione dei vari campioni, per cui particolare cautela deve essere posta dagli operatori quando si scelgono tali procedure.

NOTA: E' utile congelare a -20 o -80°C un'aliquota di omogenato di tessuto per allestire colture supplementari in caso di necessità.

11.3 COLTURA DELLE COMPONENTI PROTESICHE/MEZZI DI OSTEOSINTESI

Opzione 1: Sonicazione *[Trampuz 2007; Piper 2009; Yano 2014]*

Aprire sotto cappa a flusso laminare il contenitore delle componenti protesiche (o mezzi di osteosintesi).

Ricoprire la componente per almeno il 90 % del suo volume con soluzione di Ringer o soluzione fisiologica sterile.

Chiudere il contenitore.

Preparare il bagno di sonicazione riempiendo la vasca con acqua sterile e procedere alla degasazione.

Vortexare il contenitore con la componente per 30 secondi.

Sonicare a 30-40 KHz 0,22±0,04 W/cm^2 per 5 minuti.

Vortexare per ulteriori 30 secondi.

NOTA: Le componenti protesiche/mezzi di osteosintesi vengono sottoposti a sonicazione negli stessi contenitori di trasporto al fine di minimizzare le possibili contaminazioni.

NOTA: al fine di preservare la vitalità microbica, è importante effettuare la sonicazione dei campioni rispettando i parametri di utilizzo sopra indicati.

Le colture possono essere effettuate dal sonicato tal quale *[Trampuz 2007]* oppure dal sonicato dopo concentrazione *[Piper 2009; Yano 2014]*.

Inoculo del sonicato tal quale:

- 0,5ml in una piastra o suddiviso in più piastre di agar sangue o cioccolato. Incubare in atmosfera con 5% CO_2 per 5 giorni a 36±1°C
- 0,5ml in una piastra o suddiviso in più piastre di agar Schaedler. Incubare in anaerobiosi per 7-10 giorni a 36±1°C
- arricchimento in terreni liquidi:
  - 0,5 ml in brodo per aerobi/anaerobi esigenti; incubare per 14 giorni a 36±1°C. Subcoltivare in terreni solidi quando il brodo diventa torbido o a fine incubazione.
  - ***oppure***
  - 10 ml in flaconi da emocoltura per aerobi e anaerobi *[Portillo et al 2015]*. Incubare in strumentazione dedicata per 7 giorni (flacone per aerobi) e 14 giorni (flacone per anaerobi) *[Peel 2016b; Achermann 2016]*.

In alternativa, inoculo del sonicato concentrato (100:1 del sonicato tal quale):

- 0,1ml del concentrato in Agar sangue e cioccolato. Incubare in atmosfera con 5% CO_2 per 5 giorni a 36±1°C
- 0,1ml del concentrato in Agar Schaedler. Incubare in anaerobiosi per 7-10 giorni a 36±1°C
- arricchimento in terreni liquidi:
  - 0,1 ml del concentrato in brodo per aerobi/anaerobi esigenti; incubare per 14 giorni a 36±1°C. Subcoltivare in terreni solidi quando il brodo diventa torbido o a fine incubazione.
  - ***oppure***
  - 0.5 ml del concentrato in flaconi da emocoltura per aerobi e anaerobi *[Shen 2015]*. Incubare in strumentazione dedicata per 7 giorni (flacone per aerobi) e 14 giorni (flacone per anaerobi) *[Peel 2016b; Achermann 2016]*.

NOTA: La procedura di concentrazione 100:1 può essere ottenuta centrifugando aliquote da 50 ml del sonicato a 3000 rpm per 10 min in provetta sterile a fondo conico. Eliminare il surnatante e riportare il sedimento a un volume di 0.5 ml con soluzione fisiologica sterile.

NOTA: Il sonicato tal quale o dopo concentrazione può essere inoculato in flaconi per emocoltura per microrganismi aerobi e anaerobi *[Shen 2015; Portillo 2015]*.

NOTA: E' utile congelare a -20 o -80°C un'aliquota di sonicato o di sonicato concentrato per allestire ulteriori indagini in caso di necessità.

Opzione 2: Eluizione con ditiotreitolo [Drago 2013]

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

Allestire una soluzione sterile 0,1% (w:v) di ditiotreitolo (DTT, formula empirica $C_4H_{10}O_2S_2$, peso molecolare: 154.2) in PBS

Aprire il contenitore della componente protesica (o mezzo di osteosintesi) sotto cappa a flusso laminare.

Aggiungere soluzione sterile di DTT fino a coprire la componente.

Chiudere il contenitore.

Porre il contenitore su agitatore orbitale a circa 80 rpm per 15 min.

- Inoculare l'eluato concentrato (100:1 dell'eluato tal quale):
- 0,1ml del concentrato in Agar sangue e cioccolato. Incubare in atmosfera con 5% CO_2 per 5 giorni a 36±1°C
- 0,1ml del concentrato in Agar Schaedler. Incubare in anaerobiosi per 7-10 giorni a 36±1°C
- 0,1ml del concentrato in brodo per aerobi/anaerobi esigenti; incubare per 14 giorni a 36±1°C. Subcoltivare in terreni solidi quando il brodo diventa torbido o a fine incubazione.

NOTA: La procedura di concentrazione 100:1 può essere ottenuta centrifugando aliquote da 50 mL dell'eluato a 3000 rpm per 10 min in provetta sterile a fondo conico. Eliminare il surnatante e riportare il sedimento a un volume di 0.5 ml con soluzione fisiologica sterile.

NOTA: L'eluato tal quale o dopo concentrazione può essere inoculato in flaconi per emocoltura per microrganismi aerobi e anaerobi.

NOTA: E' utile congelare a -20 o -80°C un'aliquota di eluato con DTT o di eluito concentrato per allestire ulteriori indagini in caso di necessità.

11.4 TEMPI DI INCUBAZIONE

Il periodo e le condizioni di incubazione delle piastre e dei brodi di arricchimento rivestono un ruolo critico per la crescita e la successiva identificazione dei microrganismi. I tempi di incubazione devono conciliare le esigenze del microbiologo (disponibilità di metodiche sensibili e di un insieme di dati microbiologici affidabili per l'individuazione dell'agente eziologico di infezione) con le necessità di ortopedico e infettivologo di disporre di una risposta microbiologica tempestiva.

È stato dimostrato che l'allungamento del periodo di incubazione dei brodi di arricchimento da 5 a 14 giorni consente di aumentare la frequenza di isolamento di propionibatteri (Cutibatteri) e stafilococchi di circa il 20% *[Butler-Wu 2011, Schäfer 2008]*.

Si consiglia pertanto di incubare le colture su terreno solido per aerobi per 5 giorni, quelle per anaerobi per 10 giorni verificando la crescita di eventuali colonie in prima, seconda e quinta giornata (e decima giornata per colture in anaerobiosi). Per evitare contaminazioni accidentali, l'osservazione delle piastre per la rilevazione della crescita batterica va effettuata in cappa a flusso laminare.

Proseguire l'incubazione e le letture nei tempi previsti anche in caso di coltura positiva precoce su terreno solido al fine di rilevare anche altri batteri a lenta crescita o le crescite polimicrobiche *[Corvec 2012b]*.
Le colture in brodo di arricchimento vanno protratte fino a 14 giorni, verificando giornalmente l'eventuale l'intorbidimento del terreno di coltura. Nel caso di positività dei brodi e a fine incubazione sottocoltivare 10µL di brodo su terreni solidi.
L'incubazione delle colture dei diversi materiali in fiasca per emocoltura può essere limitato a 7 giorni per l'aerobiosi e comunque protratto fino a 14 giorni per anaerobiosi *[Peel 2016b; Achermann 2016]*.
Non è necessaria la subcoltura finale dei flaconi che non hanno mostrato crescita di microrganismi *[Minassian et al 2014]*.

11.5 IDENTIFICAZIONE DEI MICRORGANISMI

Le metodiche routinarie di laboratorio per l'identificazione dei microrganismi si riferiscono a quelle standard nella maggior parte dei casi.

Porre attenzione:

- alla crescita di colonie "varianti" di piccole dimensioni cresciute su terreno solido. I microrganismi rimossi dal biofilm possono presentare caratteristiche biochimiche anomale per inattivazione di processi enzimatici nelle forme sessili. La subcoltura ripetuta in terreni arricchiti fa spesso riacquisire i caratteri fenotipici normali e permette la corretta identificazione a livello di genere e specie *[Sendi 2010, Maduka-Ezeh 2012]*;
- al pattern antibiotico degli stafilococchi coagulasi negativi, che non è un metodo sempre affidabile per distinguere ceppi diversi. I metodi molecolari hanno dimostrato che lo stesso antibiogramma può essere associato a due diversi ceppi e, al contrario, microrganismi con antibiogrammi diversi possono apparire indistinguibili alla genotipizzazione. Inoltre, ceppi diversi possono essere presenti contemporaneamente sulla stessa protesi o mezzo di osteosintesi *[Atkins 1998]*.

L'utilizzo della spettrometria di massa (MALDI-TOF MS) per l'identificazione batterica rappresenta una valida tecnica di identificazione microbica rapida *[Harris 2010]*. Si raccomanda di testare al MALDI-TOF MS tutti gli isolati con colonie morfologicamente differenti. Nel caso di campioni multipli da cui crescono colonie morfologicamente simili, testare al MALDI-TOF MS le colonie derivanti da due diversi campioni. Qualora si riscontri identità di specie non è necessario identificare colonie simili isolate da altri campioni *[Peel 2015]*.

In alcuni casi i metodi disponibili in laboratorio non sono in grado di fornire un'identificazione corretta per microorganismi di infrequente isolamento. In caso di dubbio, l'identificazione dei differenti isolati con metodiche molecolari è giustificata *[Corvec 2012b]*.

L'impiego di procedure particolari, quali elettroforesi pulsata, rep-PCR, deve essere considerato solo in casi eccezionali per stabilire il grado di correlazione genetica tra differenti isolati *[Corvec 2012b]* :

- Differenti fenotipi dallo stesso campione o dalla stessa serie di campioni al fine di escludere o confermare una possibile contaminazione dei materiali,
- Isolati da campioni prelevati in tempi successivi dallo stesso paziente per confermare o escludere la presenza di reinfezioni o recidive,
- Isolati da campioni di differenti pazienti per confermare o escludere epidemie nosocomiali.

I microrganismi isolati dovrebbero essere sistematicamente archiviati in congelatore sia per successive indagini clinico-epidemiologiche sia per possibili implicazioni legali *[Corvec 2012b]*.

11.6 COLTURE NEGATIVE IN CASI CON EVIDENZA CLINICA DI INFEZIONE

Sono diverse le ragioni per le quali le colture possono risultare negative: a) precedente esposizione ad antibiotico, b) inadeguatezza del campionamento, c) presenza di un basso numero di microrganismi, d) incapacità di recuperare i microrganismi organizzati in biofilm, e) terreni di coltura inappropriati, f) tempi di incubazione insufficienti, g) microrganismi fastidious, h) tempi di trasporto dei materiali alla microbiologia prolungati.

Alcuni microrganismi, come *Abiotrophia defectiva* e *Granulicatella adiacens* (precedentemente classificata come variante nutrizionale di streptococchi) sono difficili da evidenziare in coltura.

Nel caso di colture negative in pazienti con evidenza clinica di infezione protesica è raccomandabile allestire colture additive per funghi e micobatteri, indagini in biologia molecolare per un ampio ventaglio di microrganismi, analisi sierologiche per *Brucella* e *Coxiella* e per eventuali altri microrganismi non coltivabili *[Parik and Antony 2016]*.

11.7 INFEZIONI CAUSATE DA MICROORGANISMI A BASSO GRADO DI PATOGENICITÀ

Microrganismi a basso grado di patogenicità sono in grado di sostenere infezioni di difficile identificazione, in quanto solitamente si presentano con sintomatologia e segni clinici sfumati

(assenza di febbre, negatività ai marcatori di infiammazione o di infezione, assenza di fistole). Anche i livelli di PCR e VES possono non essere marcatamente alterati, o presentare andamento altalenante. E' stato riportato che il 4-13% dei pazienti, in cui era stata inizialmente ipotizzato un fallimento asettico della protesi, siano stati successivamente riclassificati come infetti nel momento in cui sono stati rianalizzati con metodi molecolari *[Moojen 2010]*.

I patogeni coinvolti sono solitamente caratterizzati da una ridotta virulenza (stafilococchi coagulasi negativi, cutibatteri, corinebatteri) ed instaurano un particolare rapporto con l'ambiente circostante (ospite, impianto ecc.) così da causare un danno non evidenziabile con la valutazione dei normali parametri clinici e di laboratorio. É stato ipotizzato che questo rapporto possa variare e portare, in situazioni favorevoli, all'insorgenza dei classici sintomi dell'infezione protesica *[Romanò 2016]*. Risultano pertanto di difficile diagnosi. In questi casi anche l'esame colturale del liquido articolare non è sempre in grado di fornire informazioni utili alla diagnosi *[Bucholz 1981; Cuckler 1991, Romanò 2016]* e assume particolare importanza il trattamento del campione allo scopo di rimuovere i patogeni dal biofilm con metodi di provata efficacia, utilizzare tempi di incubazione delle colture prolungati e anche metodi di identificazione molecolari *[Romanò 2016]*.

11.8 MICRORGANISMI INUSUALI O FASTIDIOUS ASSOCIATI AD INFEZIONI PROTESICHE/MEZZI DI OSTEOSINTESI

Nelle infezioni ricorrenti a coltura negativa per germi aerobi ed anaerobi e/o quando la storia clinica suggerisce uno specifico rischio da esposizione infettiva (animali domestici o selvatici, insetti, viaggi, attività all'aperto), è consigliabile allestire colture su terreni specifici per germi inusuali e/o adeguati test sierologici.

Considerare l'allestimento delle colture per micobatteri in caso di sospetto clinico basato su provenienza del paziente, presenza di granulomi all'esame istologico, riscontro radiologico al torace, pregressa tubercolosi *[PHE 2016]*.

Le colture possono essere allestite in contemporanea con quelle di routine, oppure in una fase successiva ricorrendo ai materiali conservati a -20 o -80°C (tessuto omogenato, liquido di sonicazione o di eluizione in DTT della componente protesica o del mezzo di osteosintesi).

11.9 PROVA DI SENSIBILITÀ AGLI ANTIMICROBICI

L'antibiogramma deve comprendere un ampio range di antimicrobici di prima e seconda scelta:

- che raggiungano alte concentrazioni tissutali;
- che siano attivi verso microrganismi a lenta crescita e organizzati in biofilm *[PHE 2016]*.

Antimicrobici per i quali è raccomandata la valutazione della sensibilità in vitro (se EUCAST considera l'antibiotico potenzialmente efficace nei confronti di quella specie):

Rifampicina, Levofloxacina, Moxifloxacina, Ciprofloxacina, Daptomicina, Teicoplanina, Vancomicina, Linezolid, Minociclina, Clindamicina, Acido fusidico, Cotrimossazolo, Amoxicillina/Acido clavulanico,Piperacillina-tazobactam, Meropenem, Ertapenem, Oxacillina, Fosfomicina, Cefalosporine di 3° generazione, Colistina, Tigeciclina.

Per le molecole testate deve essere indicato il valore della Minima Concentrazione Inibente.

11.10 STUDI DI CONFRONTO TRA SONICAZIONE E DITIOTREITOLO (DTT)

Negli ultimi anni sono stati diversi gli studi di confronto tra i due metodi. Uno dei primi studi *[Sambri 2018]*, che includeva un cospicuo numero di pazienti, ha evidenziato che entrambe le procedure hanno migliorato il rilevamento microbico rispetto alle colture eseguite su campioni di tessuto (soprattutto nei casi di infezioni causate da Stafilococchi coagulasi-negativi). I risultati dello studio hanno evidenziato inoltre che la sensibilità dei due metodi è paragonabile.

Una recente metanalisi *[Tsikopoulos 2022]*, considerando 6 articoli idonei per l'inclusione nella revisione sistematica, per un totale di 897 pazienti sottoposti a revisione di anca e ginocchio, ha evidenziato che la sonicazione non è superiore in termini di sensibilità e specificità al pretrattamento con il DTT.

Un recente studio di comparazione tra DTT e sonicazione *[Karbisheva 2022]*, eseguito su 187 pazienti (79 classificati come positivi e 108 come negativi), ha dimostrato che la sonicazione ha una migliore sensibilità (73.8%) rispetto al DTT (43.2%). Tuttavia, il 5 (24%) dei campioni dei pazienti negativi e trattati con DTT venivano processati dopo diverse ore dalla raccolta dei campioni (19 ore in media, range 14–24 ore), lasciando in immersione per tutto il periodo i campioni con il DTT.

Questo aspetto pone un tema analitico che esige il rispetto dei tempi di processazione. le concentrazioni di DTT impiegate, come anche le frequenze impiegate per la sonicazione.

Un riferimento riguardante l'inibizione batterica in vitro del DTT, se non si rispettano le concentrazioni e i tempi di contatto, è riportato in uno studio in vitro sul killing di *E.coli* *[Gill 1998]*. Gli Autori affermano che concentrazioni superiori a 1,0 g/L e tempi di contatto superiori ai 30 minuti potrebbero comportare diminuzioni della carica microbica.

Questa situazione è molto simile a quanto riferito in letteratura per la sonicazione, dove per evitare l'inattivazione alla crescita e l'uccisione dei batteri *[Kamineni 2019]* è necessario il rispetto dei parametri di scelta della frequenza degli ultrasuoni *[Monsen 2009]*. La sonicazione, laddove usata correttamente, è stata segnalata inoltre indurre cambiamenti fenotipici in *E.coli*, che possono rendere difficile la diagnosi microbiologica *[Sendi 2010]*.

Il rispetto di tutti i parametri inerenti la processazione del campione, presentati in questo percorso, diventa quindi fondamentale per una corretta diagnosi microbiologica.

11.11 BIOLOGIA MOLECOLARE E ALTRE TECNICHE DI RILEVAMENTO DIRETTO DEI MICRORGANISMI DAI CAMPIONI

La coltura rimane il *gold standard* microbiologico nella diagnosi delle infezioni protesiche, anche se le tecniche molecolari stanno emergendo sempre di più e possono attualmente avere un ruolo nei seguenti casi: a) colture negative a fronte di fondato sospetto di infezione, b) pregresso e prolungato trattamento antibiotico, c) sospetta infezione da microrganismi *fastidious*, d) qualora si voglia accorciare, in casi selezionati, i tempi necessari alla diagnostica microbiologica *[Bemer 2014; Hartley and Harris 2014]*.

Sono possibili due differenti approcci:

- PCR *broad range*: basata sul rilevamento del DNA ribosomiale 16S. In caso di positività, gli ampliconi possono essere identificati in seconda battuta mediante sequenziamento.
- PCR specifica: presenta maggiore sensibilità e può essere svolta sia in modalità convenzionale che real-time. Queste tecniche mirano al rilevamento di un genere o di una specie predeterminata sulla base del contesto clinico e epidemiologico.

Tuttavia queste tecniche, seppur promettenti, possono avere delle criticità che vanno attentamente valutate.

In particolare, una limitazione della tecnica PCR potrebbe essere la contaminazione o l'impossibilità di distinguere tra batteri vivi o morti, dove la eventuale contaminazione del DNA microbico rappresenta uno dei principali limiti della diagnosi basata su questa tecnica *[Vandercam 2008]*.

Nonostante queste problematiche, tale tecnica offre dei vantaggi, come ad esempio l'identificazione di *Kingella kingae*, un importante agente infettivo osteoarticolare pediatrico, che richiede una PCR specifica per questo germe sul gene 16S *[Higgins 2022]*.

Altri vantaggi attraverso le PCR specifiche sono rappresentati dal fatto che alcuni microrganismi possono essere identificati in un piccolo volume e/o nel giro di poche ore, come anche in campioni di pazienti che ricevono un trattamento antibiotico o in pazienti che hanno infezioni di basso grado,

nonché permettere l'identificazione di batteri a bassa virulenza o a lenta crescita *[Esteban 2021, Morgesten 2018]*.

Riguardo la PCR broad-range, i falsi positivi rimangono ad oggi il principale problema. Tuttavia, al fine di ridurre la diagnosi errata e la contaminazione, alcuni studi hanno cercato di sviluppare una PCR genere-specifica o con panelli di microrganismi target (multiplex PCR).

In letteratura. è stato tuttavia evidenziato che la sensibilità del test può cambiare in relazione alla tipologia di campione analizzato *[Mendelez 2016; Cazanave 2013; Borde 2015; Ryu 2014; Bemer 2014]*.

Negli ultimi anni si stanno impiegando numerosi nuovi biomarkers, tra le tante le applicazioni promettenti c'è il sequenziamente genico con tecniche di Next Generation Sequencing (NGS), La NGS consente di identificare infatti un'ampissima gamma di agenti batterici, nonché, attraverso il sequenziamento del gene ITS, diagnosticare anche le infezioni micotiche.

Grazie all'NGS e alla Shotgun-Metagenomics *[Wildeman 2020, Sanabria 2021]*, alcuni studi hanno evidenziato la capacità non solo di identificare un ampio panello di microrganismi responsabili, ma anche di rilevare alcune resistenza antibiotiche, come ad esempio alla rifampicina e ai fluorochinolonici, o alle penicilline e all'acido fusidico.

In un recente studio *[Goswami 2021]* sono state confrontate tre tecniche di NGS: sequenziamento dell'amplicon 16S rRNA, metagenomica e metatrascrittomica. In tal modo oltre alla identificazione dei microrganismi è possibile studiare la loro espressione genica (biofilm, resistenze indotte, fattori patogenetici e di virulenza, ecc).

Obiettivo di tutte queste metodiche è quello di implementare la diagnosi di infezione articolare periprotesica, nonché ridurre il numero di campioni ed accorciare il TAT.

Un recentissimo studio di confronto *[Azad 2022]* tra una particolare PCR Broad range (Film-array in PCR Multiplex con panelli predefiniti) e il sequenziamento metagenomico mirato basato sul gene 16S rRNA (tMGS) su 60 campioni di liquidi sinoviali, ha dimostrato che la sensibilità del pannello Multiplex (riferito quindi ai germi inclusi nel pannello) era del 91%, e quella di tMGS era del 96%, quindi sovrapponibili. Tuttavia, quando venivano calcolate le sensibilità complessive, quella di tMGS era di gran lunga superiore (93%), in confronto al pannello della PCR Broad range (56%). Mentre la sensibilità clinica del pannello Multiplex, infatti, era eccellente per i microrganismi inclusi nel pannello, la sensibilità complessiva per la diagnosi di infezione periprotesica era bassa a causa dell'assenza di *Staphylococcus epidermidis* nel pannello.

L'uso delle tecniche molecolari, soprattutto di quelle di sequenziamento e metagenomiche, sta facendo passi da gigante; nell'ambito delle infezioni ostearticolari e protesiche bisognerà tenerne conto in un prossimo futuro, dove uno degli obiettivi è quello di sviluppare algoritmi specifici in grado definire quando, come e in quali casi applicare queste utili e promettenti metodiche. I campioni biologici sui quali sono state utilizzate le varie tecniche di biologia molecolare e/o di sequenziamento possono essere i liquidi sinoviali, gli eluati dopo sonicazione o DTT, gli omogenati tissutali, i tessuti perimplantari.

12. FASE POST-ANALITICA

12.1 REFERTAZIONE

Un'accurata diagnosi microbiologica di infezione associata a protesi articolari e mezzi di osteosintesi richiede una valutazione integrata dei risultati colturali ottenuti da campioni prelevati sia in fase preoperatoria che intraoperatoria. Questo approccio permette di associare un ruolo di potenziale agente eziologico anche a microrganismi isolati da un singolo campione di tessuto o dalle componenti protesiche in carica inferiore alle soglie ritenute significative per evidenza di infezione *[Caola 2013]*.

Cariche esigue dalle colture delle componenti protesiche possono essere osservate nel caso di pazienti che non hanno sospeso la terapia antibiotica prima dell'intervento o non hanno posticipato la profilassi intraoperatoria *[Portillo 2015]*. In questi casi le crescite vanno refertate e il ruolo dei microrganismi va valutato dal clinico.

La refertazione va eseguita con comunicazione tempestiva delle colture positive per microrganismi con potenziale significatività clinica, contestualmente all'ottenimento dell'identificazione e dell'antibiogramma del microrganismo isolato *[PHE 2016]*.

E' consigliabile eseguire una prima refertazione preliminare a 5 giorni dalla semina, segnalando che le colture sono ancora in corso e una seconda refertazione definitiva alla fine del periodo di incubazione.

12.2 TESSUTI PERIMPLANTARI E/O LIQUIDO ARTICOLARE E/O COMPONENTI PROTESICHE E/O MEZZI DI OSTEOSINTESI

Una o più colture intraoperatorie, associate ai parametri minori, o la combinazione di liquido articolare preoperatorio e colture intraoperatorie positive per lo stesso microrganismo e fenotipo possono essere considerate evidenza definitiva di infezione *[Osmon 2012, Caola 2012]*.

La crescita di un microrganismo virulento o patogeno stretto (es *S. aureus, P. aeruginosa, Enterobacteriaceae, batteri anaerobi*) in un singolo campione di biopsia tessutale o di liquido articolare può essere rappresentativa di infezione in accordo con il quadro clinico.

Il microrganismo isolato è ritenuto agente eziologico dell'infezione e deve essere refertato con antibiogramma *[Osmon 2012, Bemer 2016]*.

La crescita di un microrganismo potenzialmente contaminante (es stafilococchi coagulasi negativi, Cutibacterium spp) da un singolo campione di tessuto o da un singolo prelievo di liquido articolare non può essere di per sè indicativa dell'agente eziologico di infezione se non è supportato da altri parametri clinici (biomarkers e valutazione clinica del paziente). Il suo ruolo deve essere valutato dal clinico nel contesto delle altre evidenze disponibili (vd. definizione di infezione protesica) *[Osmon 2012]*.

Il microrganismo deve essere refertato con antibiogramma inserendo il commento: "*Possibile microrganismo contaminante: valutarne la significatività clinica*".

L'assenza di crescita da tutti i campioni di tessuto e/o liquido articolare deve essere refertata come: "*Assenza di crescita*".

12.3 SONICATO DELLA PROTESI/MEZZI DI OSTEOSINTESI

La definizione di infezione protesica secondo l'"International Consensus Meeting on Periprosthetic Joint Infection" non prevede, in maniera esplicita, l'allestimento delle colture delle componenti protesiche. Per l'interpretazione dei risultati colturali dalle componenti rimosse può essere considerato il criterio che prevede l'isolamento in carica significativa di un microrganismo dal fluido di sonicazione della protesi *[Trampuz 2007; Piper 2009; Corvec 2012b]*. Secondo i criteri proposti, la crescita

di un microrganismo in carica significativa (≥50CFU/mL di sonicato, oppure ≥200CFU/mL di sonicato concentrato) può essere considerata evidenza di infezione perimplantare *[Corvec 2012a; Corvec 2012b; Piper 2009]*. Il microrganismo è ritenuto agente eziologico dell'infezione e deve essere refertato con antibiogramma.

La crescita di un microrganismo in carica inferiore alle soglie o esclusivamente dall'arricchimento in brodo non può essere considerata di per sè indicativa dell'agente eziologico di infezione e pertanto deve essere valutata dal clinico nel contesto delle altre evidenze disponibili (vd. definizione di infezione protesica) *[Osmon 2012]* e di pregressa terapia antibiotica *[Portillo 2015]*.

Il microrganismo deve essere refertato con antibiogramma inserendo il commento: "*Possibile microrganismo contaminante: valutarne la significatività clinica*".

L'assenza di crescita dal liquido di sonicazione deve essere refertata come: "*Assenza di crescita*".

12.4 ELUATO DELLA PROTESI/MEZZI DI OSTEOSINTESI

La crescita di un microrganismo in carica significativa (≥50CFU/mL di eluito con DTT concentrato) può essere considerata evidenza di infezione perimplantare. Il microrganismo è ritenuto agente eziologico dell'infezione e deve essere refertato con antibiogramma *[Drago 2013]*.

La crescita di un microrganismo dall'eluato con DTT in carica inferiore alla soglia o esclusivamente dall'arricchimento in brodo non può essere considerata di per sé indicativa dell'agente eziologico di infezione e pertanto deve essere valutata dal clinico nel contesto delle altre evidenze disponibili (vd. definizione di infezione protesica) *[Osmon 2012]*.

Il microrganismo deve essere refertato con antibiogramma inserendo il commento: "*Possibile microrganismo contaminante: valutarne la significatività clinica*".

L'assenza di crescita dal liquido di eluizione con DTT deve essere refertata come: "*Assenza di crescita".*

NOTA: Le soglie indicate per l'interpretazione dei risultati delle semine quantitative di sonicato della protesi, sonicato concentrato e eluito concentrato riflettono i risultati riportati in letteratura e possono dare un'informazione qualitativa sul ruolo del microrganismo isolato quale agente eziologico di infezione. La differenza tra i valori delle soglie proposte per le diverse procedure è riconducibile alle differenti metodiche di rimozione del biofilm e deriva dall'interpretazione dei risultati sperimentali di diversi gruppi di ricerca *[Corvec 2012a, Corvec 2012b, Piper 2009, Drago 2013]*.

13. TEST DI LABORATORIO AGGIUNTIVI ALLE INDAGINI MICROBIOLOGICHE

Data la complessità del processo diagnostico delle infezioni delle protesi articolari, soprattutto nella fase pre-operatoria, negli ultimi anni sono stati compiuti notevoli sforzi per individuare parametri non strettamente microbiologici che possano essere di utilità per la diagnosi e che vanno ad affiancarsi all'esame microbiologico. In particolare, una crescente attenzione è stata posta sull'analisi del liquido articolare, la quale può costituire un valido supporto soprattutto in presenza di dati di difficile interpretazione. E' da sottolineare come alcuni di questi parametri per la rapidità e semplicità di esecuzione possano essere utilizzati anche in sede operatoria, concordando un percorso dedicato con il Laboratorio. I dati attualmente disponibili sono stati principalmente, se non esclusivamente, ricavati da studi su pazienti con diagnosi di infezione protesica e quindi il loro utilizzo in altri ambiti è attualmente sconsigliabile.

13.1 ESTERASI LEUCOCITARIA

L'esterasi leucocitaria è un enzima prodotto dai granulociti neutrofili in grado di degradare le proteine dei tessuti connettivali Una reazione positiva al test è indice della presenza di granulociti neutrofili nel liquido sinoviale dove vengono richiamati dal processo infettivo. E' un test di facile esecuzione e in grado di fornire una risposta in circa 20 minuti. Il test è condotto su strisce reattive colorimetriche come quelle utilizzate per l'esame urine. Gli studi eseguiti sul liquido sinoviale indicano una specificità e una sensibilità maggiori del 90% *[De Vecchi 2016b, Colvin 2015, Tishler 2014]* ed è l'unico ad essere stato inserito nelle procedure internazionali attualmente disponibili (Consensus Meeting di Philadelphia). Il campione deve essere prelevato in provette da siero contenenti gel separatore e centrifugato a 3000 g per 10 minuti. *[Aggarval 2013b, De Vecchi 2016b]*. Il test consiste nella deposizione di una goccia di surnatante sulla zona dedicata presente sulla striscia reattiva. Trattandosi di una reazione colorimetrica un'eccessiva contaminazione ematica potrebbe inficiare la lettura del risultato, pertanto è consigliabile valutare attentamente il risultato per questi campioni *[Aggarval 2013b]*.

13.2 ALFA-DEFENSINA

L'alfa-defensina è un peptide ad azione antimicrobica particolarmente abbondante nei neutrofili dove viene prodotto in risposta a uno stimolo infettivo. Negli ultimi anni sono stati pubblicati diversi studi sull'utilizzo di questo parametro nella diagnosi di infezioni protesiche. I dati di sensibilità e specificità riportati in letteratura indicano una elevata sensibilità e specificità comparabili con quelle dell'esterasi leucocitaria *[Wyatt 2016]*. Viene misurata per mezzo di un test ELISA che permette di ottenere una risposta in poche ore (circa 5). Il campione deve essere prelevato in provette senza aggiunta di additivi e centrifugato a 3000 g x 10 minuti prima del test. Il surnatante può anche essere conservato a -80° C nel caso non sia possibile eseguire immediatamente la determinazione. I maggiori costi e tempi di risposta, oltre al fatto che i campioni devono essere analizzati presso laboratori di riferimento rendono al momento il test utilizzabile nella fase pre-operatoria a completamento degli altri test. Deve essere inoltre sottolineato che al momento sono contrastanti le evidenze di letteratura in merito all'impiego dei "point of care" (test a saponetta). Le evidenze disponibili sono aumentate negli anni recenti, ma non si è ancora giunti ad una soluzione unanime sul suo utilizzo in quanto alcune Società scientifiche non lo hanno inserito nei cosiddetti criteri minori per la diagnosi di infezione protesica.

13.3 PROTEINA C REATTIVA (PCR)

La PCR ematica rappresenta un utile strumento di screening per monitorare l'infezione o la sua negativizzazione.

Il dosaggio della PCR nel liquido sinoviale ha dimostrato una maggiore specificità rispetto alla misurazione nel siero per la diagnosi di infezioni osteoarticolare (71-98%), pur mantenendo una buona sensibilità (85-87%) *[Deirmengian 2014; Tetreault 2014b, Omar 2015; De Vecchi 2016b]*. La misurazione può essere eseguita su campioni prelevati in provette con gel separatore e centrifugati a 3000 g per 10 minuti prima di essere caricati su analizzatori automatici per la biochimica e presenta un costo limitato e ridotti tempi di analisi. Inoltre la rapidità di esecuzione del test rende la determinazione della PCR sinoviale applicabile sia nella fase preoperatoria che intraoperatoria, in combinazione con la valutazione dell'esterasi leucocitaria. Deve comunque essere segnalato che i reattivi al momento disponibili non sono ancora stati approvati per questo uso dai produttori e quindi l'approccio, anche se ritenuto utile, è da considerarsi aggiuntivo ad altri parametri.

Un recente studio *[Wang 2021]* ha tuttavia stabilito i valori di cut-off per la PCR sierica e quella sinoviale (rispettivamente 10,2 mg/l e 7,26 mg/l) e ha sviluppato un modello predittivo per la diagnosi di infezione protesica. Sulla base dei campioni analizzati, gli autori concludono che la combinazione della PCR ematica e sinoviale può essere un buon biomarker aggiuntivo all'analisi microbiologica.

13.4 CONTA LEUCOCITARIA E DIFFERENZIALE NEL LIQUIDO SINOVIALE

L'esame può essere eseguito su analizzatori automatici per campioni raccolti in provette contenenti EDTA come anticoagulante. Presenta un costo contenuto ed è caratterizzato da una elevata sensibilità e specificità che dipendono strettamente dai valori di cut-off prescelti. Come già specificato precedentemente, l'International Consensus Meeting di Philadelphia ha definito un cut-off di 10000 leucociti/microlitro con almeno il 90% di neutrofili per le infezioni acute e 3000 leucociti /microlitro con almeno l' 80% di neutrofili per le infezioni croniche *[Parvizi 2011]*. Il maggior limite dell'analisi è rappresentato dalla possibile interferenza da parte di eventuale contaminazione ematica e dalla presenza di altre patologie osteoarticolari di natura infiammatoria. Nel primo caso, la misurazione può essere normalizzata se contemporaneamente viene eseguito un prelievo ematico per l'analisi emocromocitometrica.

I soggetti con artrite reumatoide presentano una conta leucocitaria più elevata rispetto ai soggetti non affetti da questa patologia: in questo caso i valori di cut-off devono essere normalizzati e aumentati.

Infine nel caso di impianti metallo-metallo è consigliabile eseguire la conta leucocitaria manualmente e non con analizzatori automatizzati poichè è stato osservato che i valori potrebbero essere alterati *[Yi 2015]*.

13.5 D-DIMERO

Il D-dimero è un prodotto di degradazione specifico del monomero di fibrina, dopo attivazione del fattore XIII, e successivamente idrolizzazione da parte delll'enzima fibrinolitico. Uno studio ha suggerito che il D-dimero potrebbe essere utilizzato per determinare la prognosi nella sepsi sistemica *[Rodello 2012]*. In tale studio si è visto che i livelli di D-dimero continuavano ad aumentare a causa della risposta infiammatoria dell'ospite all'infezione nella sepsi.

Attualmente, alcuni studi hanno esaminato il valore diagnostico del D-dimero nelle infezioni protesiche, trovando per lo più risultati variabili, e talvolta discordanti. Un recente metanalisi *[Wang 2022]* ha evidenziato che il D-dimero può avere un ruolo diagnostico ed essere utilizzato come biomarker di supporto alla diagnosi microbiologica. Tuttavia, occorre considerare che a tale riguardo c'è una scarsa numerosità di studi, che impiegano diversi tipi di campionamento o diversi metodi di riferimento di laboratorio, nonché pazienti di geograficità differenti. Sono quindi necessari ulteriori studi prospettici e multicentrici di grandi dimensioni per dare validità scientifica a questo parametro nella diagnosi delle infezioni osteoarticolari e protesiche.

14. BIBLIOGRAFIA

- Achermann Y. Microbiological diagnosis of implant associated infections. Proceedings of the 26th ECCMID, Amsterdam, 2016.
- Aggarwal VK, Higuera C, Deirmengian G, Parvizi J, Austin MS. Swab Cultures Are Not As Effective As Tissue Cultures for Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. Clin Orthop Relat Res. 2013; 471(10): 3196-203.
- Aggarwal VK, Tischler E, Ghanem E, Parvizi J. Leukocyte esterase from synovial fluid aspirate: a technical note. J Arthroplasty. 2013b;28:193-5.
- Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DW, Simpson H, Peto TE, McLardy-Smith P, Berendt AR. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. J Clin Microbiol. 1998;36(10):2932-9.
- Azad MA, Wolf MJ, Strasburg AP, Daniels ML, Starkey JC, Donadio AD, Abdel MP, Greenwood-Quaintance KE, Patel R. Comparison of the BioFire Joint Infection Panel to 16S Ribosomal RNA Gene-Based Targeted Metagenomic Sequencing for Testing Synovial Fluid from Patients with Knee Arthroplasty Failure. J Clin Microbiol. 2022 Nov 21:e0112622. doi: 10.1128/jcm.01126-22. PMID: 36409108.
- Becker K, Heilmann C, Peters G Coagulase negative staphylococci. Clin Microbiol Rev. 2014; 27:870–926.
- Bémer P, Léger J, Tandé D, Plouzeau C, Valentin AS, Jolivet-Gougeon A, et al.; Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest (CRIOGO) Study Team. How Many Samples and How Many Culture Media To Diagnose a Prosthetic Joint Infection: a Clinical and Microbiological Prospective Multicenter Study. J Clin Microbiol. 2016; 54(2): 385-91.
- Bémer P, Plouzeau C, Tande D, Léger J, Giraudeau B, Valentin AS, et al.; Centre de Référence des Infections Ostéo-articulaires du Grand Ouest (CRIOGO) Study Team. Evaluation of 16S rRNA gene PCR sensitivity and specificity for diagnosis of prosthetic joint infection: a prospective multicenter cross-sectional study. J Clin Microbiol. 2014; 52(10): 3583-9.
- Berbari E, Mabry T, Tsaras G, Spangehl M, Erwin PJ, Murad MH, Steckelberg J, Osmon D. Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. J Bone Joint Surg Am. 2010;92(11):2102-9.
- Bedenčič K, Kavčič M, Faganeli N, Mihalič R, Mavčič B, Dolenc J, Bajc Z, Trebše R. Does Preoperative Antimicrobial Prophylaxis Influence the Diagnostic Potential of Periprosthetic Tissues in Hip or Knee Infections? Clin Orthop Relat Res. 2016; 474(1): 258-64.
- Borde JP, Häcker GA, Guschl S, Serr A, Danner T, Hübner J, Burrack-Lange S, Lüdke G, Helwig P, Hauschild O, Kern WV. Diagnosis of prosthetic joint infections using UMD-Universal Kit and the automated multiplex-PCR Unyvero i60 ITI(®) cartridge system: a pilot study. Infection. 2015; 43(5): 551-60.
- Bozhkova S, Suardi V, Sharma HK, Tsuchiya H, del Sel H, Hafez HA, Benzakour T, Drago L, Romanò CL. The W.A.I.O.T. Definition of Peri-Prosthetic Joint Infection: A Multi-center, Retrospective Validation Study. J. Clin. Med. 2020, 9(6), 1965; https://doi.org/10.3390/jcm9061965.
- Buchholz H W, Elson R A, Engelbrecht E, Lodenkamper H, Rottger J, Siege A. Management of deep infection of to- tal hip replacement. J Bone Joint Surg (Br) 1981; 63: 342-53.
- Burnett RS, Aggarwal A, Givens SA, McClure JT, Morgan PM, Barrack RL. Prophylactic antibiotics do not affect cultures in the treatment of an infected TKA: a prospective trial. Clin Orthop Relat Res. 2010;468(1):127-134.
- Butler-Wu SM, Burns EM, Pottinger PS, Magaret AS, Rakeman JL, Matsen FA 3rd, Cookson BT. Optimization of periprosthetic culture for diagnosis of Propionibacterium acnes prosthetic joint infection. J Clin Microbiol. 2011;49(7):2490-5.
- Calori GM, Colombo M, Navone P, Nobile M, Auxilia F, Toscano M, Drago L.Comparative evaluation of MicroDTTect device and flocked swabs in the diagnosis of prosthetic and orthopaedic infections. Injury. 2016 Aug 1. pii: S0020-1383(16)30336-9. doi: 10.1016/j.injury.2016.07.040.
- Caola I, Tessarolo F, Piccoli F, Dorigotti P, Nollo G, Gaino M, Lanzafame P, Caciagli P. Infections associated to fracture fixation devices: usefulness of integrating information from different cultural methods. Proceedings of the 23rd ECCMID, Berlin, 2013.

- Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD et al. Rapid Molecular Microbiologic Diagnosis of Prosthetic Joint Infection. J Clin Microbiol. 2013; 51(7): 2280-7.
- Chen AF, Menz M, Cavanaugh PK, Parivizi J. Method of intraoperative tissue sampling for cuture has an effect on contamination risk. Knee Surg Sports Traumatol Arthroscop 2016. DOI 10.1007/s00167-016-4307-7.
- Colvin OC, Kransdorf MJ, Roberts CC, Chivers FS, Lorans R, Beauchamp CP, Schwartz AJ, leukocyte esterase analysis in the diagnosis of joint infection: can we make a diagnosis using a simple urine dipstick? Skeletal Radiol 2015; 44: 673-7.
- Corvec S, Loiez C, Portillo ME, Rottman M, Trampuz A.Bone and Joint infactions. In European manual of Clinical microbiology, 1st Ed. Edtors: Cornaglia G. Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Peigue-Lafeuille H, Vila J. 2012b, pp 227-34.
- Corvec S, Portillo ME, Pasticci BM, Borens O, Trampuz A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. Int J Artif Organs. 2012a Oct;35(10):923-34.
- Cuckler J M, Star A M, Alavi A, Noto RB. Diagnosis and management of the infected total joint arthroplasty. Orthop Clin North Am 1991; 22: 523-30.
- Davis JS, Metcalf S, Clark B, et al. Predictors of treatment success after periprosthetic joint infection: 24-month follow up from a multicenter prospective observational cohort study of 653 patients. Open Forum Infect Dis 2022;9:ofac048-ofac048.
- Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, Cameron A, Schiller K, Parvizi J. Combined measurement of synovial fluid α-Defensin and C-reactive protein levels: highly accurate for diagnosing periprosthetic joint infection. J Bone Joint Surg Am. 2014 Sep 3;96(17):1439-45.
- Del Pozo JL, Patel R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. N Engl J Med. 2009;361(8):787-94.
- De Vecchi E, Bortolin M, Signori V, Romanò CL, Drago L. Treatment With Dithiothreitol Improves Bacterial Recovery From Tissue Samples in Osteoarticular and Joint Infections. J Arthroplasty. 2016. pii: S0883-5403(16)30144-9.
- De Vecchi, Villa F, Bortolin M, Tacchini I, Romanò CL, Drago I. Leukocyte esterase, glucose, and C-reactive protein in the diagnosis of prostehtic joint infections: a prospective study. Clin Microbiol infect. 2016b;22:555-60
- Dinneen A, Guyot A, Clements J, Bradley N. Synovial fluid white cell and differential count in the diagnosis or exclusion of prosthetic joint infection. Bone Joint J. 2013 Apr;95-B(4):554-7.
- Drago, L. A Modern Approach to Biofilm-Related Orthopaedic Implant Infections: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health, 2017; Vol. 5. Cham: Springer International Publishing).
- Drago I, Cleric P, Morelli L, Ashok J, Benzakour T, Bozhkova S, Alizadeh C, Del Sel H, Sharma H K, Peel T, Mattina R, Romanò CL. The World Association against Infection in Orthopaedics and Trauma (WAIOT) procedures for Microbiological Sampling and Processing for Periprosthetic Joint Infections (PJIs) and other Implant-Related Infections. J. Clin. Med.2019,8, 933; doi:10.3390/jcm8070933.
- Drago L, De Vecchi E. Microbiological Diagnosis of Implant-Related Infections: Scientific Evidence and Cost/Benefit Analysis of Routine Antibiofilm Processing. Adv Exp Med Biol. 2016 Nov 5. doi: 10.1007/5584_2016_154.
- Drago L, De Vecchi E, Cappelletti L, Vassena C, Toscano M, Bortolin M, Mattina R, Romanò CL. Prolonging culture to 15 days improves bacterial detection in bone and joint infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015; 34(9): 1809-13.
- Drago L, Signori V, De Vecchi E. et al. Use of Dithiothreitol to improve the diagnosis of prosthetic joint infections. J Orthop Res. 2013..doi: 10.1002/jor.22423.
- Esteban J, Gómez-Barrena E. An update about molecular biology techniques to detect orthopaedic implant-related infections. EFORT Open Rev. 2021;6(2):93-100. doi:10.1302/2058-5241.6.20011.
- Font-Vizcarra L, García S, Martínez-Pastor JC, Sierra JM, Soriano A. Blood culture flasks for culturing synovial fluid in prosthetic joint infections. Clin Orthop Relat Res. 2010;468(8):2238-43.
- Gill RT., Joon Cha H., Jain A., Rao G., Bentley WE. Generating Controlled Reducing Environments in Aerobic Recombinant Escherichia coli Fermentations: Effects on Cell Growth, Oxygen Uptake, Heat Shock Protein Expression, and In Vivo CAT Activity. Biotechnology and Bioengineering. 1998; vol. 59, no. 2.

- Goswami K, Shope AJ, Tokarev V, et al. Comparative meta-omics for identifying pathogens associated with prosthetic joint infection. Sci Rep. 2021;11(1):23749. Published 2021 Dec 9. doi:10.1038/s41598-021-02505-7.
- Harris LG, El-Bouri K, Johnston S, Rees E, Frommelt L, Siemssen N, Christner M, Davies AP, Rohde H, Mack D. Rapid identification of staphylococci from prosthetic joint infections using MALDI-TOF mass-spectrometry. Int J Artif Organs. 2010;33(9):568-74.
- Hartley JC, Harris KA. Molecular techniques for diagnosing prosthetic joint infections. J Antimicrob Chemother. 2014; 69 Suppl 1: i21-4.
- Higgins E, Suh GA, Tande AJ. Enhancing Diagnostics in Orthopedic Infections. J Clin Microbiol. 2022 Mar 10; 388. doi:10.1128/jcm.02196-21.
- Holinka J, Bauer L, Hirschl AM, Graninger W, Windhager R, Presterl E. Sonication cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological diagnostics improve pathogen detection. J Orthop Res. 2011; 29(4): 617-22.
- Hughes JG, Vetter EA, Patel R, Schleck CD, Harmsen S, Turgeant LT, Cockerill FR 3rd. Culture with BACTEC Peds Plus/F bottle compared with conventional methods for detection of bacteria in synovial fluid. J Clin Microbiol. 2001;39(12):4468-71.
- Izakovicova P, Borens O, Trampuz A. Periprosthetic joint infection: current concepts and outlook. EFORT Open Rev. 2019; 337 2019;4(7):482-494. doi:10.1302/2058-5241.4.180092)
- Janz V, Wassilew GI, Hasart O, Tohtz S, Perka C. Improvement in the detection rate of PJI in total hip arthroplasty through multiple sonicate fluid cultures. J Orthop Res. 2013; 31(12): 2021-4.
- Janz V, Wassilew GI, Kribus M, Trampuz A, Perka C. Improved identification of polymicrobial infection in total knee arthroplasty through sonicate fluid cultures. Arch Orthop Trauma Surg. 2015; 135(10): 1453-7.
- Jordan RW, Smith NA, Saithna A, Sprowson AP, Foguet P. Sensitivities, specificities, and predictive values of microbiological culture techniques for the diagnosis of prosthetic joint infection. Biomed Res Int. 2014; 2014:180416.
- Kamineni S., Huang C. The antibacterial effect of sonication and its potential medical application. SICOT J. 2019; 5: 19. doi: 10.1051/sicotj/2019017.
- Karbyshevaa S, Cabricb S, Koliszaka A, Bervara M, Kirschbauma S, Hardta S, Perkaa C, Trampuza A. Clinical evaluation of dithiothreitol in comparison with sonication for biofilm dislodgement in the microbiological diagnosis of periprosthetic joint infection. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2022; 103; 115679.
- Maduka-Ezeh AN, Greenwood-Quaintance KE, Karau MJ, Berbari EF, Osmon DR, Hanssen AD, Steckelberg JM, Patel R. Antimicrobial susceptibility and biofilm formation of Staphylococcus epidermidis small colony variants associated with prosthetic joint infection. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;74(3):224-9.
- Melendez DP, Greenwood-Quaintance KE, Berbari EF, Osmon DR, Mandrekar JN, Hanssen AD, Patel R.Evaluation of a Genus- and Group-Specific Rapid PCR Assay Panel on Synovial Fluid for Diagnosis of Prosthetic Knee Infection. J Clin Microbiol. 2016; 54(1): 120-6.
- Minassian AM, Newnham R, Kalimeris E, Bejon P, Atkins BL, Bowler IC. Use of an automated blood culture system (BD BACTEC™) for diagnosis of prosthetic joint infections: easy and fast. BMC Infect Dis. 2014; 14: 233.
- Mikhael MM, Hanssen AD, Sierra RJ. Failure of metal-on-metal total hip arthroplasty mimicking hip infection. A report of two cases. J Bone Joint Surg Am. 2009;91(2):443-446.
- Monsen T., Lövgren E., Widerström M., Wallinder L. In Vitro Effect of Ultrasound on Bacteria and Suggested Protocol for Sonication and Diagnosis of Prosthetic Infections. J Clin Microbiol. Aug 2009; 47(8): 2496–2501.
- Moojen DJ, van Hellemondt G, Vogely HC, Burger BJ, Walenkamp GH, Tulp NJ, Schreurs BW, de Meulemeester FR, Schot CS, van de Pol I, Fujishiro T, Schouls LM, Bauer TW, Dhert WJ. Incidence of low-grade infection in aseptic loosening of total hip arthroplasty. Acta Orthop. 2010 Dec;81(6):667-73.
- Moran E, Byren I, Atkins BL.The diagnosis and management of prosthetic joint infections. J Antimicrob Chemother. 2010; 65 Suppl 3: iii45-54.Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2013; 56: 1-10.
- Morgenstern C, Cabric S, Perka C, Trampuz A, Renz N. Synovial fluid multiplex PCR is superior to culture for detection of low-virulent pathogens causing periprosthetic joint infection. Diagn Microbiol Infect Dis. 2018; 90(2):115-119. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.10.016.

- Newman JM, George J, Klika AK, Hatem SF, Barsoum WK, Trevor North W, Higuera CA. What is the Diagnostic Accuracy of Aspirations Performed on Hips With Antibiotic Cement Spacers? Clin Orthop Relat Res. 2016 Sep 26. [Epub ahead of print]
- Omar M, Ettinger M, Reichling M, Petri M, Guenther D, Gehrke T, Krettek C, Mommsen P. Synovial C-reactive protein as a marker for chronic periprosthetic infection in total hip arthroplasty. Bone Joint J. 2015 Feb;97-B(2):173-6.
- Parikh MS, Antony S. A comprehensive review of the diagnosis and management of prosthetic joint infections in the absence of positive cultures. J Infect Public Health. 2016. pii: S1876-0341(15)00220-8.
- Parvizi, J.; Gehrke, T. Proceedings of the Second International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection; Hip and Knee Section Data Trace Publishing Company: Brookland ville, MD, USA, 2018; ISBN 978-1-57400-157-0.Parvizi J, Ghanem E, Menashe S, Barrack RL, Bauer TW. Periprosthetic infection: what are the diagnostic challenges? J Bone Joint Surg Am. 2006;88(Suppl 4):138–147.
- Parvizi J, Zmistowski B, Berbari EF et al. New definition for periprosthetic joint infection. Clin Orthop Relat Res. 2011; 469: 2992-4.
- Parvizi J, Jacovides C, Antoci V, Ghanem E. Diagnosis of periprosthetic joint infection: the utility of a simple yet unappreciated enzyme. J Bone Joint Surg Am. 2011b;93:2242-8.
- Peel TN, Cole NC, Dylla BL, Patel R. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry and diagnostic testing for prosthetic joint infection in the clinical microbiology laboratory. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015; 81(3): 163-8.
- Peel TN, Dylla BL, Hughes JG, Lynch DT, Greenwood-Quaintance KE, Cheng AC, Mandrekar JN, Patel R. Improved Diagnosis of Prosthetic Joint Infection by Culturing Periprosthetic Tissue Specimens in Blood Culture Bottles. MBio. 2016b ; 7(1): e01776-15.
- Peel TN, Spelman T, Dylla BL, Hughes JG, Greenwood-Quaintance KE, Cheng AC, Mandrekar JN, Patel R. Optimal Periprosthetic Tissue Specimen Number for Diagnosis of Prosthetic Joint Infection. J Clin Microbiol. 2016a Dec 28;55(1):234-243.
- Piper KE, Jacobson MJ, Cofield RH, Sperling JW, Sanchez-Sotelo J, Osmon DR, McDowell A, Patrick S, Steckelberg JM, Mandrekar JN, Fernandez Sampedro M, Patel R. Microbiologic diagnosis of prosthetic shoulder infection by use of implant sonication. J Clin Microbiol. 2009;47(6):1878-84.
- PHE 2016 Public Health England. (2016). Investigation of Orthopaedic implant associated infections. UK Standards for Microbiology Investigations. B 44 Emissione n°2 del 23 febbraio 2016. https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/504319/B_44i2.pdf
- Portillo ME, Salvadó M, Alier A, Martínez S, Sorli L, Horcajada JP, Puig L. Advantages of sonication fluid culture for the diagnosis of prosthetic joint infection. J Infect. 2014; 69(1): 35-41.
- Portillo ME, Salvadó M, Trampuz A, Siverio A, Alier A, Sorli L, Martínez S, Pérez-Prieto D, Horcajada JP, Puig-Verdie L. Improved diagnosis of orthopedic implant-associated infection by inoculation of sonication fluid into blood culture bottles. J Clin Microbiol. 2015; 53(5): 1622-7.
- Redanz S, Podbielski A, Warnke P. Improved microbiological diagnostic due to utilization of a high-throughput homogenizer for routine tissue processing. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015 Jul;82(3):189-93.
- 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(4): 448-53.
- Rodelo JR, De la Rosa G, Valencia ML, Ospina S, Arango CM, Gomez CI, et al. D-dimer is a significant prognostic factor in patients with suspected infection and sepsis. Am J Emerg Med. 2012;30(9):1991-9.
- Romanò CL, Romanò D, Morelli I, Drago L. The concept of biofilm-related implant malfunction and "Low-Grade Infection". Adv Exp Med Biol. 2016 doi: 10.1007/5584_2016_158.
- Romanò CL, Al Khawashki H, Benzakour T, Bozhkova S, del Sel H, Hafez M, Johar A, Lob G, Sharma HK, Tsuchiya H, Drago L. The W.A.I.O.T. Definition of High-Grade and Low-Grade Peri-Prosthetic Joint Infection. J. Clin. Med. 2019, 8(5), 650; https://doi.org/10.3390/jcm8050650)
- Roux AL, Sivadon-Tardy V, Bauer T, Lortat-Jacob A, Herrmann JL, Gaillard JL, Rottman M. Diagnosis of prosthetic joint infection by beadmill processing of a periprosthetic specimen. Clin Microbiol Infect. 2011; 17(3): 447-50.
- Sambri A, Cadossi M, Giannini S, Pignatti G, Marcacci M, Neri MP, Maso A, Storni E, Gamberini S, Naldi S, Torri T, Zannoli S, Tassinari M, Fantini M, Bianchi G, Donati D, Sambri V. Is Treatment With Dithiothreitol More

Effective Than Sonication for the Diagnosis of Prosthetic Joint Infection? Clin Orthop Relat Res. 2018 Jan; 476(1): 137–145.

- Sanabria AM, Janice J, Hjerde E, Simonsen GS, Hanssen AM. Shotgun-metagenomics based prediction of antibiotic resistance and virulence determinants in Staphylococcus aureus from periprosthetic tissue on blood culture bottles. Sci Rep. 2021;11(1):20848. Published 2021 Oct 21. doi:10.1038/s41598-021-00383-7.
- Schäfer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. Clin Infect Dis. 2008;47(11):1403-9.
- Schinsky MF, Della Valle CJ, Sporer SM, Paprosky WG. Perioperative testing for joint infection in patients undergoing revision total hip arthroplasty. J Bone Joint Surg Am. 2008;90:1869–1875.
- Schwotzer N, Wahl P, Fracheboud D, Gautier E, Chuard C. Optimal culture incubation time in orthopedic device-associated infections: a retrospective analysis of prolonged 14-day incubation. J Clin Microbiol. 2014; 52(1): 61-6.
- Sendi P, Frei R, Maurer TB, Trampuz A, Zimmerli W, Graber P. Escherichia coli variants in periprosthetic joint infection: diagnostic challenges with sessile bacteria and sonication. J Clin Microbiol. 2010 May;48(5):1720-5.
- Shahi A, Deirmengian C, Higuera C, Chen A, Restrepo C, Zmistowski B, Parvizi J. Premature Therapeutic Antimicrobial Treatments Can Compromise the Diagnosis of Late Periprosthetic Joint Infection. Clin Orthop Relat Res. 2015; 473(7): 2244-9.
- Shen H, Tang J, Wang Q, Jiang Y, Zhang X. Sonication of explanted prosthesis combined with incubation in BD bactec bottles for pathogen-based diagnosis of prosthetic joint infection. J Clin Microbiol. 2015; 53(3): 777-81.
- Stefánsdóttir A, Johansson D, Knutson K, Lidgren L, Robertsson O. Microbiology of the infected knee arthroplasty: report from the Swedish Knee Arthroplasty Register on 426 surgically revised cases. Scand J Infect Dis. 2009;41(11-12):831-40.
- Tetreault MW, Wetters NG, Aggarwal V, Mont M, Parvizi J, Della Valle CJ. The Chitranjan Ranawat Award: Should Prophylactic Antibiotics Be Withheld Before Revision Surgery to Obtain Appropriate Cultures? Clin Orthop Relat Res. 2014;472:52-6.
- Tetreault MW, Wetters NG, Moric M, Gross CE, Della Valle CJ. Is synovial C-reactive protein a useful marker for periprosthetic joint infection? Clin Orthop Relat Res. 2014b Dec;472(12):3997-4003.
- Tischler EH, Cavanaugh Pk, Parvizi J. Leukocyte esterase strip test: matched for musculoskeletal infection society criteria. J Bone Joint Surg Am2014; 96:1917-20.
- Tsikopoulos K, Ilias Christoflos S, Kitridis D, Sidiropoulos K, Stoikos PN, Gravalidis C, Givissis P, Papaioannidou P. Is sonication superior to dithiothreitol in diagnosis of periprosthetic joint infections? A meta-analysis. International Orthopaedics. 2022; 46:1215–1224).
- Trampuz A, Hanssen AD, Osmon DR, Mandrekar J, Steckelberg JM, Patel R. Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. Am J Med. 2004;117(8):556-62.
- Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, Mandrekar JN, Cockerill FR, Steckelberg JM, Greenleaf JF, Patel R. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. N Engl J Med. 2007 16;357(7):654-63.
- Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. Injury, Int. J. Care Injured. 2006;37:S59-S66
- Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. Swiss Med Wkly. 2005;135(17-18):243-51.
- Tsaras G, Maduka-Ezeh A, Inwards CY, Mabry T, Erwin PJ, Murad MH, Montori VM, West CP, Osmon DR, Berbari EF. Utility of intraoperative frozen section histopathology in the diagnosis of periprosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. J Bone Joint Surg Am. 2012;94(18):1700-11.
- Uzun E, Misir A, Ozcamdalli M, Kizkapan EE, Cirakli A, Calgin AK. Time-dependent surgical instrument contamination begins earlier in the uncovered table than in the covered table. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy. 2020; 28:1774–1779, https://doi.org/10.1007/s00167-019-05607-y.Vandercam B, Jeumont S, Cornu O, et al. Amplification-based DNA analysis in the diagnosis of prosthetic joint infection. J Mol Diagn. 2008;10(6):537-543. doi:10.2353/jmoldx.2008.070137.
- Velay A, Schramm F, Gaudias J, Jaulhac B, Riegel P. Culture with BACTEC Peds Plus bottle compared with conventional media for the detection of bacteria in tissue samples from orthopedic surgery. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; 68(1): 83-5.

- Wang H, Qin L, Wang J, Hu N, Huang W. Combined serum and synovial C-reactive protein tests: a valuable adjunct to the diagnosis of chronic prosthetic joint infection. BMC Musculoskeletal Disorders. 2021; 22: 670.
- Wang R, Zhang H, Ding P, Jiao Q. The accuracy of D-dimer in the diagnosis of periprosthetic infections: a systematic review and meta-analysis. Journal of Orthopaedic Surgery and Research. 2022; volume 17: 99.
- Wildeman P, Rolfson O, Söderquist B, Wretenberg P, Lindgren V. (2021). What Are the Long-term Outcomes of Mortality, Quality of Life, and Hip Function after Prosthetic Joint Infection of the Hip? A 10-year Follow-up from Sweden. Clin Orthop Relat Res. Oct 1;479(10):2203-2213.
- Wildeman P, Tevell S, Eriksson C, Lagos AC, Söderquist B, Stenmark B. Genomic characterization and outcome of prosthetic joint infections caused by Staphylococcus aureus. Sci Rep. 2020;10(1):5938. Published 2020 Apr 3. doi:10.1038/s41598-020-62751-426 z 427.
- Wyatt MC, Beswick AD, Kunutsor SK, Wilson MJ, Whitehouse MR, Blom AW. The Alpha-Defensin Immunoassay and Leukocyte Esterase Colorimetric Strip Test for the Diagnosis of Periprosthetic Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Bone Joint Surg Am. 2016 Jun 15;98(12):992-1000.
- Wouthuyzen-Bakker M, Sebillotte M, Huotari K, et al. Lower success rate of debridement and implant retention in late acute versus early acute periprosthetic joint infection caused by Staphylococcus spp. Results from a matched cohort study. Clin Orthop Relat Res 2020;478:1348-1355.
- Yano MH, Klautau GB, da Silva CB, Nigro S, Avanzi O, Mercadante MT, Salles MJ. Improved diagnosis of infection associated with osteosynthesis by use of sonication of fracture fixation implants. J Clin Microbiol. 2014; 52(12): 4176-82.
- Yi PH, Cross MB, Moric M, Levine BR, Sporer SM, Paprosky WG, Jacobs JJ, Della Valle CJ. Do serologic and synovial tests help diagnose infection in revision hip arthroplasty with metal-on-metal bearings or corrosion? Clin Orthop Relat Res. 2015 Feb;473(2):498-505.
- Zegaer BH, Ioannidis A, Babis GC, Ioannidou V, Kossyvakis A, Bersimis S, Papaparaskevas J, Petinaki E, Pliatsika P, Chatzipanagiotou S. Detection of Bacteria Bearing Resistant Biofilm Forms, by Using the Universal and Specific PCR is Still Unhelpful in the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infections. Front Med (Lausanne). 2014;1: 30.
- (Zimmerli W, Sendi P. Pathogenesis of implant-associated infection: the role of the host. https://doi.org/10.1007/s00281-011-0275-7. Semin Immunopathol. 2011; 33:295–306.).
- Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. N Engl J Med. 2004;351(16):1645-54.
- Zmistowski B, Della Valle C, Bauer TW, Malizos KN, Alavi A, Bedair H et al. Diagnosis of periprosthetic joint infection. J Orthop Res. 2014 Jan;32 Suppl 1:S98-107.

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

Tabella 1 - Comparazione dei principali criteri diagnostici di infezione protesica pubblicati dal 2011 al 2018 (Estratto dalla Società Internazionale WAIOT, *[Romanò 2019]*.

Tipologia di Definizione	MSIS 2011	IDSA 2013	ICM 2013	ICM 2018	EBJIS 2018
Scoring system	1 dei 2 criteri maggiori **OPPURE** ≥4 dei 6 Criteri minori *	≥1 Criteri Positivi*	1 dei 2 criteri maggiori **OPPURE** ≥3 dei 5 criteri Minori*	1 dei 2 criteri maggiori **OPPURE** Uno score dei criteri minori ≥6 (Infezione) - 3–5 criteri minori Possibile infezione, (valutare ulteriori analisi molecolari, ad esempio la next-generation sequencing) <3 Non infetto*	≥1 Criteri Positivi
	* "L'infezione può essere presente anche con meno di 4 criteri"	* "La presenza di infezione è possibile anche se i criteri di cui sopra non vengono soddisfatti (…)"	* "La presenza di infezione è possibile anche se non vengono soddisfatti questi criteri (…)."	*"Procedere con cautela in caso di: reazione tissutale locale avversa, malattia da deposito di cristalli, microrganismi a crescita lenta"	
Criterio	Maggiore: 1. Sinus tract comunicante con la protesi; 2. Un patogeno isolato da una coltura da almeno due differenti campioni o fluidi Minore: a. VES (>30 mm/hr) e PCR (>10 mg/L) elevata b. Conta leucocitaria elevata nel liquido sinoviale c. % PMN elevata d. Presenza di pus e. Isolamento di un solo microrganismo	1. Sinus tract comunicante con la protesi 2. Presenza di materiale purulento attorno alla protesi 3. Infiammazione acuta attraverso l'esame istopatologico 4. ≥ 2 colture intraoperatorie positive o la combinazione di positività tra l'aspirato preoperatorio e la coltura intraoperatoria [La crescita anche di un solo microrganismo	Maggiore 1. Sinus tract comunicante con la protesi 2. Due campioni positivi con lo stesso fenotipo microbico Minore: a. VES (>30 mm/hr) e PCR (>100 mg/L per le infezioni acute; PCR >10 mg/L per le croniche **b.** Conta globuli bianchi elevata nel liquido sinoviale (>10,000 cellule/mL per le infezioni acute; >3,000 cellule/mL per le	Maggiore: 1. Sinus tract comunicante con la protesi o visualizzazione della protesi 2. Due campioni positivi con lo stesso microrganismo dopo analisi microbiologiche standard Minore: a. PCR elevata (>100 mg/L per le infezioni acute; >10 mg/L per le croniche) **OPPURE** D-Dimero (da definire il cut-off per le acute; >860 ug/L per le croniche)	1. Presenza di pus attorno la protesi o sinus tract 2. Aumento della conta leucocitaria sinoviale (>2,000 cellule/mL or >70 % granulociti) 3. Istologia positiva 4. Crescita microbica nel liquido sinoviale, nei tessuti perirpotesici, o nel fluido di sonicazione ("Conferma di crescita microbica nel tessuto periprotesico se: positivo in ≥1 campioni con batteri ad elevata virulenza, oppure in ≥ 2 con batteri di bassa virulenza; la sonicazione è considerata positiva con >50 UFC/mL di fluido di

Tipologia di Definizione	MSIS 2011	IDSA 2013	ICM 2013	ICM 2018	EBJIS 2018
	in una sola cultura f. Più di 5 neutrofili per campo microscopico in 5 differenti campi istologici a 400X	virulento, ad esempio *Staphylococcus aureus* o altro, in un singolo campione bioptico o di fluido è considerato fortemente suggestivo di infezione]	croniche, **OPPURE** ++ nel strip-test dell'esterasi leucocitaria c. % PMN elevati (>90% per le infezioni acute; >80% per le croniche) d. Positività analisi istologica dei tessuti periprotesici (> 5 neutrofili per campo in 5 differenti campi microscopici a 400X) e. Una singola coltura positiva	(score assegnato 2) b. VES elevata (nessun probabile ruolo nelle infezioni acute; >30 mm/hr per le acute) (score assegnato 1) c. Conta globuli bianchi elevata (>10,000 cellule/mL per le infezioni acute; >3,000 cellule/mL per le croniche) **OPPURE** Esterasi leucocitaria strip-test ++ for le acute o le croniche) **OPPURE** Positività all'alpa-difensina (score assegnato 3) d. % PMN sinoviali elevata (>90% per le infezioni acute; >70% per le croniche) (score assegnato 2) e. Singola coltura positiva (score assegnato 2) f. Istologia positiva (score assegnato 3) g. Presenza di pus intraoperatorio (score assegnato 3)	sonicazione.")

Tabella 2 - Test pre e intraoperatori sulla base della loro sensibilità e specificità utilizzati per escludere o confermare una infezione protesica (tra parentesi i relativi cut-off considerati nella presente classificazione).

	Test di Esclusione (Sensibilità > 90%) **CIASCUN TEST NEGATIVO: Score assegnato −1** **(Test di esclusione Positivo: Score assegnato 0)**
Siero	VES (>30 mm/h) PCR (>10 mg/L)
Liquido sinoviale	Globuli Bianchi (>1,500/µL) Esterasi leucocitaria (++) Alpha-Defensina immunoassay (>5.2 mg/L)
Imaging	Tc99 bone scan
	Test di Inclusione (Specificity > 90%) **CIASCUN TEST POSITIVO: Score assegnato +1** **(Test di Inclusione negative: Score assegnato 0)**
Valutazione Clinica	Presenza di pus, sinus tract, protesi esposta e visibile
Siero	IL-6 (>10 pg/mL) Procalcitonina (>0.5 ng/mL) D-Dimero (>850 ng/mL)
Liquido sinoviale	Esame colturale Globuli bianchi (>3,000/mL) Esterasi leucocitaria (++) Alpha-Defensina immunoassay (>5.2 mg/L), **oppure** lateral flow test
Imaging	Scintigrafia combinata leucociti e midollo
Histology	Istologia "Frozen section" (5 neutrofili in almeno 5 campi microscopici)

Tabella 3 - Definizione di infezione protesica secondo i criteri WAIOT.

	Nessuna Infezione	Contaminazione	BIM	LG-PJI	HG-PJI
Valutazione Clinica	Una o più condizioni, diverse dall'infezione, in grado di causare i sintomi o il motivo del reintervento (ad esempio, detriti da usura, metallosi, lussazione ricorrente o instabilità articolare, frattura, malposizionamento, dolore neuropatico)		Uno o più dei seguenti sintomi altrimenti "inspiegabili": dolore, gonfiore, rigidità		Due o più dei seguenti sintomi: dolore, gonfiore, arrossamento, calore, *functio laesa*
# Test di Inclusione positivi meno # Test di Esclusione negativi	**<0**	**<0**	**<0**	**≥0**	**≥1**
Confermato se nel post-operatorio è presente:	Un esame colturale negativo	Un esame positivo nella fase pre- o intra-operatoria, ma istologia negativa	Un esame colturale positivo (preferibilmente eseguito con tecniche anti-biofilm) e/o istologia positiva		

Abbreviazioni: BIM: Biofilm-related Implant malfunction; LG-PJI: Low-Grade Peri-Prosthetic Joint Infection; HG-PJI: High-Grade Peri-Prosthetic Joint Infection.

Tabella 4: microrganismi isolati nelle infezioni della protesi articolare *[Trampuz 2005; Stefansdottir 2009; Moran 2010; Corvec 2012b]* **e dei mezzi di osteosintesi** *[Trampuz 2006]*

Microrganismi	**Frequenza %**	
	Protesi articolari	**Mezzi di osteosintesi**
Stafilococchi coagulasi negative	30-43	22
Staphylococcus aureus	12-23	30
Streptococchi	9-10	1
Enterococchi	3-7	3
Bacilli Gram-negativi	10-17	10
Anaerobi	2-4	5
Candida spp.	1-3	-
Polimicrobiche	10-20	27
Sconosciuto	10-30	2

LIQUIDO ARTICOLARE
OPZIONE 1

PRELIEVO
a capsula chiusa mediante siringa

Aliquotare in contenitore sterile con o senza anticoagulante e in contenitore con EDTA

Inoculare aliquote ≥1ml in fiasche da emocoltura per microorganismi aerobi e anaerobi

Inviare rapidamente in Microbiologia

NO →

CONSERVARE
- aliquota in contenitore sterile a +4°C
- fiasche inoculate a temperatura ambiente per max 48 ore

SI

Centrifugare l'aliquota di liquido articolare raccolta in provetta a 3000 g per 10 min. Eliminare il surnatante e riportare il sedimento a un volume di 0,5-1 ml con soluzione fisiologica sterile

SI

COLTURA E INCUBAZIONE

Inoculare 0,1 ml in:
- Agar sangue e agar cioccolato. Incubare in atmosfera con 5% CO_2 per 5 gg a 36±1+°C
- Agar Schädler. Incubare in anaerobiosi per 7-10 gg a 36±1+°C

Incubare le fiasche da emocoltura in strumentazione dedicata per aerobi (7 gg) e anaerobi (14 gg)

COLORAZIONE di GRAM
Allestire vetrino dal sedimento, colorare ed osservare al microscopio

Crescita di microorganismi?

SI
Refertare con antibiogramma

NO
Refertare : «assenza di crescita»

Presenza di microorganismi con caratteristiche morfologico/tintoriali compatibili con coltura?

SI
Refertare con descrizione morfologico/tintoriale

NO
Refertare : «assenza microorganismi»

LIQUIDO ARTICOLARE
OPZIONE 2

PRELIEVO
a capsula chiusa mediante siringa

Aliquotare in contenitori sterili
con o senza anticoagulante e in contenitori in EDTA

Inviare rapidamente
un'aliquota in Microbiologia

NO → **CONSERVARE**
aliquota in contenitore
sterile a +4°C

SI ↓

Centrifugare il campione a 3000 g per 10 min. Eliminare il surnatante e riportare il sedimento a un volume di 0,5-1 ml con soluzione fisiologica sterile

SI

COLTURA E INCUBAZIONE

Inoculare 0,1 ml in:

- Agar sangue e agar cioccolato. Incubare in atmosfera con 5% CO_2 per 5 gg a 36±1+°C
- Agar Schädler. Incubare in anaerobiosi per 7-10 gg a 36±1+°C
- Brodo per aerobi/anaerobi esigenti. Incubare per 14 gg a 36±1+°C

Subcoltivare in agar sangue, cioccolato e Schädler, se il brodo è torbido o a fine incubazione

COLORAZIONE di GRAM
Allestire vetrino dal sedimento, colorare ed osservare al microscopio

Crescita di microorganismi?

SI
Refertare con antibiogramma

NO
Refertare :
«ssenza di crescita»

Presenza di microorganismi con caratteristiche morfologico/tintoriali compatibili con coltura?

SI
Refertare con descrizione morfologico/ tintoriale

NO
Refertare :
«assenza microorganismi»

TESSUTI PERIMPLANTARI OPZIONE 1

PRELIEVO

Prelevare un numero ≥ 3 e ≤6 di biopsie perimplantari . Nel caso di protesi articolari includere campioni prelevati dall'interfaccia protesi-osso, dalla capsula articolare e da eventuali aree con segni di infiammazione. Nel caso di mezzi di osteosintesi prelevare campioni di tessuto perimplantare e di eventuali aree con segni di infiammazione. Prelevare ogni singola biopsia preferibilmente con strumentazione separata, inserendola in un contenitore sterile, dedicato.

Inviare rapidamente in Microbiologia

NO →

CONSERVARE

In contenitore sterile a +4°C. Aggiungere qualche goccia di soluzione fisiologica sterile ai campioni di dimensioni ridotte

SI

ELUIZIONE CON DITIOTRITOLO (DTT) oppure OMOGENIZZAZIONE

Eluire con soluzione fisiologica sterile 0,1% (w/v) di DTT oppure omogeneizzare in 3 ml di brodo (es. Brain Heart Infusion broth)

↓

COLTURA E INCUBAZIONE

Inoculare 0,5 ml di eluito/omogenato in:

- Agar sangue e agar cioccolato. Incubare in atmosfera con 5% CO_2 per 5 gg a 36±1+°C
- Agar Schädler. Incubare in anaerobiosi per 7-10 gg a 36±1+°C
- Brodo per aerobi/anaerobi esigenti. Incubare per 14 gg a 36±1+°C. Subcoltivare in agar sangue, cioccolato e Schädler, se il brodo è torbido o a fine incubazione

↓

Crescita di microrganismi?

NO → **Refertare : «assenza di crescita»**

SI

Crescita dello stesso microrganismo in almeno 2 campioni (tessuto e/o liquido articolare e/o componente protesica) OPPURE crescita di microrganismo virulento (es. *S.aureus*)

↓

Refertare con antibiogramma

SI

Crescita di microrganismi non virulenti in un solo campione

↓

Refertare con antibiogramma e commento: «Possibile microrganismo contaminante: valutarne la significatività clinica»

TESSUTI PERIMPLANTARI OPZIONE 2

PRELIEVO

Prelevare un numero ≥ 3 e ≤6 di biopsie perimplantari . Nel caso di protesi articolari includere campioni prelevati dalla interfaccia protesi-osso, dalla capsula articolare e da eventuali aree con segni di infiammazione. Nel caso di mezzi di osteosintesi prelevare campioni di tessuto perimplantare e di eventuali aree con segni di infiammazione. Prelevare ogni singola biopsia preferibilmente con strumentazione separata, inserendola in un contenitore sterile, dedicato.

↓

Inviare rapidamente in Microbiologia

NO → **CONSERVARE**
In contenitore sterile a +4°C. aggiungere qualche goccia di soluzione fisiologica sterile ai campioni di dimensioni ridotte

SI ↓

OMOGENIZZAZIONE

in 5 ml di brodo (es. Brain Heart Infusion broth)

↓

COLTURA E INCUBAZIONE

Inoculare 0,1 ml omogenato in:

- Agar sangue e agar cioccolato. Incubare in atmosfera con 5% CO_2 per 5 gg a 36±1+°C
- Agar Schädler. Incubare in anaerobiosi per 7-10 gg a 36±1+°C

Inoculare ≥ 1 ml di omogenato in fiasche da emocoltura per aerobi ed anaerobi. Incubare in strumentazione dedicata per 7 gg (aerobi) e per 14 gg (anaerobi)

↓

Crescita di microrganismi?

NO → **Refertare : «assenza di crescita»**

SI → **Crescita dello stesso microrganismo in almeno 2 campioni (tessuto e/o liquido articolare e/o componente protesica) OPPURE crescita di microrganismo virulento (es. *S.aureus*)**

↓

Refertare con antibiogramma

SI → **Crescita di microrganismi non virulenti in un solo campione**

↓

Refertare con antibiogramma. Commento: «Possibile microrganismo contaminante: valutarne la significatività clinica»

COMPONENTI PROTESICHE E MEZZI DI OSTEOSINTESI - OPZIONE 1

PRELIEVO

Porre ogni singola componente protesica, o i mezzi di osteosintesi in contenitori non perforabili, sterili, a tenuta, di idonee dimensioni

→ **Inviare rapidamente in Microbiologia**

— **NO** → **CONSERVARE**
In contenitore sterile a +4°C.

SI

SONICAZIONE

Aggiungere nel contenitore con protesi o mezzi di osteosintesi soluzione di Ringer o fisiologica sterile fino a coprire almeno il 90 % del volume della componente rimossa → Chiudere il contenitore, ermeticamente.→ Vortexare il contenitore con la componente per 30 sec. → Sonicare a 30-40 KHz 0,22±0,04 W/cm^2 per 5 min.→ Vortexare per 30 secondi.

COLTURA E INCUBAZIONE

Inoculare 0,5 ml di sonicato in:
- Agar sangue o cioccolato. Incubare in atmosfera con 5% CO_2 per 5 gg a 36±1°C
- Agar Schädler. Incubare in anaerobiosi per 7-10 gg a 36±1°C
- Brodo per aerobi/anaerobi esigenti. Incubare per 14 gg a 36±1°C. Subcoltivare in terreni solidi se il brodo è torbido o a fine incubazione

<u>In alternativa all'inoculo in brodo</u>
Dispensare 10 ml di sonicato in flaconi da emocoltura per aerobi e anaerobi. Incubare in strumentazione dedicata per 7 gg (aerobi) e 14 gg (anaerobi).

OPPURE

Concentrare il sonicato (100:1) mediante centrifugazione a 3000 g per 10 min
Inoculare 0,1ml del sonicato concentrato in:
- Agar sangue e cioccolato. Incubare in atmosfera con 5% CO_2 per 5 gg a 36±1°C
- Agar Schaedler. Incubare in anaerobiosi per 7-10 gg a 36±1°C
- Brodo per aerobi/anaerobi esigent. Incubare per 14 gg a 36±1°C. Subcoltivare in terreni solidi se il brodo diventa torbido o a fine incubazione.

<u>In alternativa all'inoculo in brodo</u>
0.5 ml del sonicato concentrato in flaconi da emocoltura per aerobi e anaerobi. Incubare in strumentazione dedicata per 7 gg (aerobi) e 14 gg (anaerobi)

Crescita di microorganismi?

— **NO** → **Refertare : «assenza di crescita»**

SI → **Crescita ≥ 50 CFU/ml dello stesso microrganismo da sonicato OPPURE Crescita≥200 CFU/ml dello stesso microrganismo da sonicato concentrato? OPPURE Crescita dal sonicato inferiore alle soglie e riscontro dello stesso in uno o più campioni di liquido articolare/tessuto**

→ **Refertare con antibiogramma**

SI → **Crescita di microrganismi in quantità inferiore alle soglie o dall'arricchimento in brodo e non riscontrati in colture di altri campioni**

→ **Refertare con antibiogramma. Commento: «Possibile microrganismo contaminante: valutarne la significatività clinica»**

COMPONENTI PROTESICHE E MEZZI DI OSTEOSINTESI - OPZIONE 2

PRELIEVO

Porre ogni singola componente protesica, o i mezzi di osteosintesi in contenitori non perforabili, sterili, a tenuta, di idonee dimensioni

→ **Inviare rapidamente in Microbiologia**

→ **NO** → **CONSERVARE**
In contenitore sterile a +4°C.

SI ↓

ELUIZIONE CON DTT

- Allestire una soluzione sterile 0,1% (w:v) di DTT, (formula empirica $C_4H_{10}O_2S_2$, peso molecolare: 154.2) in PBS
- Aprire il contenitore della componente protesica (o mezzo di osteosintesi) sotto cappa a flusso laminare
- Aggiungere soluzione sterile di DTT al campione fino a coprirlo e richiudere il contenitore
- Porre il contenitore su agitatore orbitale a circa 80 rpm per 15 min

CONCENTRAZIONE

Concentrare l'eluito 100:1 mediante centrifugazione a 3000 rpm per 10 min

COLTURA E INCUBAZIONE

Inoculare aliquote di 0,1 ml di sonicato in:

- Agar sangue e cioccolato. Incubare in atmosfera con 5% CO_2 per 5 gg a 36±1°C
- Agar Schädler. Incubare in anaerobiosi per 7-10 gg a 36±1°C
- Brodo per aerobi/anaerobi esigenti. Incubare per 14 gg a 36±1°C. Subcoltivare in terreni solidi se il brodo è torbido o a fine incubazione.

↓

Crescita di microorganismi? → **NO** → **Refertare : «assenza di crescita»**

SI ↓

Crescita ≥ 50 CFU/ml dello stesso microrganismo da eluito OPPURE crescita < 50 CFU/ml di eluito e riscontro dello stesso microrganismo in uno o più campioni di liquido articolare/tessuto

↓

Refertare con antibiogramma

SI ↓

Crescita di microrganismi in quantità inferiore alle soglia o dall'arricchimento in brodo e non riscontrati in colture di altri campioni

↓

Refertare con antibiogramma. Commento: «Possibile microrganismo contaminante: valutarne la significatività clinica»