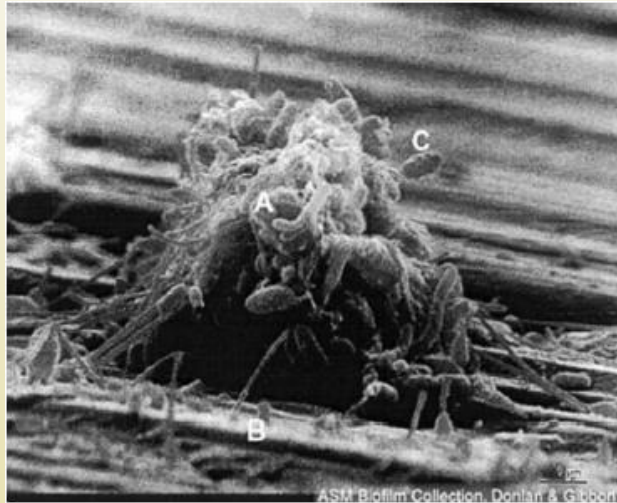


CASS DIFÍCEIS DE INFECÇÕES ÓSSEAS POR GRAM-POSITIVOS: QUAL O IMPACTO DOS BIOFILMES NAS FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS E TRATAMENTO?



Mauro José Costa Salles
Disciplina de Infectologia – FCMSCSP

Potenciais Conflitos de Interesses

Recursos para pesquisas e remuneração para aulas:

- – **Pfizer, Inc**
- – **MSD, Inc**
- – **Gilead, Inc**
- – **Sanofi-Aventis, Inc**
- – **Novartis, Inc**

Do laboratório

✓ **BIOFILMES E BACTÉRIAS**

✓ **IMPLANTES**

✓ **HOSPEDEIRO**

FIRST SCENARIO

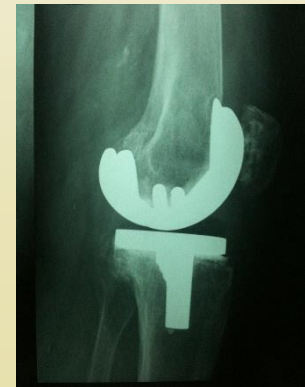
A 62-year-old woman with osteoarthritis presents with a 7-month history of progressively left knee pain worsening at bed time, 8 months after undergoing total left-knee arthroplasty. The pain has not responded to nonsteroidal antiinflammatory drugs. Physical examination reveals a sinus tract overlying her left knee. Her leukocyte count is $8000/\text{mm}^3$, and the C-reactive protein (CRP) level is 15.5 mg/L . A radiograph shows loosening of the prosthesis. Synovial-fluid aspirate shows 15×10^3 cells per cubic millimeter (89% neutrophils); cultures of an aspirate from the knee grow *Staphylococcus epidermidis*.



YOU PROBABLY NEED NO FURTHER HELP TO DIAGNOSIS AN PJI

SECOND SCENARIO

A 57-year-old previously health man, into swimming, playing tennis and jogging, submitted in Oct2012 to total left-knee arthroplasty due to osteoarthrosis, and presents with a 11-month history of progressively worsening knee pain. Took 6 months of Cipro[®] with slight pain response. Physical examination reveals minus edema and heat, on his left knee. His leukocyte count is 7500/mm³, C-reactive protein (CRP) level is 8.7 mg/L, and the ESR is 27 mm/h. Synovial-fluid aspirate shows 11×10³ cells per cubic millimeter (47% neutrophils); cultures of an aspirate from the knee with no growth whatsoever...



YOU PROBABLY WILL NEED HELP TO DIAGNOSIS AN PJI

CLINICAL CASE SCENARIO

Are you already convinced that the second case is indeed a PJI?

What would you pick for being nearly a 100% sure that this is an INFECTION?

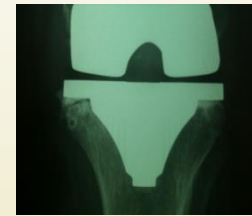
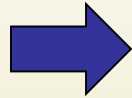
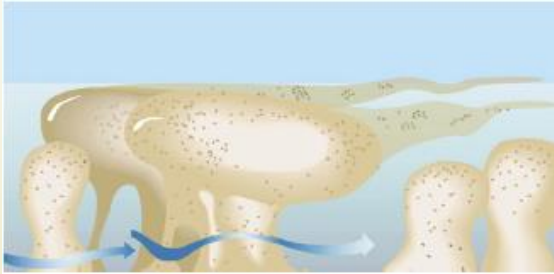
- a) More CRP and ESRs**
- b) Biomarkers: IL-6, IL-10, Procalcitonin, TNF-a, ICAM-1**
- c) Repeat synovial-fluid aspirate, with Cultures**
- d) Arthroscopy with Bx and histopathology**
- e) PET / CT scan**
- f) Any other idea?**

TIPOS DE INFECÇÃO EM IMPLANTES

Tempo	0–3 meses	3–24 meses	>24 meses
Tipo	Precoce (29%)	Intermediária (Baixo grau) (41%)	Tardia (30%)
Fonte	Perioperatória		Hematogênica
Sinais	Febre, derrame articular, calor local, secreção FO, DOR	DOR persistente, soltura precoce da AT, fístula	Aguda ou subaguda
Agentes	<i>S. aureus</i> Streptococci Enterococci	CoNS <i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> Streptococci

INFECÇÕES ASSOCIADAS AOS BIOFILMES

- Infecções pouco agressivas e crônicas (persistem por meses ou anos)
- Períodos de quiescência e de exacerbação
- Infecções associadas aos implantes



INFECÇÕES ÓSSEAS E ARTICULARES

NÃO DEVE SER TRATADA COMO INFECÇÃO PRODUZIDA POR BACTÉRIAS LIVRES (PLANCTÔNICAS), EX. ITU, BACTEREMIA, PNEUMONIA

- ✓ **Geralmente estão associadas à Biofilme (bactérias sésseis e planctônicas)**
- ✓ **Pouca ação neutrofílica local**
- ✓ **Menor vascularização**
- ✓ **Bactérias em hipometabolismo**

CURA DA INFECÇÃO, DEPENDE:

- # LIMPEZA CIRÚRGICA PRECOCE**
- # INÍCIO RÁPIDO E ADEQUADO DO TRATAMENTO ANTIBIÓTICO**
- # CONCENTRAÇÃO EFICIENTE DOS ATBs INTRA E EXTRA-BIOFILME**
- # TEMPO PROLONGADO DE ATB**

BIOFILME

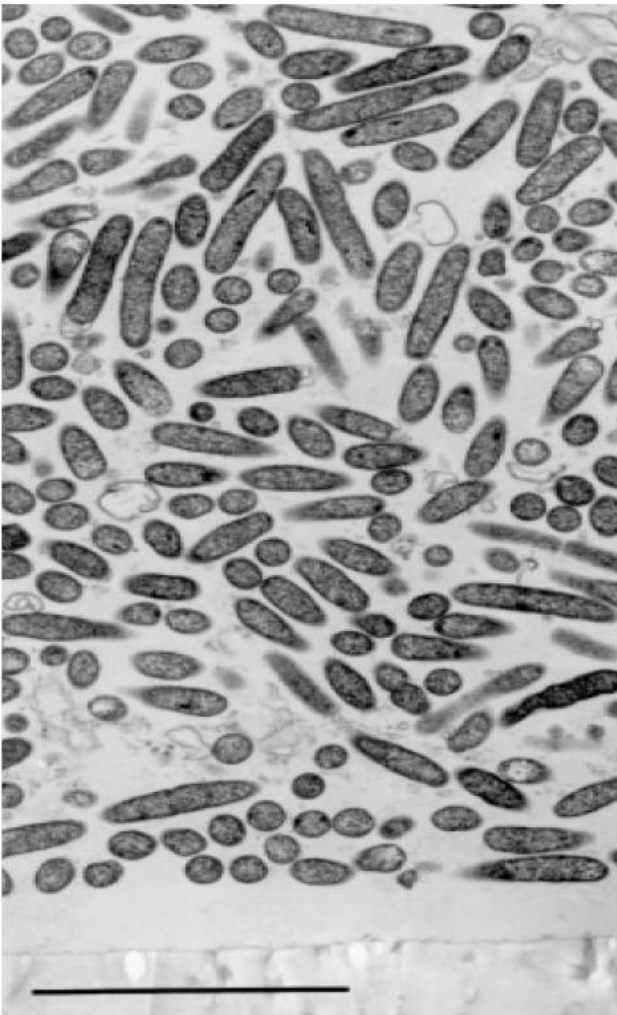
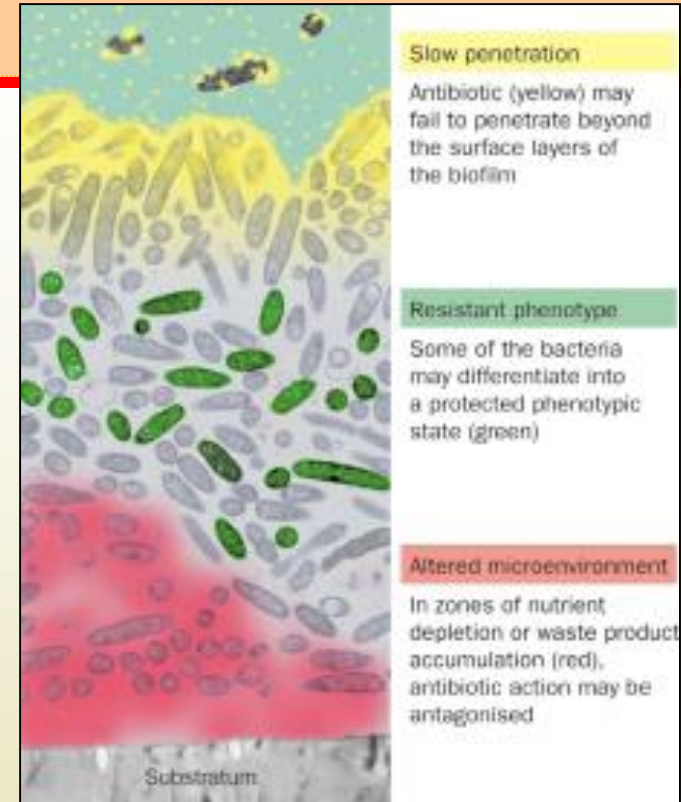


Figure 1: *Pseudomonas aeruginosa* biofilm
Electron micrograph of a laboratory-grown *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Bacteria live in multicellular clusters with individual cells in close proximity. The biofilm was grown on a plastic substratum (bottom).
Bar=5 µm



✓ Tecido ao redor do Biofilme sofre ação deletéria da atividade inflamatória

- ✓ Sobrevida bacteriana no Biofilme não é afetada pelas concentrações habituais dos ATBs
- ✓ ATBs isoladamente, somente controla os sintomas inflamatórios ao redor do Biofilme
- ✓ Após a suspensão do ATB, bactérias sésseis são liberadas ao tecido adjacente (planctônicas)
- ✓ Remoção cirúrgica é fundamental

FORMAÇÃO DO BIOFILME

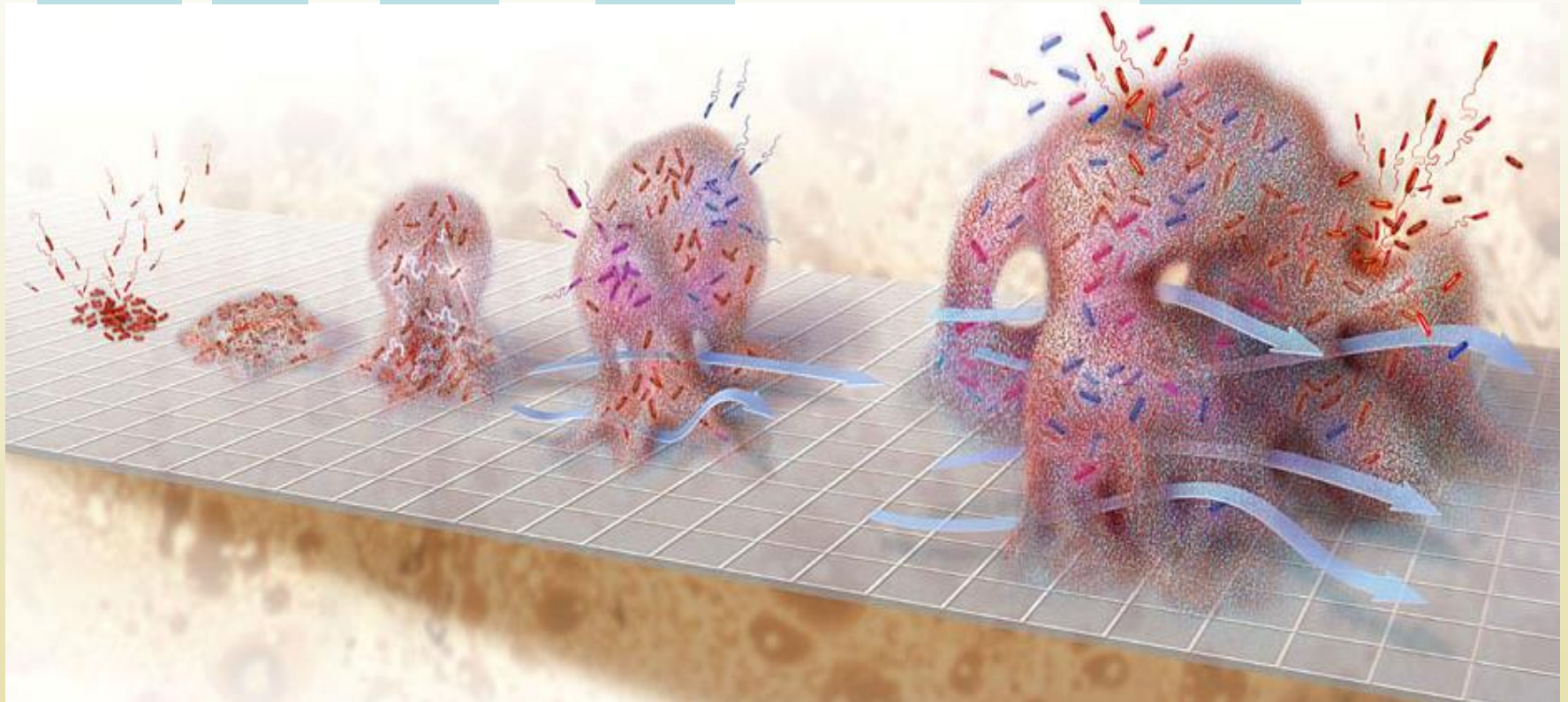
1 min

3 h

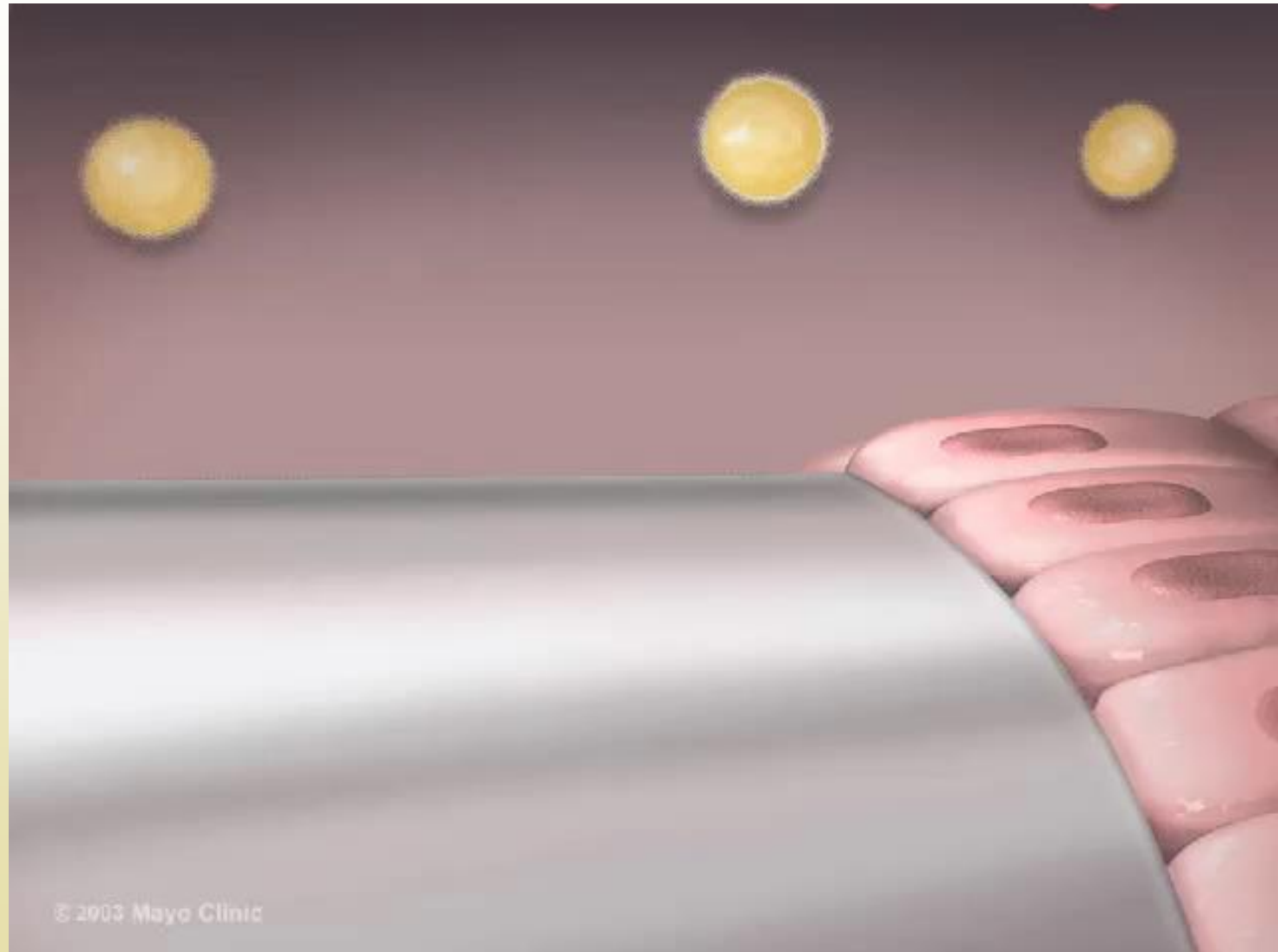
12 h

1 dia

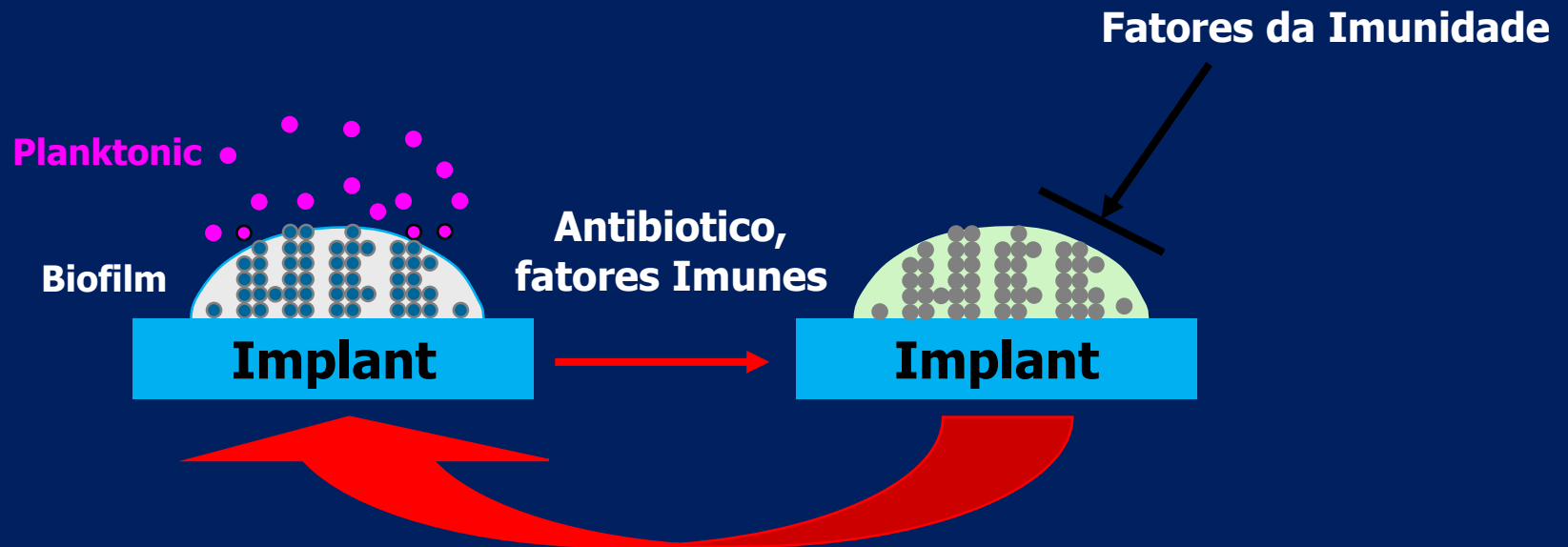
3 dias



DIAGNOSTICO DE INFECCOES ASSOCIADAS AOS BIOFILMES



Antibióticos contra Biofilme



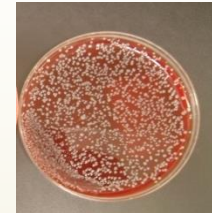
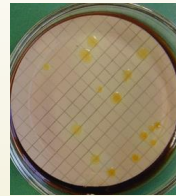
ESTRATÉGIAS DO MANEJO DAS INFECÇÕES POR BACTÉRIAS PLANCTÔNICAS

✓ Estratégias Diagnósticas

Hemoculturas em meio líquido

Cultivo em meio sólido

Contagem de colônias



✓ Estratégias Terapêuticas

Antibióticos bacteriostáticos

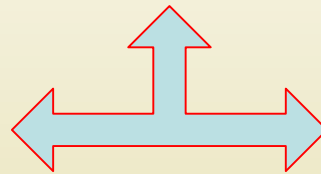
Tempo curto de terapia



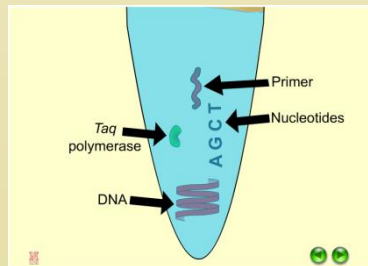
NÃO FUNCIONAM NAS INFECÇÕES POR PATÓGENOS SÉSSEIS PROVENIENTES DO BIOFILME

NOVOS MÉTODOS E CONCEITOS NA CIÊNCIA DOS BIOFILMES PARA O MANEJO CLÍNICO DAS DOENÇAS INFECCIOSAS

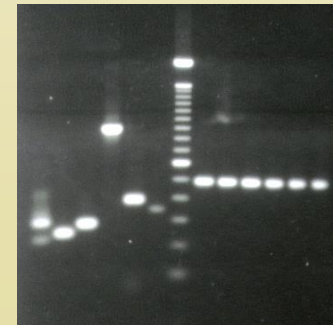
- ~65% das infecções bacterianas/fúngicas humanas são por biofilme
- Mecanismos de culturas tradicionais não funcionam
- Médicos caracterizam como “rejeição” ou “sutura asséptica”



**Culturas de
tecido
NEGATIVAS**



**Métodos
Moleculares
POSITIVOS**

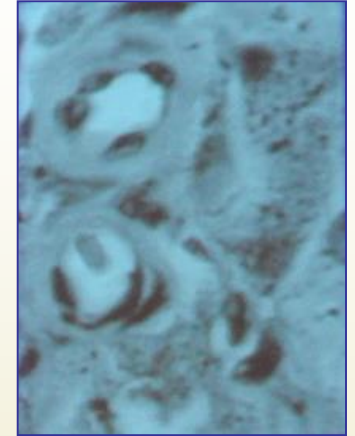


FATORES DE RISCO PARA FALHA TERAPÊUTICA

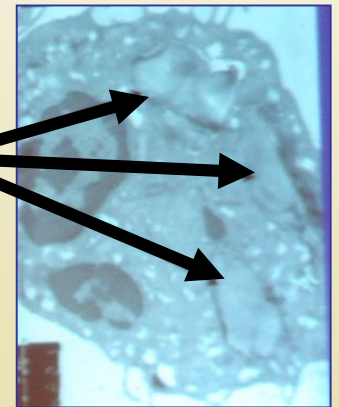


Cimento Poli-metil-Metacrilato

Granulomas



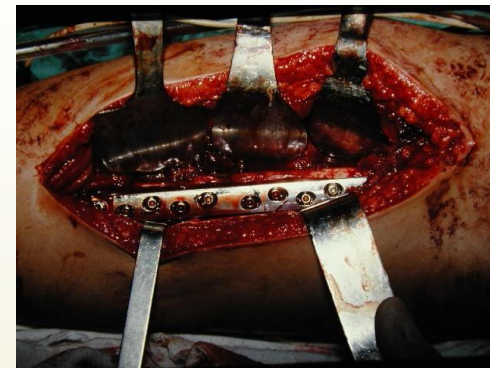
**Billhões de
Partículas de
Polietileno**



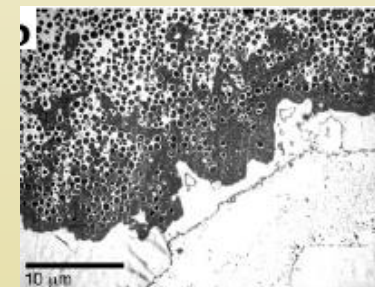
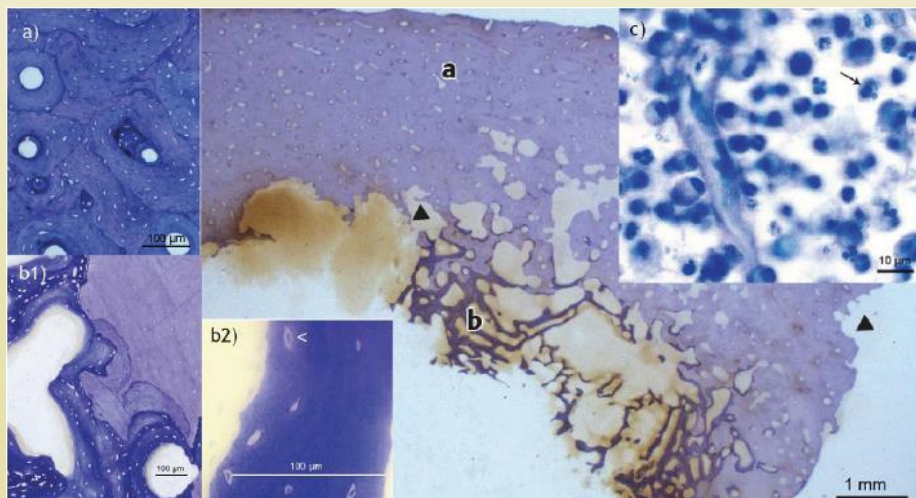
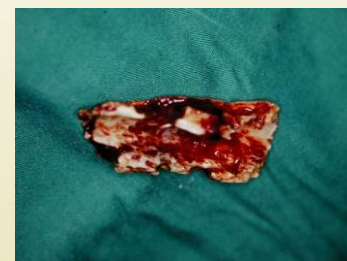
**Infecção
Crônica??**

INFECÇÕES ÓSSEAS EM BIOMATERIAIS

- Bactérias sésseis em biofilme no sequestro ósseo
- Bactéria em baixa atividade metabólica
- Bactérias sésseis das biópsias não crescem nas culturas
- Proteção aos ATBs

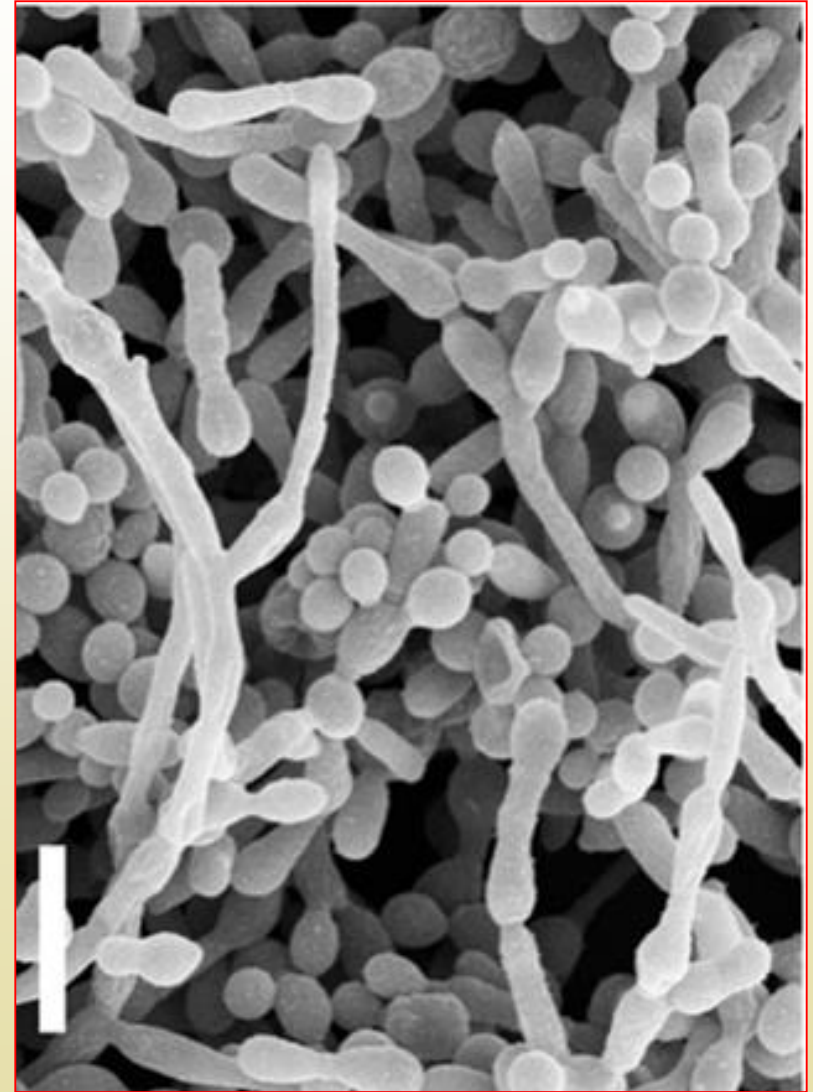
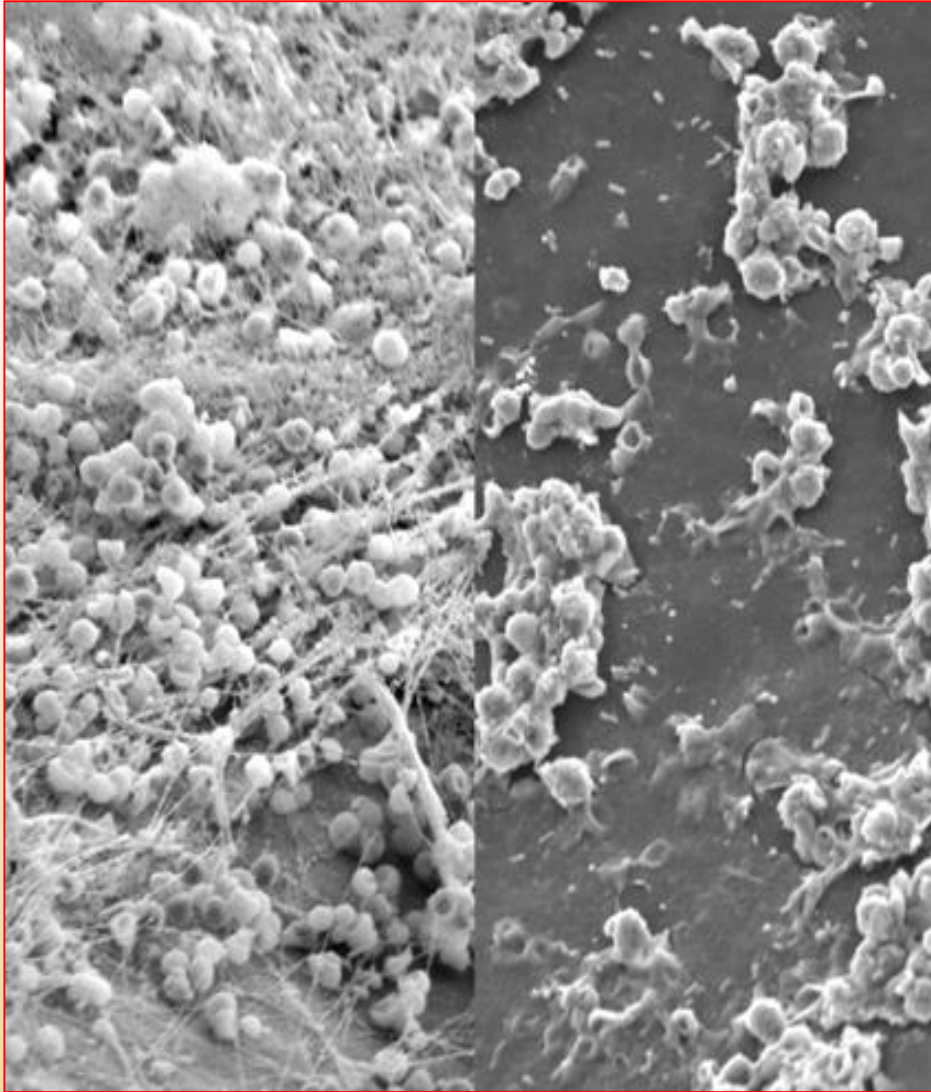


IOT Santa Casa SP



Transmission Electron Micrograph (TEM)

BIOFILME E *CANDIDA SP.*



TECNOLOGIA DOS IMPLANTES ORTOPEDICOS

- ✓ **US\$23Bilhoes - Mercado de implantes ortopédicos nos EUA em 2012**
- ✓ **Biomateriais: sobreviver e funcionar como corpo estranho em ambiente biológico**
- ✓ **Sucesso na aplicação dos Implantes ortopédicos depende:**

FATORES DO CIRURGIAO

Técnica cirúrgica
Experiência
Escolha adequada do implante

FATORES DO PACIENTE

Condição médica e resposta fisiológica
Atividade física e adesão as instruções

FATORES DO IMPLANTE

Diferentes biomateriais em conjunto
Titânio + liga cromo-cobalto (Cr-Co) +
polietileno + PMMA

CONHECENDO OS IMPLANTES ORTOPEDICOS

✓ Liga de Crômio-cobalto:

- A. Baixa biocompatibilidade**
- B. Alta resistência a fricção**
- C. Menor osteo-integração**
- D. Articulação metal-metal estimula infiltrado linfocitário/necrose**

✓ Titânio:

- A. não pode ser usado na superfície articular da artroplastia**
- B. Baixa resistência a fricção**
- C. Osteo-integração muito boa na interface biomaterial e tecido**

INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E SUPERFÍCIE DOS IMPLANTES ORTOPÉDICOS NAS INFECÇÕES

Infecção x Implante

Tamanho, localização, formato, composição química, superfície

- ✓ **PMMA > CoCr > Aço > Titanium (superfície porosa – polida)**
- ✓ **Superfície polida → 2.5 x + inoculum p produzir infecção**
- ✓ **Estudos clássicos de Petty (1985) em cães – PPMA > PE > CrCo > sSt**
- ✓ **PMMA → 4,5 x menos bactéria p causar infecção (CrCo ou Ti)**
- ✓ **Chag CC (J. Orthop. Res. 1994;12) – + infecção S. epid em sSt > PMMA > Ti**

OSTEOINTEGRAÇÃO

Titanium – excelente biocompatibilidade óssea



MANEJO DA INFECÇÃO OSTEO-ARTICULAR

- **Depende da análise individualizada do:**
- **Hospedeiro (status imune sistêmico e local)**
- **Tipo de material implantado e local de implantação**
- **Diferentes formas de biofilmes**
- **Patogenicidade bacteriana(s) diversas**
- **Pk/PD dos antibióticos**

ESTAS INFECÇÕES NÃO RESOLVEM, OFERECENDO CIPRO® OU QUALQUER OUTRO ATB VIA ORAL AO PACIENTE E PRINCIPALMENTE POSTERGANDO O TRATAMENTO CIRÚRGICO

CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO

COMMONLY USED DEFINITION CRITERIA FOR PROSTHETIC JOINT INFECTION

DEFINITION CRITERIA		SENSITIVITY	SPECIFICITY
Cutaneous sinus tract communicating with the prosthesis	<u>CLÍNICO</u>	20-30%	~100%
Acute inflammation in periprosthetic tissue histopathology ^a	<u>ANATOMO-PATOLÓGICO</u>	95-98%	98-99%
Synovial fluid leukocyte count and differential^b			
Knee ($\geq 1.7 \times 10^9$ /l leukocytes, $\geq 65\%$ neutrophils)		96%	98%
Visible purulence (wound secretion, pus around prosthesis)		20-30%	~100%
<u>Microbial growth</u>			
Synovial fluid		60-80%	97%
Periprosthetic tissue ^c	<u>MICROBILÓGICO</u>	70-85%	92%
Sonication fluid (≥ 50 CFU/ml)		85-95%	95%

A) Defined variably as >1 to <10 neutrophils/high-power field

B) Early postoperative and inflammatory joint diseases excluded


C) For low-virulent microorganisms (e.g. coagulase-negative staphylococci, *Bacillus* spp., *Propionibacterium* spp.), growth of the same organism in >2 tissue specimens or an additional clinical criterion for PJI are required.

DIAGNÓSTICO

IDEAL: confirmar (ou excluir) o diagnóstico antes da cirurgia!

**PRÉ-
OPERATÓRIO**

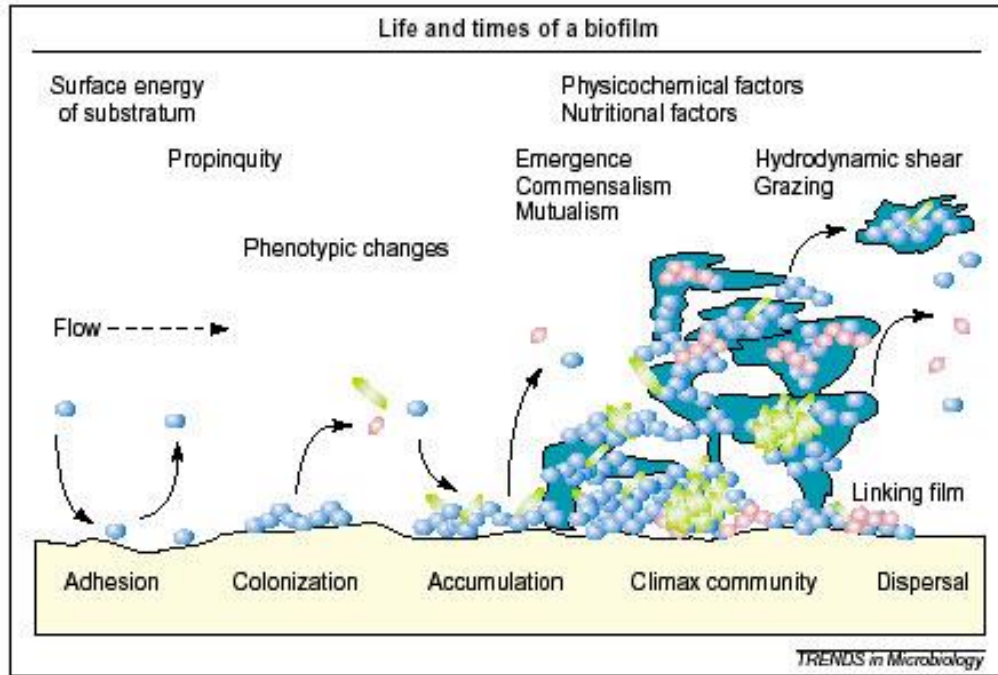
PERI/PÓS-OPERATÓRIO

- 
- ✓ História Clínica
 - ✓ Exame Físico
 - ✓ Exames at. inflamatória séricos
 - ✓ **Aspirado de líquido articular**
 - ✓ Imagem

 - ✓ Histologia
 - ✓ Microbiologia tecido
 - ✓ Microbiologia prótese
 - ✓ Métodos fenotípicos
 - ✓ Métodos genotípicos (PCR)

DIAGNÓSTICO

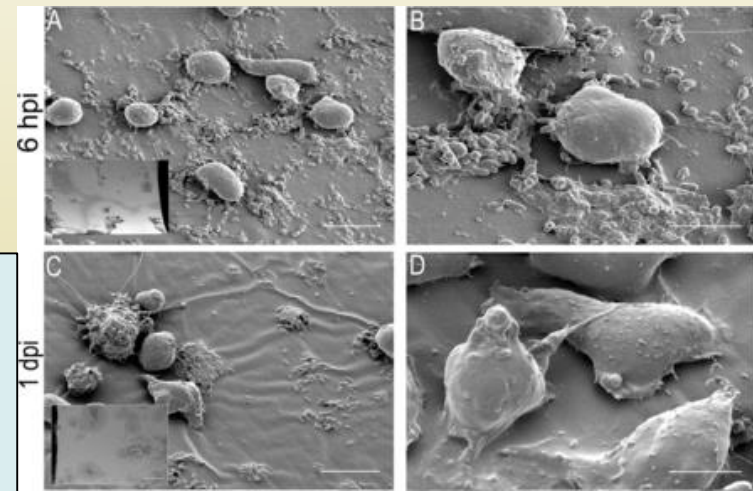
INFECÇÃO DE PRÓTESE ORTOPÉDICA



PROBLEMA

INFECÇÕES DE BAIXO GRAU:

- ✓ ASSOCIADAS AO BIOFILME.
- ✓ OLIGOSSINTOMÁTICAS.
- ✓ CULTURAS NEGATIVAS



- Biofilm bacteria does NOT grow on liquid media
- Hypometabolism bacteria
- Sessile bacteria does not grow on AGAR plates
- May not be a Bacteria (e.g, Fungi, Mycobact)
- Sensitivity/Specificity: 56-75% / 95-100%

DIAGNÓSTICO

História Clínica

Exame Físico

Exames séricos

Aspirado de líquido articular

Imagem

Histologia

Microbiologia tecido

Microbiologia prótese

Obter: ≥ 3 amostras de tecido de locais diferentes

- Não colher swab e tampouco cultura de fístula
- Sensibilidade da cultura: **60-80%**
- Especificidade: Cultura + 1 amostra - falso-positivo
- Prolongar o tempo de incubação das culturas 14 d (anaerobes)
- Se possível: parar ATB 2 semanas antes

PROSTHETIC JOINT INFECTION

BASIC CONCEPTS FOR THE DIAGNOSIS OF THIS BIOFILM INFECTION



Willian Costerton



Werner Zimmerli



Andrej Trampuz



Apply these concepts for PJI
Search for the Bug within the BIOFILM

Koch's Postulates:



L of MEDICINE

CLE

gl J Med 2004;351:1645-54.

EPTS

Infections

.D., and Peter E. Ochsner, M.D.

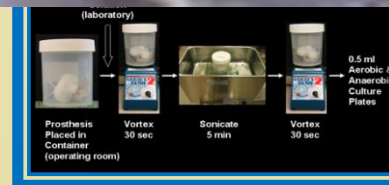
The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Sonication of Removed Hip and Knee Prostheses for Diagnosis of Infection

Andrej Trampuz, M.D., Kerry E. Piper, M.S., Melissa J. Jacobson, A.S.,

N Engl J Med 2007;357:654-63.



DIAGNÓSTICO

História Clínica

Exame Físico

Exames lab. séricos

Aspirado de líquido articular

Histologia

Microbiologia tecido

Microbiologia prótese

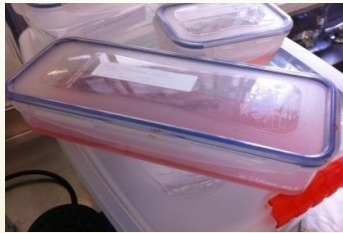
- **IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS DO BIOFILME:**
- ✓ **SONICAÇÃO DOS COMPONENTES DA PRÓTESE.**
- ✓ **BIOLOGIA MOLECULAR DO FLUIDO SONICADO.**

[1] Hughes JG. *J Clin Microbiol.* 2001;39(12):4468-71

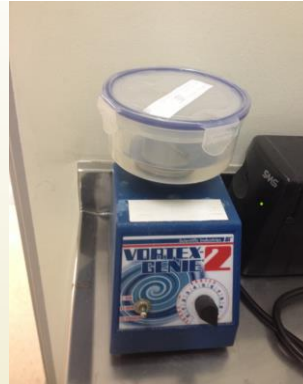
[2] Butler-WU SM, et al. *J Clin Microbiol.* 2011;49(7):2490-5

Improved Diagnosis of Infection Associated with Osteosynthesis by Use of Sonication of Fracture Fixation Implants

Maysa Harumi Yano, Giselle Burlamaqui Klautau, Cely Barreto da Silva, Stanley Nigro, Osmar Avanzi, Marcelo Tomanink Mercadante and Mauro Jose Costa Salles
J. Clin. Microbiol. 2014, 52(12):4176. DOI:
10.1128/JCM.02140-14.
Published Ahead of Print 17 September 2014.



**Surgical implants in 250 ml
de Ringer Lactato (up to 6
hours)**



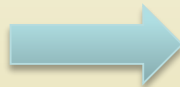
**Vortex 30
seconds**



**Ultrasonic shower 5
minutes**



**Vortex 30
seconds**



Centrifuge 2500 rpm



48 hours



48 hours



**Aerobic and anaerobic
culture plate, thioglycollate
broth**



14 days

RESULTS



Demographics	Subjects with OAI (n: 125)	Subjects with NIO (n: 55)	<i>P</i> value
Male sex (%)	78 (62.4%)	27 (49.0%)	0.09
Median (range) age (years)	41 (21–60)	37 (12– 62)	0.002
Median (range) age (months) of implants	20.9 (0 – 53.0)	30.21 (1.4 – 60.18)	0.006
Clinical characteristics. No (%)			
Diabetes mellitus	17 (9%)	1 (1%)	0.012
Coronary diseases	5 (3%)	3 (2%)	0.708
Liver cirrhosis	0 (0%)	1 (1%)	0.315
Solid malignancy	3 (2%)	3 (2%)	0.381
Corticosteroids	4 (2%)	0 (0%)	0.309
Rheumatoid arthritis	4 (2%)	0 (0%)	0.309
Alcohol abuse	11 (6%)	0 (0%)	0.018
Smoking	30 (17%)	3 (2%)	0.02
No (%) of revision (>1)	22 (12%)	3 (2%)	0.023
No of peri-implant tissue sample taken, median	2.9 (2-12)	2.64 (2-8)	0.54
No (%) with prior use of antimicrobials	39 (31.2%)	1 (1.81%)	< 0.001

RESULTS



Comparison between sonication-fluid culture and peri-prosthetic tissue culture

	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Positive Predictive Value (95% CI)	Negative Predictive Value (95% CI)
Sonication- Fluid Culture	90.4 (113/125) CI: 83.9-94.4	90.9 (50/55) CI: 80.4-96	95.8 (113/118) CI: 90.6-98.2	80.6 (50/62) CI: 68.2-87.7
Tissue Culture	56.8 (71/125) CI: 47.6-65.3	96.4 (53/55) CI: 87.7-99.6	97.3 (71/73) CI: 90.7-99.2	49.7 (53/107) CI: 41.7-60.1

?

Diagnosis was achieved exclusively by sonication-fluid cultures on 47 subjects with OAI (10 subjects with polymicrobial infections) , of which only 18 (38.3%) had previously received antibiotics.

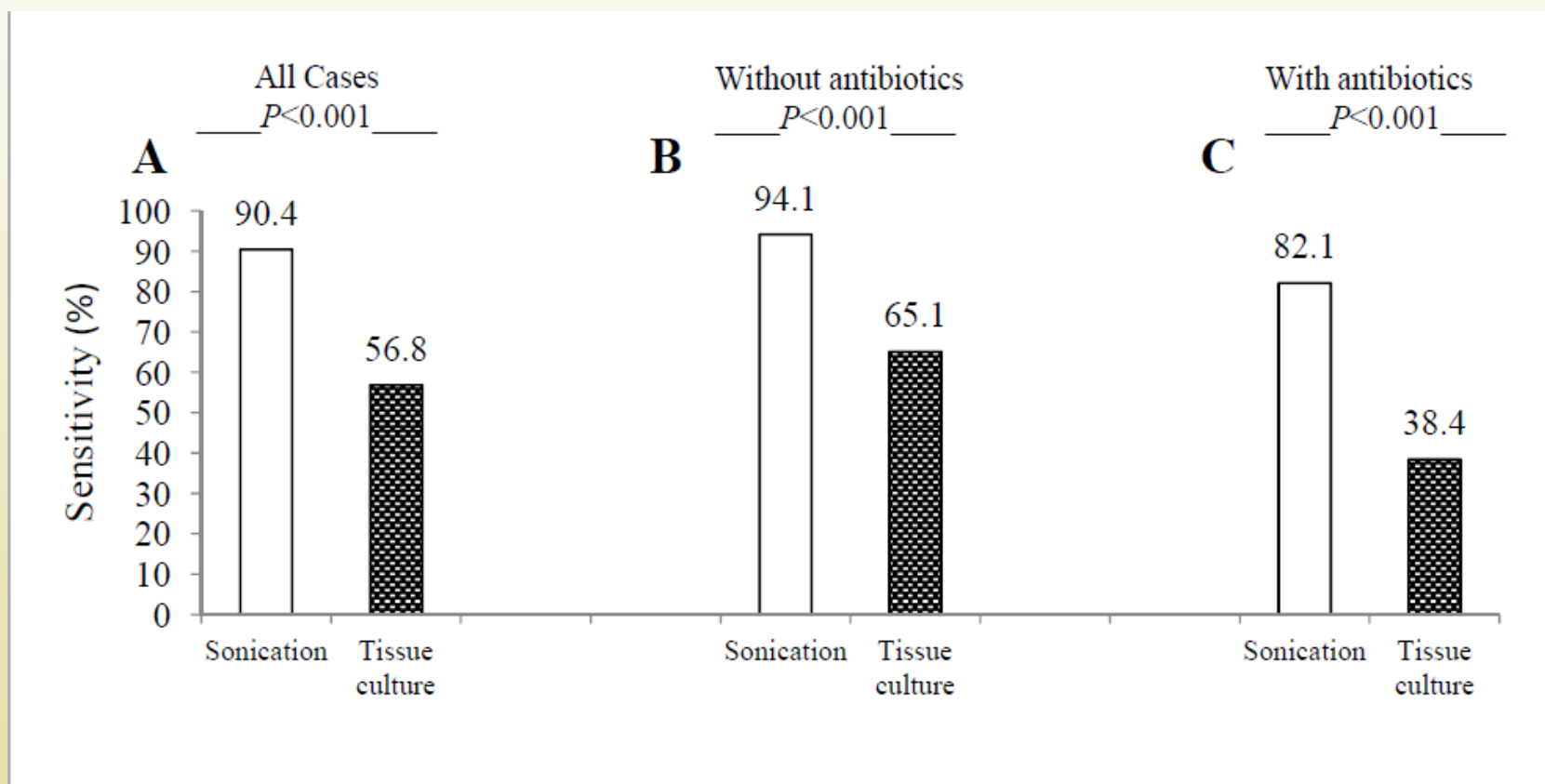
DISTRIBUTION OF MICROORGANISMS DETECTED BY SONICATION-FLUID CULTURE AND TISSUE CULTURE

Microorganisms ^a	Sonication Fluid Culture		Tissue Culture		P value ^b
	(n: 150)	(%)	(n: 79)	(%)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	42	28	33	41.8	0.034
CoNS ^c	34	22.7	14	17.7	0.38
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	10	11	13.9	0.28
<i>Enterobacter</i> sp.	12	8	3	3.8	0.19
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	5.3	5	6.3	0.09
<i>Serratia marcescens</i>	7	4.7	5	6.3	0.59
<i>Enterococcus</i> sp.	5	3.3	2	2.5	0.73
<i>Streptococcus</i> sp.	4	2.7	0	0	0.14
<i>Corynebacterium</i> sp.	4	2.7	1	1.3	0.49
<i>Bacillus</i> sp.	4	2.7	3	3.8	0.21
<i>Escherichia coli</i>	3	2	0	0	0.21
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	2	1	1.3	0.21
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	2	1.3	0	0	0.3
<i>Proteus</i> sp.	2	1.3	0	0	0.3
<i>Candida</i> sp.	2	1.3	0	0	0.3
<i>Citrobacter</i> sp.	1	0.7	0	0	0.46
<i>Providencia</i> sp.	1	0.7	1	1.3	0.64
<i>Bulkkholderia cepacia</i>	1	0.7	0	0	0.46
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0.7	0	0	0.46
Gram positives	85	65	49	62	0.43
Gram negatives	52	34	26	32	0.78
Polymicrobial Flora	27	15	10	5.5	0.001

RESULTS



PREVIOUS ANTIMICROBIAL THERAPY



CONCLUSION



- **SONICATION-FLUID CULTURES**
 - **Superior to conventional tissue cultures for OAI diagnosis,**
 - **Especially among patients receiving antibiotics prior to the surgery.**

TRATAMENTO

CURA DA INFECÇÃO, DEPENDE:

- # LIMPEZA CIRÚRGICA PRECOCE
- # INÍCIO RÁPIDO E ADEQUADO DO TRATAMENTO ANTIBIÓTICO
- # CONCENTRAÇÃO EFICIENTE DOS ATBs INTRA E EXTRA-BIOFILME
- # TEMPO PROLONGADO DE ATB

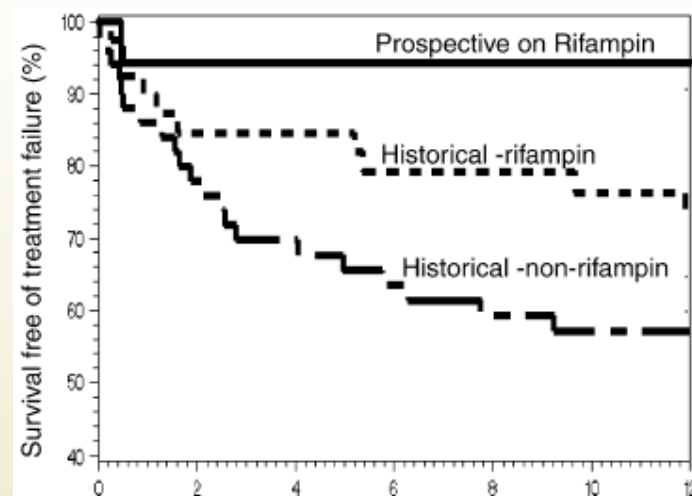
RACIONAL DE ANTIBIÓTICOTERAPIA NAS INFECÇÕES DOS IMPLANTES ORTOPÉDICOS

- ✓ **Tratamento de bactérias sésseis no interior do biofilme (Rifampicin Please!!)**
- ✓ **Atuem em bactérias em hipometabolismo**
- ✓ **Biodisponibilidade no parênquima ósseo**
- ✓ **Doses elevadas**
- ✓ **Tempo prolongado**
- ✓ **Preferência por ATB com menor indução de R**
- ✓ **Conhecimento dos eventos adversos**
- ✓ **Conhecimento das interações medicamentosas**
- ✓ **Custo, Claro!!**

Efficacy and safety of rifampin containing regimen for staphylococcal PJI treated with debridement and retention (D+R)

Table 4 Cox proportional hazards results modeling time to treatment failure

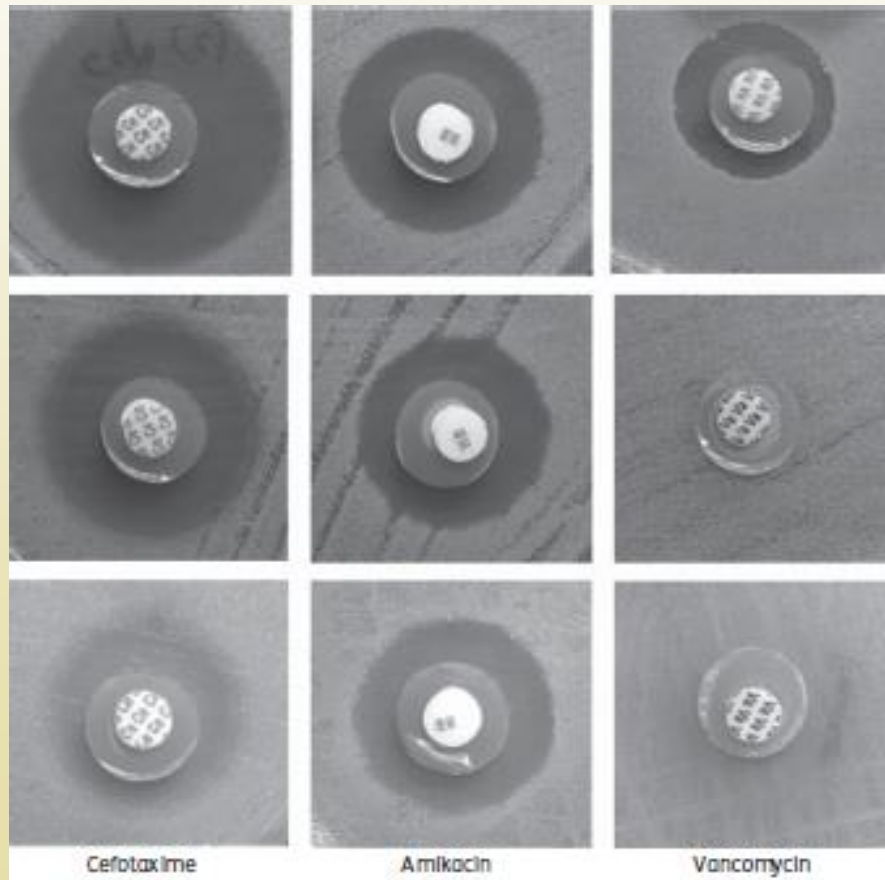
Variable	Multivariable analysis	
	HR (95% CI)	P
Propensity score	1.31 (0.98, 1.76)	0.067
ASA	0.91 (0.53, 1.77)	0.905
Historical (non-rifampin)	1.0	
Historical (rifampin)	0.55 (0.24, 1.26)	0.158
Prospective (rifampin)	0.11 (0.01, 0.84)	0.034



Organism	Parenteral therapy		Oral therapy initiated following the end of parenteral therapy
	Recommended	Alternative	
Oxacillin-resistant	Vancomycin 15 mg/kg iv Q12hrs for 4 weeks and rifampin 900 mg daily ^a	Linezolid ^b 600 mg po/iv Q12hrs and rifampin 900 mg daily ^b	Levofloxacin 750 mg daily with rifampin 900 mg daily ^c followed by suppressive therapy for the life of the total joint arthroplasty with trimethoprim /sulfamethoxazole PO DS Q12hrs or minocycline 100 mg po Q12hrs for the life of the total joint arthroplasty
Oxacillin-sensitive	Cefazolin 1–2 g iv Q8hrs for 4 weeks and rifampin 900 mg daily ^a	Vancomycin 15 mg/kg Q12 hrs and rifampin 900 mg daily ^a	Levofloxacin 750 mg daily with rifampin 900 mg daily ^c followed by suppressive therapy for the life of the total joint arthroplasty with cephalexin 500 PO Q6hrs or Q8hrs or cefadroxil 500 mg Q12hrs

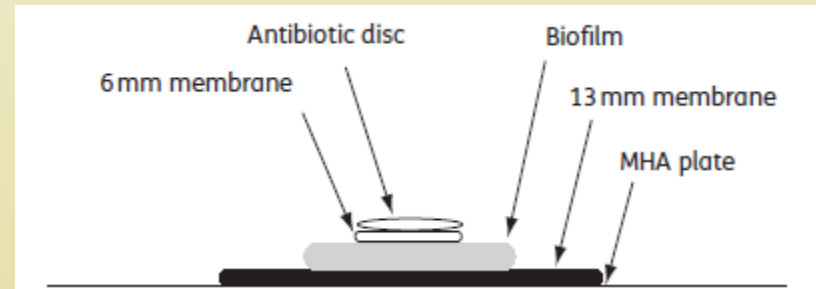
Penetration of antibiotics through *S. aureus* and *S. epidermidis* biofilms

- Papel do biofilme em retardar a penetração de ATBs e contribuir para R de *S. aureus* e *S. epidermidis*



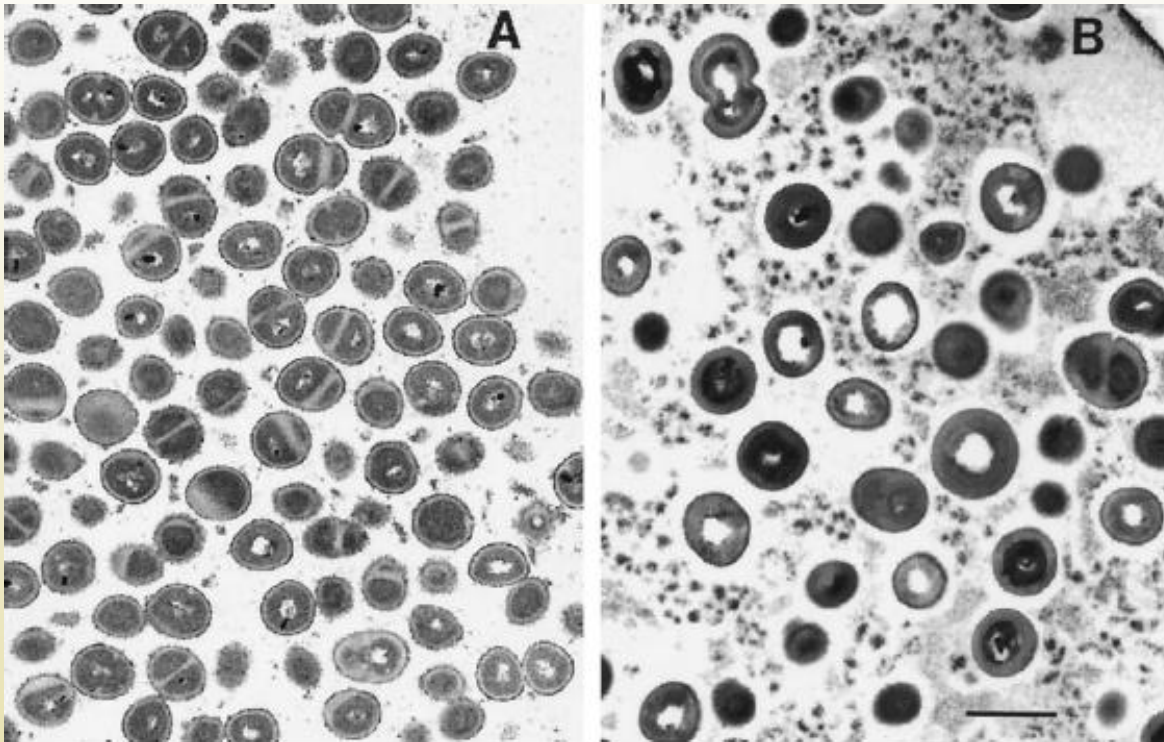
Oxa, Cefotaxime e Vancomicina
Redução importante em biofilme

Amicacina e Ciproflaxacina
boa penetração em biofilme

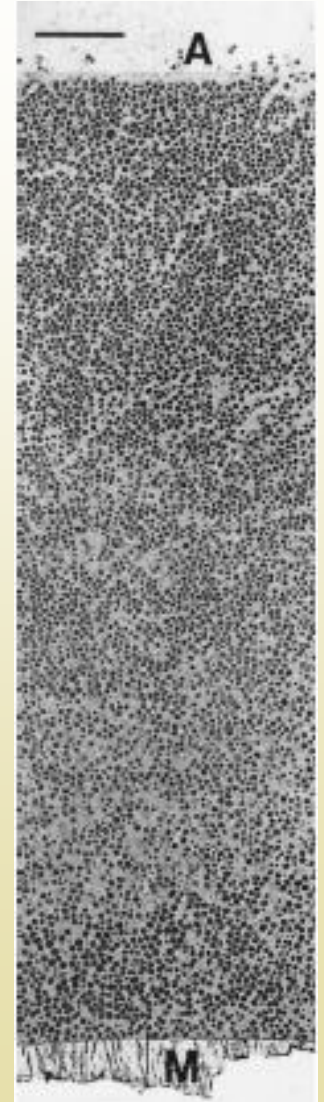


Penetration of Rifampin through *S epidermidis* Biofilms

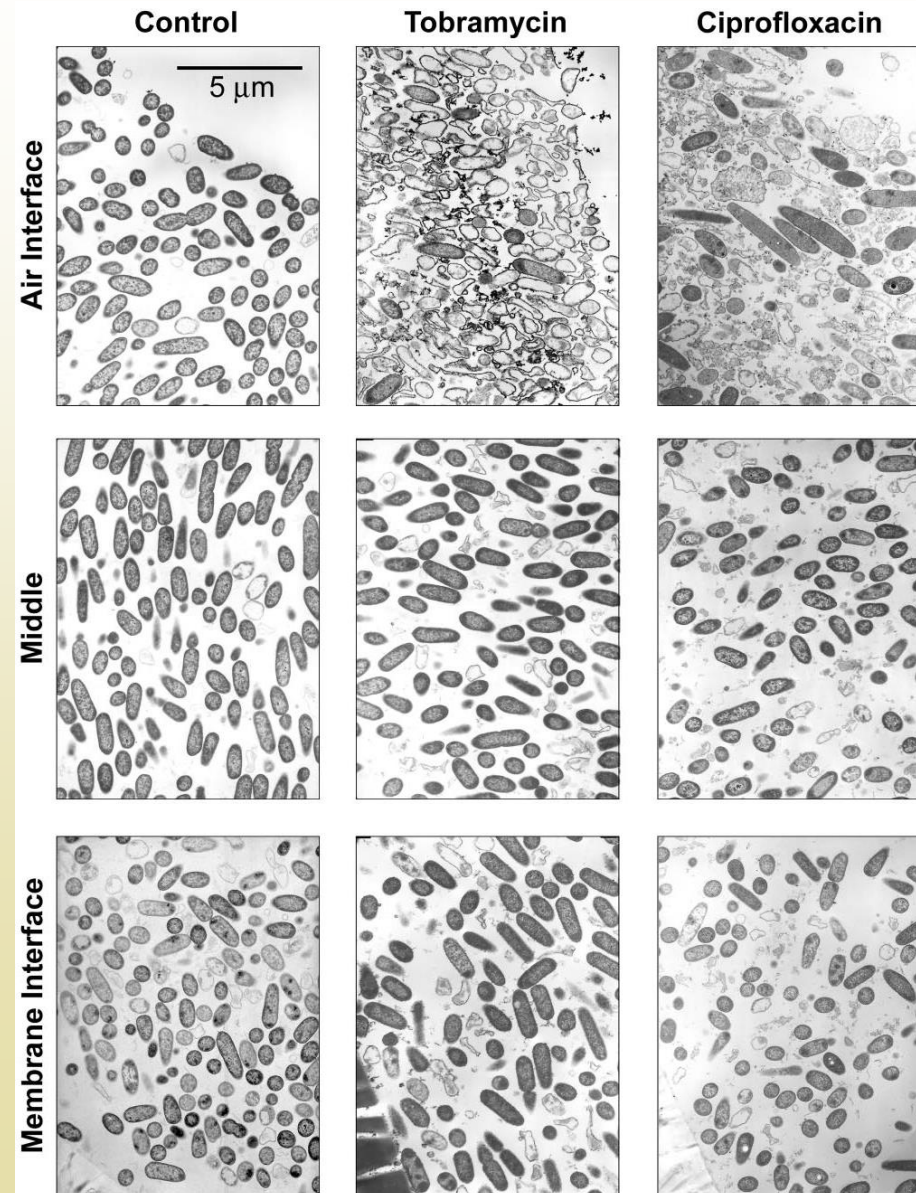
- RMP penetrou no Biofilme, mas não eliminou o inoculum



(A) Untreated 48-h control; (B) 48-h treatment with 0.1 g of rifampin per ml.



Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin

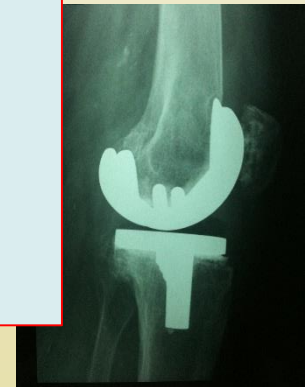


- ✓ **Tobramicina e Ciprofloxacina penetraram no Biofilme, mas não eliminaram o inoculum**
- ✓ **Baixo metabolismo bacteriano é responsável pela tolerância antibiótica**

CASO CLÍNICO

TISSUE CULTURE
NEGATIVE

SONICATION WITH
S. epidermidis



Obrigado !

mcsalles@osite.com.br

