



PG-LOCOMOTOR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
APLICADAS AO APARELHO LOCOMOTOR



FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

HUGO ALEXANDRE DE ARAUJO BARROS COBRA

Desenvolvimento de um teste rápido de quantificação de DNA livre para diagnóstico da infecção periprotética após artroplastia total de joelho

Ribeirão Preto
2022

Hugo Alexandre de Araujo Barros Cobra

Desenvolvimento de um teste rápido de quantificação de DNA livre para diagnóstico da infecção periprotética após artroplastia total de joelho

Versão Original

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Salim

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Ana Carolina Leal

Ribeirão Preto - SP
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Cobra, Hugo Alexandre de Araujo Barros

Desenvolvimento de um teste rápido de quantificação de DNA livre para diagnóstico da infecção periprotética após artroplastia total de joelho. Ribeirão Preto, 2022.

71 f. : il.

Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração:

Orientador: Salim, Rodrigo

1. Infecção periprotética. 2. Artroplastia total de joelho.
3. DNA livre. 4. Diagnóstico. 5. Biomarcador.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Hugo Alexandre de Araujo Barros Cobra

Título: Desenvolvimento de um teste rápido de quantificação de DNA livre para diagnóstico da infecção periprotética após artroplastia total de joelho

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.
Instituição:
Julgamento:

Prof. Dr.
Instituição:
Julgamento:

Prof. Dr.
Instituição:
Julgamento:

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas envolvidas na elaboração deste trabalho, em especial:

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP e a todos os seus colaboradores pela acolhida durante a realização do curso.

Aos meus orientadores, pelo incentivo, ajuda e ensinamentos essenciais para a realização desta tese.

À Professora Doutora Ana Carolina Leal, pesquisadora exemplar, idealizadora deste projeto e por toda a sua dedicação e incansável ajuda para o aprimoramento e conclusão deste trabalho.

Ao Doutor Rodrigo Salim, amigo cirurgião e pesquisador, que me recebeu e acolheu como aluno da pós-graduação USP-RP.

À toda Equipe do laboratório pesquisa do INTO, pela participação e ajuda nos experimentos realizados para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de trabalho do centro de atenção especializada de cirurgia do joelho do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia pelo apoio oferecido durante a elaboração desta tese, em especial ao meu amigo Alan de Paula Mozella, colega de grupo de joelho, pelo incentivo e parceria durante nossa jornada no INTO e também no doutorado.

Aos meus pais, Alaor de Barros Cobra e Dayse de Araujo Barros Cobra, a quem sempre me inspirei em caráter, ética e busca pelo conhecimento nos quais eu sempre me espelho em minha caminhada.

À minha esposa e companheira Marina, pela cumplicidade e apoio incondicional, aos nossos filhos Marcela e Henrique pelo tempo subtraído do seu convívio para conclusão deste Doutorado.

Ao meu irmão Rodrigo, exemplo fiel do significado de ser um irmão.

Aos pacientes e profissionais do Instituto Nacional de Traumatologia Ortopedia.

Muito obrigado a todos!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Descobrir consiste em olhar para o
que todo mundo está vendo e
pensar uma coisa diferente.

Roger Von Oech

RESUMO

Cobra HAAB. Desenvolvimento de um teste rápido de quantificação de DNA livre para diagnóstico da infecção periprotética após artroplastia total de joelho [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2022.

A infecção periprotética (PJI) é uma das complicações mais frequentes e graves da artroplastia total de joelho (ATJ). O diagnóstico preciso e o tratamento adequado são imprescindíveis para evitar a perda funcional e a evolução para infecção sistêmica. Entretanto, o diagnóstico correto da PJI ainda é um desafio ao cirurgião, uma vez que ainda não há um método de diagnóstico acurado e os critérios de diagnóstico existentes se baseiam em testes sorológicos, histológicos e microbiológicos que são imprecisos e demorados. Nos últimos anos, o DNA livre vem sendo estudado como biomarcador para diversas doenças como câncer, trombose e sepse. Este estudo tem como objetivo investigar o valor diagnóstico da quantificação de DNA livre na identificação da PJI. Para isso, foi realizado um estudo prospectivo com pacientes submetidos à cirurgia de revisão da ATJ, dos quais foi possível coletar líquido sinovial (LS) durante o procedimento cirúrgico. A quantificação de DNA livre foi realizada diretamente a partir do LS. A sensibilidade, especificidade e a curva *receiver operating characteristic* (ROC) foram calculadas. Foram incluídos no estudo 69 pacientes, dos quais 29 foram diagnosticados com PJI. A quantificação de DNA livre no líquido sinovial de pacientes com PJI foi significativamente maior no grupo infectado ($124,8 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 56,6$) que no grupo não infectado ($4,6 \text{ ng}/\text{ml} \pm 2,8$, $p < 0,0001$). A área sob a curva *receiver operating characteristic* (AUC ROC) foi de 0,981 (IC 95% de 0,914 a 0,999). Para o ponto de corte de $15 \text{ ng}/\mu\text{L}$, a sensibilidade foi de 0,96 e a especificidade 1,0. Também foi avaliado um método rápido de quantificação de DNA livre, utilizando um fluorímetro portátil. Através deste método, os níveis de DNA livre também foram significativamente maiores no LS de pacientes com PJI ($40,4 \pm 14,5$ vs $3,3 \pm 2,5$, $p < 0,0001$). A AUC ROC foi de 0,955 (IC 95% de 0,687 a 0,992). Para o ponto de corte de $11 \text{ ng}/\mu\text{L}$, a sensibilidade foi de 0,96 e especificidade 1,0. A partir dos resultados apresentados, podemos concluir que a quantificação de DNA livre se mostrou um teste com elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da PJI.

Palavras-chave: infecção articular periprotética. artroplastia total de joelho. DNA livre. biomarcador.

ABSTRACT

Cobra HAAB. Development of a rapid cell-free DNA quantification test for diagnosing periprosthetic infection after knee arthroplasty [Thesis]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto; 2022.

Periprosthetic joint infection (PJI) is one of the most frequent and devastating complications of total knee arthroplasty (TKA). Accurate diagnosis and proper treatment are essential to prevent functional loss and progression to systemic infection. However, the correct diagnosis of PJI is still a challenge since there is no accurate diagnostic method and the existing diagnostic criteria are based on serological, histological and microbiological tests that are imprecise and time-consuming. In recent years, cell-free DNA has been studied as a biomarker for several diseases such as cancer, thrombosis and sepsis. This study aims to investigate the diagnostic value of cell-free DNA quantification in identifying PJI. For this, we performed a prospective study with patients undergoing TKA revision surgery, from whom it was possible to collect synovial fluid (SF) during the surgical procedure. Cell-free DNA quantification was performed directly from the SF. Sensitivity, specificity, and the receiver operating characteristic (ROC) curve were calculated. Sixty nine patients were included in the study, 29 of whom were diagnosed with PJI. The quantification of cell-free DNA in the synovial fluid of patients with PJI was significantly higher in the infected group ($124.8 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 56.6$) than in the uninfected group ($4.6 \text{ ng}/\text{ml} \pm 2.8$, $p < 0.0001$). The area under the receiver operating characteristic curve (auc roc) was 0.981 (95% CI 0.914 to 0.999). For the cutoff point of $15 \text{ ng}/\mu\text{l}$, the sensitivity was 0.96, and specificity 1.0. A fast cell-free DNA quantification method using a portable fluorimeter was also evaluated. Through this method, cell-free DNA levels were also significantly higher in the SF of patients with PJI (40.4 ± 14.5 vs 3.3 ± 2.5 , $p < 0.0001$). The auc roc was 0.955 (95% CI 0.687 to 0.992). For the cutoff point of $11 \text{ ng}/\mu\text{l}$, the sensitivity was 0.96, and specificity 1.0. From the results presented, we can conclude that cell-free DNA quantification proved to be a test with high sensitivity and specificity for the diagnosis of PJI.

Keywords: periprosthetic joint infection. total knee arthroplasty. cell-free DNA. biomarker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações induzidas pela osteoartrite.....	3
Figura 2. Artroplastia total do joelho.....	5
Figura 3. Biofilme bacteriano.	14
Figura 4. Infecção articular periprotética.	15
Figura 5. Estrutura das redes extracelulares de neutrófilos.	16
Figura 6. NETose.....	17
Figura 7. Fonte de DNA livre.	20
Figura 8. Etapas e equipamentos necessários para a quantificação de DNA livre nas amostras de líquido sinovial.....	27
Figura 9. Etapas e equipamentos necessários para a quantificação de DNA livre nas amostras de líquido sinovial utilizando fluorímetro portátil.	28
Figura 10. Avaliação da proteína C reativa e da velocidade de hemossedimentação.....	32
Figura 11. Contagem de células brancas e percentual de polimorfonucleares.	33
Figura 12. Quantificação de DNA livre..	34
Figura 13. Curva ROC para quantificação de DNA livre.....	35
Figura 14. Quantificação de DNA livre utilizando fluorímetro portátil.....	36
Figura 15. Curva ROC para quantificação de DNA livre utilizando fluorímetro portátil..	37

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Algoritmo para diagnóstico da infecção articular periprotética do consenso de infecções articulares 2018.....	12
Quadro 2. Algoritmo para diagnóstico de infecção articular periprotética da Sociedade Europeia de Infecções Ósseas e Articulares.	13
Quadro 3. Classificação de Morawietz para avaliação da membrana periprotética.....	25
Tabela 1. Características da população de estudo.	30
Tabela 2. Perfil microbiológico dos pacientes do grupo infecção.....	31
Tabela 3. Avaliação do desempenho diagnóstico dos testes avaliados no estudo.	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µl	microlitro
AAOS	Academia Americana de Cirurgiões Ortopédicos
ATJ	artroplastia total de joelho
DNA	ácido desoxirribonucleico
EBJIS	Sociedade Europeia de Infecções Ósseas e Articulares, do inglês <i>European Bone and Joint Infection Society</i>
IMC	índice de massa corporal
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
MPO	mieloperoxidase
MSIS	Sociedade de Infecção Musculoesquelética, do inglês <i>Musculoskeletal Infection Society</i>
NET	redes extracelulares de neutrófilos, do inglês <i>Neutrophil extracellular traps</i>
OA	Osteoartrite
PCR	proteína C reativa
PJI	infecção periprotética, do inglês <i>Periprosthetic Joint Infection</i>
VHS	velocidade de hemossedimentação
IDSA	Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, do inglês <i>Infectious Disease Society of America</i>

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	X
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Osteoartrite do Joelho.....	3
2.2 Tratamento cirúrgico de osteoartrite do joelho.....	4
2.3 Falha de artroplastia.....	6
2.4 Infecção articular periprotética.....	8
2.5 Diagnóstico da infecção articular periprotética.....	9
2.6 Fisiopatologia da infecção articular periprotética.....	13
2.7 DNA livre.....	18
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo Geral.....	22
3.2 Objetivos Específicos.....	22
4 METODOLOGIA.....	23
4.1 Aspectos éticos e participantes do estudo.....	23
4.2 Coleta e processamento das amostras.....	23
4.3 Cultura microbiológica.....	24
4.4 Avaliação histopatológica.....	24
4.5 Análise do líquido sinovial.....	25

4.6	Quantificação de DNA livre.....	26
4.7	Quantificação de DNA livre em fluorímetro portátil.....	27
4.8	Análise dos resultados	28
5	RESULTADOS	30
5.1	População de estudo.....	30
5.2	Exames laboratoriais.....	31
5.3	Quantificação de DNA livre no líquido sinovial	34
6	DISCUSSÃO.....	39
7	CONCLUSÃO	45
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
	ANEXO A. PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP.....	55

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com o crescimento populacional, o aumento na expectativa de vida e mudanças no estilo de vida da população mais idosa, vem sendo observado um aumento expressivo no número de procedimentos de artroplastia. Dentre estes, a artroplastia total de joelho (ATJ) é um dos procedimentos ortopédicos mais comumente realizados, e estudos estimam que em 2050 haja um aumento de 143% no número de ATJs realizadas anualmente nos Estados Unidos em relação a 2012 (1). Apesar de ser considerada uma cirurgia segura e custo-efetiva, a ATJ pode falhar, levando à necessidade de cirurgias de revisão. As principais causas de falha da ATJ são a soltura asséptica, a infecção periprotética (PJI, do inglês *Periprosthetic Joint Infection*), a instabilidade e a fratura periprotética (2,3).

A PJI é uma das complicações mais sérias e temidas das artroplastias. Apesar da acentuada redução na sua incidência, de aproximadamente 10% em 1960 para 0,25-2% nos dias atuais, tem se observado um aumento no número absoluto de PJIs devido ao aumento na realização de artroplastias (4,5). Além disso, alguns estudos já reportam a esta infecção como principal causa para revisão da ATJ (6,7).

A PJI pode resultar em déficits funcionais importantes, além de representar risco de vida em situações mais extremas. Dessa forma, o diagnóstico rápido e preciso desta complicação pode levar a menores taxas de morbidade e mortalidade, sendo essencial para o planejamento do tratamento (8,9). Apesar disso, o diagnóstico da PJI representa um grande desafio à equipe envolvida no tratamento, principalmente pela ausência de um "padrão de ouro" para o seu diagnóstico (9).

Embora diversas definições de PJI tenham sido propostas nas últimas décadas e a despeito dos enormes avanços no arsenal metodológico para seu diagnóstico, ainda hoje não há um teste único que confirme ou afaste seu diagnóstico. Atualmente, este diagnóstico é baseado na avaliação de um conjunto de exames clínicos e laboratoriais, que muitas vezes são demorados, inconclusivos ou excessivamente tendenciosos para infecção. Dessa forma, são necessários novos métodos que auxiliem o cirurgião no diagnóstico correto desta complicação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Osteoartrite do Joelho

A osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa, multifatorial e de evolução crônica, que acomete as articulações. As principais características do comprometimento articular são a destruição da cartilagem de revestimento, a esclerose do osso subcondral, a hiperplasia sinovial e a formação de osteófitos (**Figura 1**). A lesão da cartilagem, do osso e da membrana sinovial provoca dor, levando a um quadro clínico de incapacidade física crônica, sendo importante causa de perda de qualidade de vida (10).

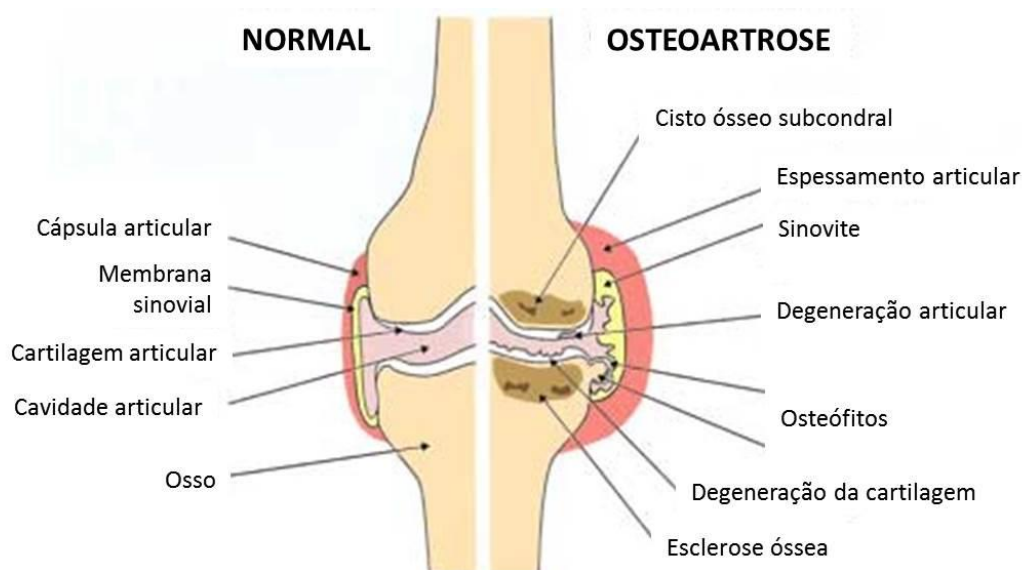


Figura 1. Alterações induzidas pela osteoartrite. Esquema representativo da articulação do joelho normal e com as alterações características da osteoartrite. Arquivo pessoal.

Atualmente, a OA é uma das doenças mais frequentemente diagnosticadas, afetando cerca de 15% da população mundial (11,12). Nos Estados Unidos, cerca de 100.000 (cem mil) pacientes relatam anualmente algum grau de dificuldade de locomoção em decorrência de OA do joelho e/ou do quadril (13). A OA acomete 10%

dos homens e 13% das mulheres americanas com idade acima de 60 anos, e essa incidência tende a aumentar devido ao crescimento dos índices de obesidade e envelhecimento da população (14). Atualmente, a OA afeta 37% das pessoas com 60 anos ou mais de idade que participaram da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição nos Estados Unidos da América (15).

Os fatores de risco para OA podem estar relacionados com o indivíduo, como idade avançada, gênero feminino, obesidade, fatores genéticos, etnia e dieta, ou relacionados com fatores mecânicos como trauma articular, mau alinhamento dos membros inferiores e sobrecarga anormal das articulações (16). Devido à alta prevalência nas articulações das extremidades inferiores, como o joelho e o quadril, a OA é a principal causa de incapacidade musculoesquelética em adultos (17).

A Academia Americana de Cirurgiões Ortopédicos (AAOS, do inglês *American Academy of Orthopedic Surgeons*) e o colégio Americano de Reumatologia, baseados em evidências científicas, publicaram recomendações para o tratamento da OA do joelho. A perda de peso e a realização de exercícios físicos aeróbicos de baixo impacto foram medidas recomendadas com forte significância. O uso de anti-inflamatórios não esteroides e as osteotomias para alinhamento do valgo ou varo também foram mencionados como eficientes no tratamento da OA nas fases iniciais. Por outro lado, a eficácia da utilização de ácido hialurônico intra-articular não foi confirmada pela AAOS (18).

2.2 Tratamento cirúrgico de osteoartrite do joelho

A artroplastia unicompartmental do joelho é utilizada no tratamento da OA do joelho com resultados bons e excelentes em relação à melhora funcional e redução

da dor, e se associa com índices de sobrevida de mais de 90% em 15 anos (19). Porém, este procedimento tem indicação restrita por substituir somente um compartimento do joelho, não impedindo a evolução da OA pela progressão do desgaste do restante da articulação. Além disso, este procedimento resulta em maior número de cirurgias de revisão em comparação à ATJ (20).

A ATJ consiste na substituição da articulação do joelho por uma prótese metálica (**Figura 2**) e é considerada o padrão ouro para o tratamento da OA em fase avançada com comprometimento articular grave, apresentando excelentes resultados clínicos com índices de sobrevida superiores a 90% em 20 anos de evolução (21).

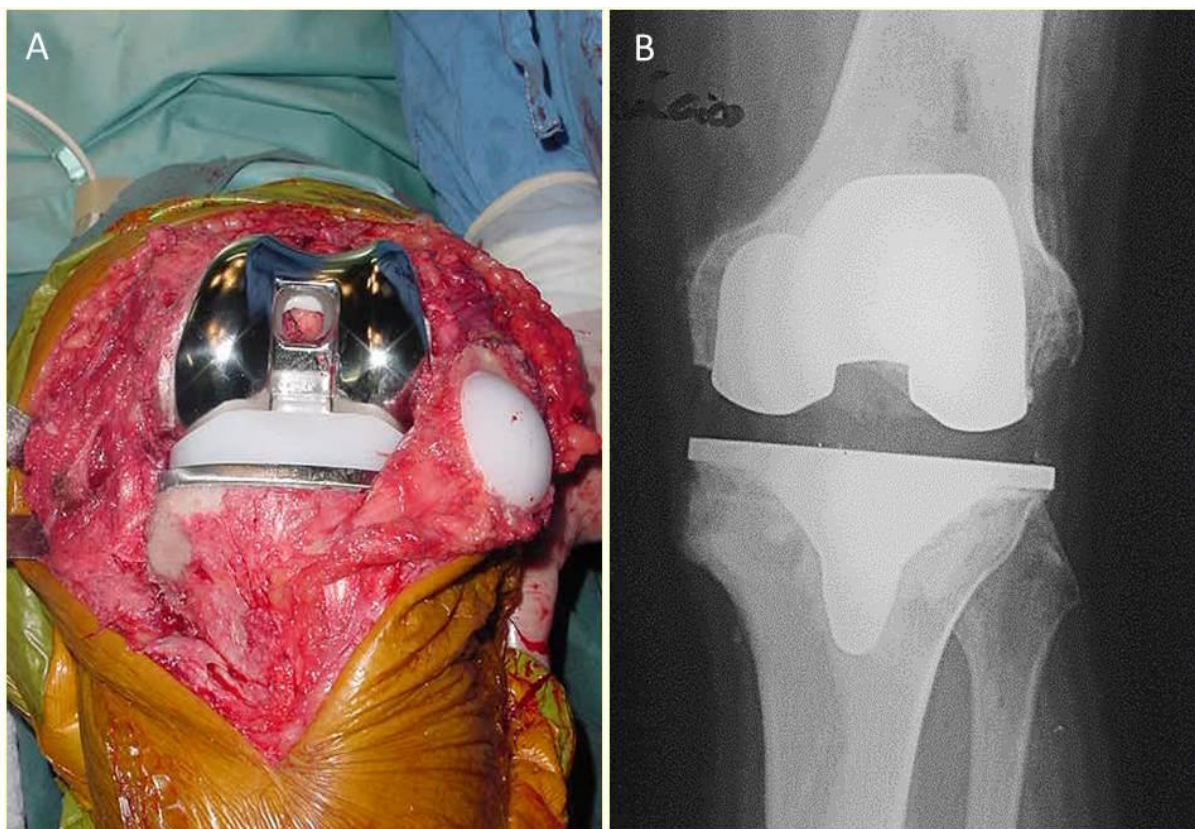


Figura 2. Artroplastia total do joelho. (A) Imagem intraoperatória mostrando a prótese implantada em substituição à articulação do joelho. (B) Radiografia em anteroposterior de pós-operatório de ATJ. Arquivo pessoal.

Anualmente são realizadas nos Estados Unidos aproximadamente um milhão de cirurgias para substituição da articulação do joelho (22). Até 2030 está previsto que serão realizados 3,48 milhões de procedimentos por ano, o que representa um aumento de 673% em relação ao ano de 2005. Associando esse número à expectativa de aumento de 174% no número de artroplastias totais primárias de quadril, estima-se que mais de quatro milhões de artroplastias primárias totais serão realizadas anualmente nos Estados Unidos (23).

A ATJ tem um custo efetivo de aproximadamente 15.000 dólares para o sistema de saúde norte-americano e um custo de 12.000 euros em média para os países da Europa (24,25). No que concerne à população de idade mais avançada é considerado custo efetivo, ainda que realizada em todos os grupos de risco (26). Um estudo publicado em 2009 demonstrou que a realização deste procedimento em hospitais de referência com grande volume de ATJ leva à melhor relação custo benefício, o que não ocorre nos centros de pequeno volume (26).

2.3 Falha de artroplastia

Apesar de ser considerado um procedimento seguro e efetivo, a artroplastia pode falhar. As causas de falha da artroplastia podem ser sépticas ou assépticas, e a incidência varia em diferentes estudos. Nos países desenvolvidos, a taxa de falha da ATJ é baixa, com relatos de menos de 5% no Reino Unido, 4% na Suécia, 5% na Nova Zelândia, e 6,8% na Austrália, em 10 anos (27,3).

Calliess et al. (2015), em uma avaliação retrospectiva de 1.449 revisões de ATJ, identificaram 40 causas diferentes de falha, sendo 68,5% assépticas e 31,5% sépticas. Da mesma forma, dados obtidos a partir dos principais registros de

artroplastias demonstram que a indicação mais comum para cirurgia de revisão de ATJ é o afrouxamento asséptico (29,8%), seguido por infecção (14,8%) e dor (9,5%) (3). Um estudo multicêntrico retrospectivo realizado em três centros de referência, entre 2000 e 2012, com 820 revisões de ATJ (693 pacientes), demonstrou que as sete principais indicações para a revisão foram o afrouxamento asséptico (23,1%), a infecção (18,4%), o desgaste do polietileno (18,1%), a instabilidade (17,7%), a presença de dor ou de rigidez (9,3%), a osteólise (4,5%) e o mau posicionamento/alinhamento dos componentes protéticos (2,9%). Ainda assim, a comparação com dados previamente publicados mostra menos indicações de revisão de ATJ para desgaste do polietileno, osteólise, instabilidade e mau alinhamento. Estas mudanças resultam do aperfeiçoamento das técnicas cirúrgicas e dos implantes utilizados (29).

Em contraponto, a análise dos dados de 60.355 revisões de ATJ do registro norte-americano de artroplastias no período de outubro de 2005 a dezembro de 2006 identificou que as causas mais comuns da falha de ATJ foram infecções (25,2%) e soltura do implante (16,1%) (6). Um estudo mais recente avaliou 11.134 ATJs primárias realizadas entre 2000 e 2015 e determinou que 6,1% dos pacientes necessitaram de cirurgia de revisão da artroplastia, sendo a falha séptica o principal motivo para a revisão (7).

Apesar de não ser a principal causa de falha na maioria das séries publicadas, a PJI é a segunda causa mais comum e apresenta elevado custo social e econômico. Estudos recentes mostram que a PJI resulta em índices de mortalidade mais altos que os observados em diversos tipos de câncer, variando entre 2 a 18% (6,8).

2.4 Infecção articular periprotética

A PJI é uma das complicações mais devastadoras das artroplastias. É definida como uma infecção que envolve a prótese articular e os tecidos adjacentes, podendo ocorrer a qualquer momento depois da cirurgia (30–32). Várias cirurgias apresentam risco de contaminação bacteriana, entretanto, aquelas que envolvem algum tipo de implante, como as cirurgias ortopédicas, esse risco é maior, uma vez que estes biomateriais estão propensos à formação de biofilmes (33).

A incidência desta complicação varia entre 1-23% e está associada à grande frustração tanto para o paciente como para o cirurgião. A introdução da antibioticoprofilaxia levou à redução substancial desses índices, mas a taxa de infecção associada à ATJ ainda se mantém entre 0,25% e 2% (34–36).

No Brasil, em um estudo realizado pelo Centro de Cirurgia do Joelho do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO) no período de 2004 a 2008, a infecção pós-ATJ foi a principal causa de falha precoce (49% de todas as falhas) e a segunda causa de falha tardia em 25% dos casos (38).

A PJI pode ser classificada quanto ao tempo de ocorrência em precoce, intermediária ou tardia. (39). Segundo a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA, do inglês *Infectious Diseases Society of America*), a PJI é classificada como precoce quando ocorre em menos de três meses após a cirurgia; intermediária quando ocorre de três a 24 meses após a cirurgia; e tardia quando ocorre com mais de 24 meses após a cirurgia (40). No entanto, essa classificação não é usual para o planejamento do tratamento das PJI, e uma nova classificação foi proposta com base na perspectiva de tratamento. Assim, a infecção é considerada

precoce quando ocorre até três semanas após a cirurgia e tardia quando se desenvolve acima desse período (41).

Em 1999, Tsukayama e colaboradores propuseram uma classificação das PJI em 4 tipos, de acordo com as principais características apresentadas: tipo I – pacientes submetidos à revisão por falha asséptica, em que há o crescimento de micro-organismo em culturas microbiológicas de amostras de tecidos ou de líquido sinovial coletados no ato intraoperatório; tipo II - infecção pós-operatória precoce, ocorrendo em até um mês após a cirurgia; tipo III - infecção aguda de uma articulação funcional, geralmente precedida por episódios de bacteremia, infecções em outros sítios, ou ocorrendo após a realização de procedimentos invasivos; e tipo IV - infecção tardia crônica, ocorrendo de forma insidiosa de um mês a dois anos após a cirurgia (42–44).

2.5 Diagnóstico da infecção articular periprotética

O diagnóstico da PJI representa um grande desafio à equipe envolvida no tratamento do paciente, principalmente pela ausência de um padrão de ouro para o seu diagnóstico. A primeira tentativa de padronização da definição de PJI foi proposta em 2011 pela Sociedade de Infecção Musculoesquelética (MSIS, do inglês *Musculoskeletal Infection Society*), iniciando assim a possibilidade de novos estudos e a padronização entre os diferentes trabalhos sobre este tema, devido ao estabelecimento de uma definição consistente da PJI. Em 2013, esta definição foi aprovada, com pequenas modificações, na Reunião de Consenso Internacional. De acordo com ambas as propostas, faz parte do diagnóstico da PJI achados de exames clínicos, testes séricos e sinoviais pré-operatórios e achados intraoperatórios.

Em 2018, foi proposta uma nova definição da PJI baseada em evidências. Este novo critério, construído a partir de uma colaboração multi-institucional, apresenta maior valor diagnóstico que as definições anteriores, tendo sido validado em uma série de pacientes. Novos biomarcadores e testes moleculares foram incorporados, e foi atribuído um sistema de pontuação ponderada para os diferentes testes propostos. (45,46).

De acordo com o algoritmo proposto de 2018, o diagnóstico de infecção periprotética é confirmado na presença de pelo menos um dos seguintes critérios maiores: (a) presença de fístula e (b) isolamento do mesmo patógeno em duas ou mais culturas microbiológicas do tecido periprotético ou líquido sinovial separadas entre si.

Além destes parâmetros, há um conjunto de critérios menores, aos quais foram atribuídos valores, que quando analisados em conjunto podem confirmar ou afastar o diagnóstico de PJI. Estes critérios menores são: (i) níveis séricos de proteína C reativa (PCR) ou D-dímero elevados; (ii) aumento da velocidade de hemossedimentação (VHS); (iii) aumento no número de leucócitos no líquido sinovial ou positividade no teste de esterase leucocitária ou positividade no teste de alfa-defensina; (iv) aumento de polimorfonucleares no líquido sinovial; (v) isolamento de patógeno(s) em apenas uma amostra de tecido periprotético ou de líquido sinovial; (vi) avaliação histopatológica da membrana periprotética positiva para infecção; e (vii) presença de purulência intraoperatória (**Quadro 1**).

Os pesos calculados da PCR sérica elevada (> 1 mg/dL), D-dímero (> 860 ng/ml) e VHS (> 30 mm/h) foram 2, 2 e 1 pontos, respectivamente. Além disso, contagem elevada de leucócitos no líquido sinovial (> 3000 células/ml), α -defensina (relação sinal-corte > 1), esterase leucocitária (++) , porcentagem de

polimorfonucleares (> 80%) e PCR sinovial (> 6,9 mg/L) receberam 3, 3, 3, 2 e 1 pontos, respectivamente.

Pacientes com escore agregado maior ou igual a 6 são considerados infectados, enquanto escore entre 2 e 5 requerem a inclusão dos achados intraoperatórios para confirmação ou refutação do diagnóstico. Os achados intraoperatórios são exame histopatológico positivo, presença de purulência e cultura positiva única, sendo atribuídos, respectivamente, 3, 3 e 2 pontos. Combinado com o escore pré-operatório, um total maior ou igual a 6 é considerado infecção, um escore entre 4 e 5 é considerado inconclusivo, e um escore menor ou igual a 3 refuta a hipótese diagnóstica de PJI. Os novos critérios demonstraram uma sensibilidade superior de 97,7% em comparação com a definição do MSIS (79,3%) e da Reunião de Consenso Internacional (86,9%), com uma especificidade semelhante de 99,5% (46).

Quadro 1. Algoritmo para diagnóstico da infecção articular periprotética do consenso de infecções articulares 2018.

Critérios maiores (pelo menos um positivo)	Decisão
Duas culturas positivas para o mesmo micro organismo	Infectado
Fístula	

Diagnóstico pré operatório	Critérios menores		Pontuação	Decisão
	Soro	PCR ou d-Dímero elevados	2	≥ 6 Infectado
		VHS elevado	1	
	Líquido sinovial	Contagem de leucócitos elevada ou esterase leucocitária positiva	3	2-5 Possivelmente infectado *
		Alfa defensina positivo	3	
		% PMN elevado	2	
		PCR elevado	1	

Diagnóstico intra operatório	Critérios pró operatórios inconclusivos ou ausência de LS	Pontuação	Decisão
	Escore pré-operatório	-	≥ 6 Infectado
	Histopatológico positivo	3	4-5 Possivelmente infectado
	Presença de purulência	3	
	Uma cultura positiva	2	≤ 3 Não infectado

Outra definição recente sobre infecção periprotética é a da Sociedade Europeia de Infecções Ósseas e Articulares (EBJIS, do inglês *European Bone and Joint Infection Society*), sendo apoiada pela MSIS. Este critério diagnóstico foi estabelecido a partir de uma revisão extensa da literatura sobre o tema, discussão com membros da Sociedade e especialistas da área, e avaliação por um painel de especialistas, resultando em um conjunto de definições e orientações. Os níveis de definição foram escolhidos para fornecer os dados mais úteis para a tomada de decisão clínica em cada cenário (47).

Quadro 2. Algoritmo para diagnóstico de infecção articular periprotética da Sociedade Europeia de Infecções Ósseas e Articulares.

	Infecção improvável (todos os achados negativos)	Possivelmente infectado (dois achados positivos)	Infecção confirmada (qualquer achado positivo)
Exames clínicos e sorológicos			
Características clínicas	Presença de causas alternativas evidentes para falha do implante (ex: fratura, tumor, mal posicionamento)	<ul style="list-style-type: none"> • Sinais radiográficos de soltura nos primeiros cinco anos após a colocação do implante • Problemas prévios de cicatrização • Histórico de febre ou bacteremia recentes • Purulência ao redor do implante 	Fístula
Proteína C reativa		> 10 mg/l (1 mg/dl)	
Citometria do líquido sinovial			
Contagem de leucócitos (cells/ μ l)	\leq 1,500	> 1,500	>3,000
PMN (%)	\leq 65%	> 65%	> 80%
Biomarcadores do líquido sinovial			
Alfa defensina			Resultado positivo no imuno ensaio ou teste lateral
Microbiologia			
Artrocentese		Cultura positiva	
Intra-operatório (tecidos e fluidos)	Todas as culturas negativas	Uma cultura positiva	\geq 2 culturas positivas para o mesmo microorganismo
Sonicação (CFU/ml)	Sem crescimento	> 1 CFU/ml de qualquer microorganismo	> 50 CFU/ml de qualquer microorganismo
Histologia			
Grande aumento (magnificação de 400x)	Negativo	Presença de \geq cinco neutrófilos por campo de grande aumento	Presença de \geq cinco neutrófilos em \geq cinco campos de grande aumento
			Presença de microorganismos visíveis
Outros			
Imagem nuclear	Cintilografia óssea trifásica negativa	Cintilografia com leucócitos marcados positiva	

PMN: polimorfonucleares. CFU: unidades formadoras de colônia.

2.6 Fisiopatologia da infecção articular periprotética

A maioria dos casos de PJI ocorre até um ano após a cirurgia, podendo ocorrer por contaminação direta do implante ou dos tecidos adjacentes durante a cirurgia, por disseminação contígua de um sítio adjacente infectado ou por via hematogênica (30). As bactérias são os principais patógenos associadas à PJI, estando os cocos gram-positivos envolvidos na maioria dos casos de infecção após artroplastias de quadril ou joelho. As infecções por *Staphylococcus aureus* e outros

estafilococos coagulase negativa representam aproximadamente 60% dos casos (30).

As PJI estão frequentemente associadas à formação de biofilmes bacterianos que aderem à superfície do implante. Os biofilmes são estruturas complexas, formando verdadeiras comunidades de micro-organismos, envoltos por uma matriz extracelular rica em polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. Estas estruturas podem ser mono ou polimicrobianas e fornecem um arcabouço que, além de favorecer o crescimento das bactérias, serve como uma proteção contra a ação do sistema imune e de antibióticos. A formação de biofilmes impacta a patogênese, diagnóstico e tratamento da PJI (**Figura 3**) (48).

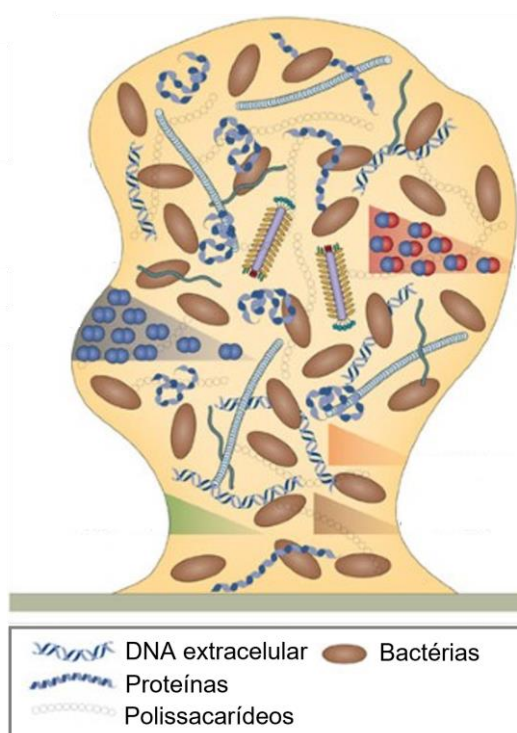


Figura 3. Biofilme bacteriano. Figura esquemática representando os componentes estruturais dos biofilmes bacterianos. Adaptado de McDougald et al., 2012.

A PJI deflagra uma extensa resposta inflamatória no microambiente articular, caracterizada por um importante infiltrado de células inflamatórias, composto principalmente por neutrófilos (**Figura 4**) (30,49). Os neutrófilos são as células mais abundantes do sistema imunológico humano e altamente eficientes na eliminação de patógenos. Estas células são ricas em grânulos citoplasmáticos que contêm diversas proteínas e moléculas com ação antimicrobiana. Uma vez que este arsenal antimicrobiano dos neutrófilos também pode danificar os tecidos do hospedeiro, sua ativação é rigidamente regulada, e sua atuação se faz por meio de três estratégias principais: fagocitose, degranulação e liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*) (50).

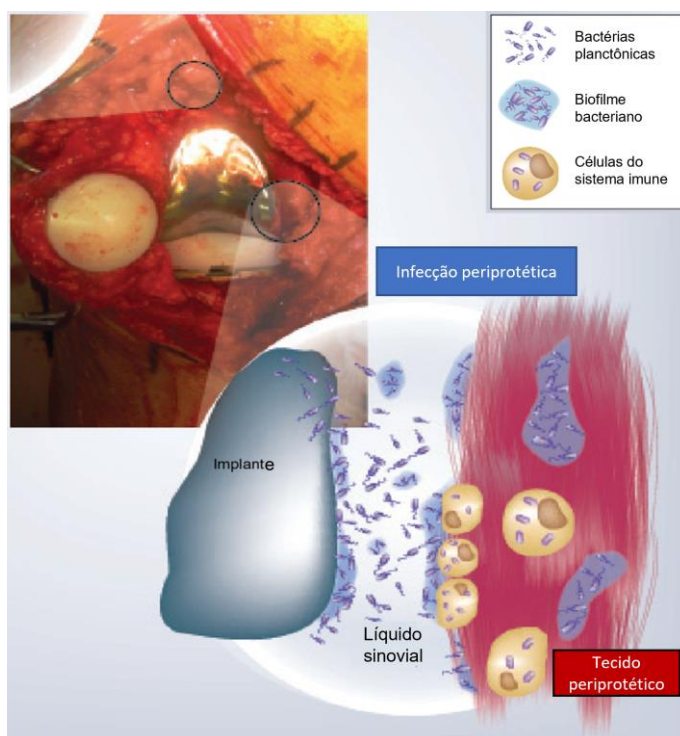


Figura 4. Infecção articular periprotética. Imagem representativa do microambiente articular no contexto da infecção periprotética, com a formação do biofilme bacteriano na superfície do implante e presença de células do sistema imune, principalmente neutrófilos. Adaptado de McConoughey et al., 2014.

As NETs são estruturas extracelulares compostas por DNA, proteínas citosólicas e granulares (**Figura 5**) (51). A maioria do DNA que forma as NETs é

proveniente do núcleo, no entanto essas estruturas também podem conter DNA de origem mitocondrial. As NETs podem prender, neutralizar e matar bactérias, fungos, vírus e parasitas, e já foi demonstrado que são capazes de prevenir a disseminação desses micro-organismos (47,48).

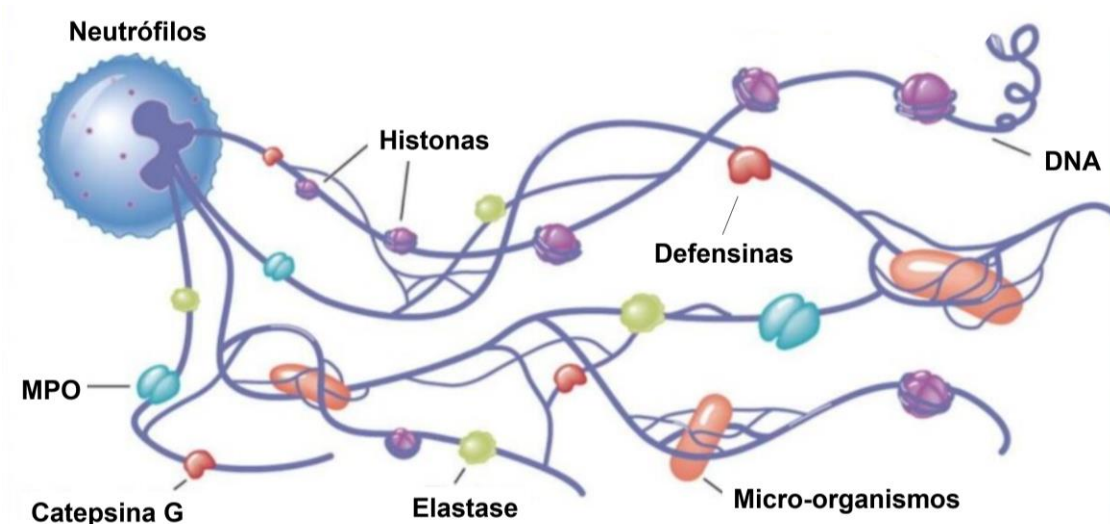


Figura 5. Estrutura das redes extracelulares de neutrófilos. Figura esquemática representando as diferentes biomoléculas que compõem as redes extracelulares de neutrófilos. Adaptado de Miyata e Fan (2012).

A primeira descrição da liberação de NETs pelos neutrófilos foi feita por Brinkmann et al. em 2004, tendo sido relatado que neutrófilos estimulados *in vitro* liberavam DNA descondensado que formava uma estrutura extracelular semelhante a uma teia, permeada por proteínas bactericidas (52). Atualmente, a liberação de NETs é considerada parte importante da resposta imune inata (53).

O processo de liberação das NETs é chamado de NETose e pode ser ativado tanto por determinados tipos de micro-organismos quanto por citocinas e outros fatores liberados no processo inflamatório. Classicamente, a NETose é um mecanismo de morte celular caracterizado pelo rompimento do envelope nuclear e descondensação da cromatina, os quais se misturam aos componentes

citoplasmáticos e granulares. A membrana plasmática então se permeabiliza e as NETs se expandem para o espaço extracelular de 3 a 8 horas após a ativação dos neutrófilos (**Figura 6**). Um mecanismo alternativo, denominado NETose não lítica, leva à rápida liberação de NETs dentro de minutos após a exposição a *Staphylococcus aureus* via liberação de cromatina e conteúdo dos grânulos e na ausência de morte celular (48-50).

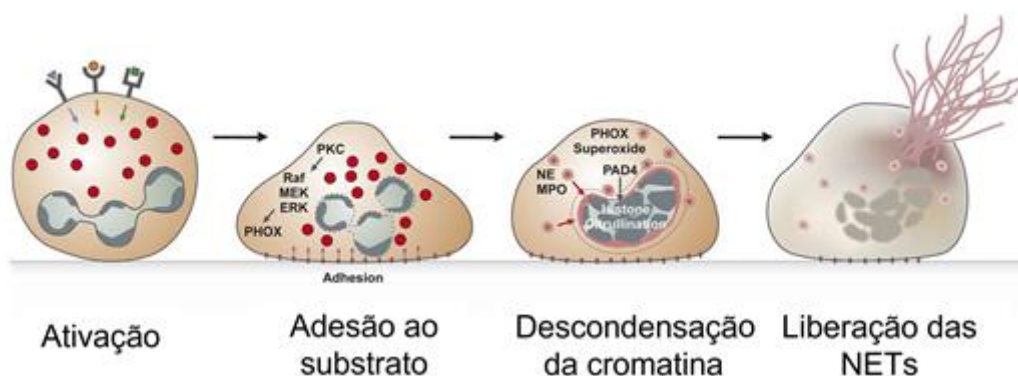


Figura 6. NETose. Figura esquemática do processo de NETose, evidenciando as principais etapas deste a ativação dos neutrófilos até a liberação das NETs. Adaptado de Brinkman e Zychlinsky, 2012.

Inicialmente, foram identificadas 24 proteínas nas NETs formadas pela estimulação de neutrófilos, dentre elas histonas, elastase, mieloperoxidase, calprotectina, catelicidinas, defensinas e actina (54). Outros estudos subsequentes ampliaram essa lista, sugerindo que a composição das NETs pode ser alterada dependendo do estímulo (55).

A resposta inflamatória é essencial para o controle da infecção, sendo a morte celular um dos eventos mais comuns nos processos infecciosos (56). A ativação de células do sistema imune resulta na liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias e fatores citotóxicos, e na ativação de mecanismos de citotoxicidade mediada por células que podem resultar em extensa lesão tecidual e morte celular, como um

efeito colateral da ativação do sistema imune (57). Além disso, a indução da morte de células do hospedeiro é um mecanismo intrínseco do sistema imune em resposta a infecções. Em infecções bacterianas, por exemplo, a apoptose, um tipo de morte celular programada, é deflagrada como parte da resposta imune inata (58). A indução de morte de células do hospedeiro já foi demonstrada em infecções bacterianas, virais, fúngicas e por parasitas (56).

Diversos tipos de morte celular podem ser deflagrados no contexto infeccioso, como piroptose, apoptose e necrose, além da NETose mencionada anteriormente. A apoptose é um tipo de morte celular não inflamatória, caracterizada pelo encolhimento celular, liberação de fragmentos de membrana, ativação de caspases e fragmentação do DNA. Na morte celular do tipo necrose, há aumento do tamanho do núcleo, ruptura da membrana celular e liberação do conteúdo celular. Já a piroptose é um tipo de morte celular programada, que envolve a ativação do inflamassomo, caracterizada pela ruptura da membrana celular, fragmentação do DNA e liberação de citocinas inflamatórias (56,58).

A ativação dos diferentes tipos de morte celular é rigidamente regulada e dependente de diferentes fatores como a natureza do patógeno, o sítio de infecção e a carga de patógenos (56).

2.7 DNA livre

O DNA livre de células é definido como DNA extracelular que ocorre no soro, plasma, ou outros fluidos biológicos, como urina, saliva e líquido sinovial. Ele tem sido amplamente estudado pelo seu potencial como biomarcador para a detecção e monitoramento de várias doenças humanas, entre elas acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, sepse, pancreatite aguda e câncer (59).

Mendel e Metais (1948) foram os primeiros a relatar a presença de DNA livre circulante no plasma (60). Os autores detectaram DNA e RNA livres no plasma de indivíduos e pacientes saudáveis, entretanto seu relato passou despercebido devido à falta de entendimento claro naquela época sobre o ácido nucleico circulante. Mais tarde, ficou claro que a análise e quantificação do DNA plasmático livre de células poderia servir como uma ferramenta diagnóstica valiosa (61).

O DNA livre refere-se a fragmentos de DNA de fita dupla presentes nos fluidos extracelulares, com comprimento médio entre 160 e 180 pares de base. Estudos apontam que estas moléculas de DNA podem estar associadas a vesículas extracelulares ou podem fazer parte de complexos macromoleculares como os nucleossomos. Devido à sua grande fragmentação, geralmente se assume que o DNA livre está associado a mecanismos de morte celular, mas a origem e o mecanismo exato de sua liberação ainda são controversos (59,62).

O acúmulo de DNA livre no plasma pode resultar de uma liberação excessiva de DNA causada por morte celular massiva ou eliminação ineficiente de células mortas durante a inflamação (**Figura 7**). Assim, a concentração de DNA livre plasmático pode refletir a magnitude do dano celular, inflamação ou infecção (63). Em um contexto inflamatório, níveis aumentados de DNA livre circulante podem ser ainda resultado da ativação de neutrófilos e consequente liberação de NETs (64).

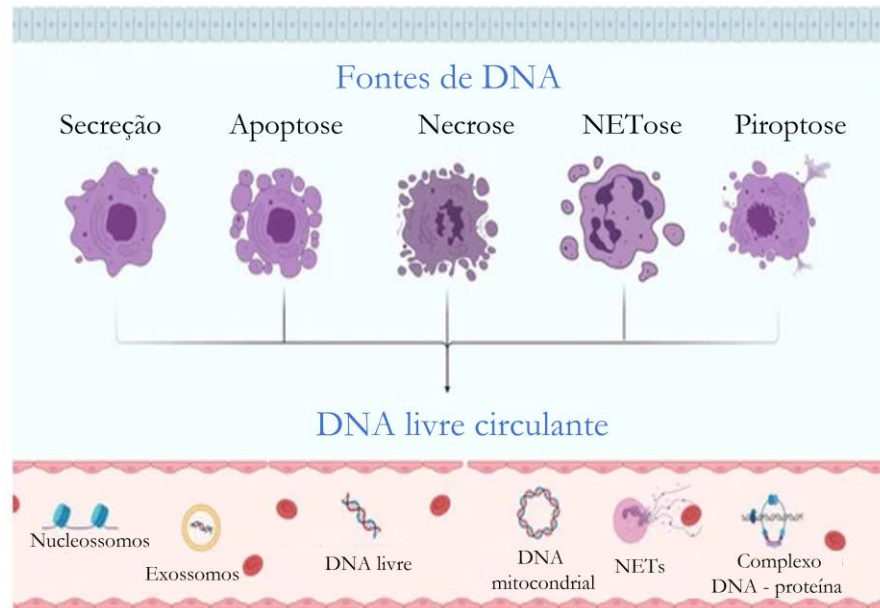


Figura 7. Fonte de DNA livre. A origem do DNA livre é associada a processos de morte celular como apoptose, necrose, NETose e piroptose. Adaptado de Mondelo-Macía et al. (2021).

As moléculas de DNA livre estão presentes apenas em quantidades limitadas no sangue de indivíduos saudáveis, uma vez que as células mortas e os restos de células mortas são removidos com eficiência, principalmente no fígado (63). Além da presença de DNA livre no plasma, alguns estudos descreveram sua presença no líquido sinovial de pacientes com doenças como a artrite reumatoide ou a artrite séptica do joelho, na presença ou não de artroplastia total de joelho (63).

Diversos estudos já evidenciaram a relação entre o aumento de DNA livre e processos infecciosos como tuberculose e infecções pulmonares (65,66). Em 2009, foi publicado um artigo que avaliou a liberação de NETs em pacientes com artrite séptica de joelho ou quadril, tendo sido observado aumento significativo de DNA livre no líquido sinovial de pacientes com artrite infecciosa em relação aos pacientes com artrite asséptica (63). Nesse estudo, foram incluídos alguns pacientes com PJI, porém não foi avaliado o valor diagnóstico deste biomarcador especificamente para esta condição. Dessa forma, nosso estudo se propõe a avaliar o valor diagnóstico da

quantificação de DNA livre na identificação de PJI e desenvolver uma metodologia rápida para quantificação deste biomarcador.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial diagnóstico da quantificação de DNA livre no líquido sinovial para a identificação da infecção articular periprotética de joelho.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar a concentração de DNA livre no líquido sinovial de pacientes com e sem infecção articular periprotética do joelho;
- Avaliar diferentes metodologias para quantificação de DNA no líquido sinovial e determinar o limiar de reatividade de cada método;
- Calcular os valores de sensibilidade, especificidade, para a quantificação de DNA livre no líquido sinovial nas diferentes metodologias avaliadas;
- Comparar a performance diagnóstica da quantificação de DNA livre com os exames preconizados pelo algoritmo do Consenso Internacional 2018 para diagnóstico da PJI.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos e participantes do estudo

A realização do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional sob parecer: 20307019.1.0000.5273 (Anexo A). Foi realizado um estudo prospectivo com pacientes submetidos à cirurgia de revisão de artroplastia de joelho no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad e na clínica privada do autor principal, com autorização prévia dos participantes do estudo mediante o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de acordo com as normas da Resolução do CNS nº 466 de 12/12/2012 (Anexo B). Foram incluídos pacientes de ambos os sexos com idade maior ou igual a 18 anos. Os critérios de exclusão foram: pacientes que se recusarem a assinar o TCLE e que não tinham informações suficientes para a conclusão do diagnóstico de infecção periprotética. Também foram excluídos pacientes com doenças inflamatórias crônicas, como lúpus e artrite reumatoide, e doenças infecciosas, como hepatite C e HIV.

Para confirmação do diagnóstico da PJI, foram utilizados os critérios do Consenso de 2018 (**Quadro 1**).

4.2 Coleta e processamento das amostras

Durante cirurgia de revisão de ATJ, foram coletadas amostras de membrana periprotética, utilizadas para as análises microbiológicas e avaliação histopatológica. Os fragmentos ósseos do fêmur e da tíbia foram coletados e usados nas análises microbiológicas. A coleta das amostras de

líquido sinovial foi realizada antes da incisão cirúrgica, após a colocação dos campos cirúrgicos e realização da isquemia através de punção, com seringa de 20 ml e agulha de 1,2 x 40 mm. O líquido sinovial coletado foi utilizado para a quantificação de DNA livre, análises de citometria global e específica e análise microbiológica. Os prontuários dos pacientes foram analisados para a coleta das seguintes informações: idade, peso, altura, comorbidades, data de realização de cirurgias prévias e resultados dos exames laboratoriais pré-operatórios (PCR, VHS).

4.3 Cultura microbiológica

Para as análises microbiológicas, foram usados fragmentos da membrana periprotética, fragmentos ósseos e líquido sinovial. A membrana e os fragmentos ósseos foram armazenados em frascos estéreis contendo soro fisiológico a 0,9%. Quanto ao líquido sinovial, entre 1 e 3 ml foram inoculados em frascos de hemocultura aeróbio e anaeróbio. Os materiais foram enviados para o laboratório de análises clínicas e microbiologia do INTO para realização da cultura microbiológica, de acordo com a rotina padrão adotada pelo laboratório do INTO. Os espécimes foram cultivados por até 14 dias, e as informações sobre o número de culturas positivas e tipo de micro-organismos isolados foram coletadas do laudo fornecido pelo laboratório.

4.4 Avaliação histopatológica

Para o exame histopatológico, fragmentos de membrana periprotética foram armazenados em frasco contendo formol a 10% e enviados para a

Unidade de Anatomia Patológica do INTO, onde foram processados e analisados de acordo com o protocolo institucional, sendo avaliados em grande aumento microscópico (400 x) por médico patologista. As membranas foram classificadas de acordo com os parâmetros propostos por Morawietz e colaboradores (2009) e corroborados por Krenn e colaboradores em 2014, em que a membrana periprotética é avaliada quanto às características do infiltrado inflamatório, presença de fibrose, presença de *debris* celulares e número de neutrófilos por campo (**Quadro 3**) (67,68).

Quadro 3. Classificação de Morawietz para avaliação da membrana periprotética.

Classificação	Característica
TIPO I	-Membrana periprotética com reação gigantohistiocitária a partículas de material sintético. -Ausência de critérios histológicos indicativos de infecção
TIPO II	- Membrana periprotética do tipo infecciosa - Análise histológica de tecido periprotético mostrando número ≥ 23 neutrófilos em 10 campos de grande aumento (400x)
TIPO III	- Membrana periprotética do tipo infecciosa com reação gigantohistiocitária a partículas de material sintético. - Análise histológica de tecido periprotético mostrando número ≥ 23 neutrófilos em 10 campos de grande aumento (400x)
TIPO IV	-Membrana periprotética do tipo fibrosa -Ausência de partículas de material sintético e de critérios histológicos indicativos de infecção

4.5 Análise do líquido sinovial

Uma alíquota de um mililitro do líquido sinovial, obtida na coleta intra-operatória, foi armazenada em tubo de coleta de sangue a vácuo, contendo EDTA e enviada imediatamente para o laboratório de análises clínicas do INTO, para realização da contagem de células brancas e porcentagem de

polimorfonucleares no líquido sinovial por meio de citometria de fluxo. O restante do líquido sinovial coletado foi enviado ao Centro de Processamento Celular do INTO. As amostras foram processadas em até duas horas, sendo centrifugadas a 4830 x g por 5 minutos, aliquotadas em microtubos e armazenadas em congeladores a -80 °C até as análises.

4.6 Quantificação de DNA livre

Os níveis de DNA livre no líquido sinovial foram avaliados utilizando o reagente Quant-it Picogreen dsDNA (Thermo Fisher Scientific, EUA) que intercala em DNA dupla fita. Para isso, o líquido sinovial foi descongelado, centrifugado por 10 minutos a 16.000 g e diluído cinquenta vezes em tampão Tris-EDTA. Cinquenta µL desta solução foram misturados a 50 µL do reagente Picogreen e adicionados nos poços de placa de 96 poços opaca da cor preta. A fluorescência foi medida utilizando o luminômetro GloMax Paradigm (Molecular Devices, EUA), com excitação em 485nm e emissão em 535nm (**Figura 8**). A quantidade de DNA foi determinada após correção do fator de diluição e comparação com os valores obtidos na curva padrão realizada com concentrações conhecidas de DNA Lambda controle, de acordo com as recomendações do fabricante.

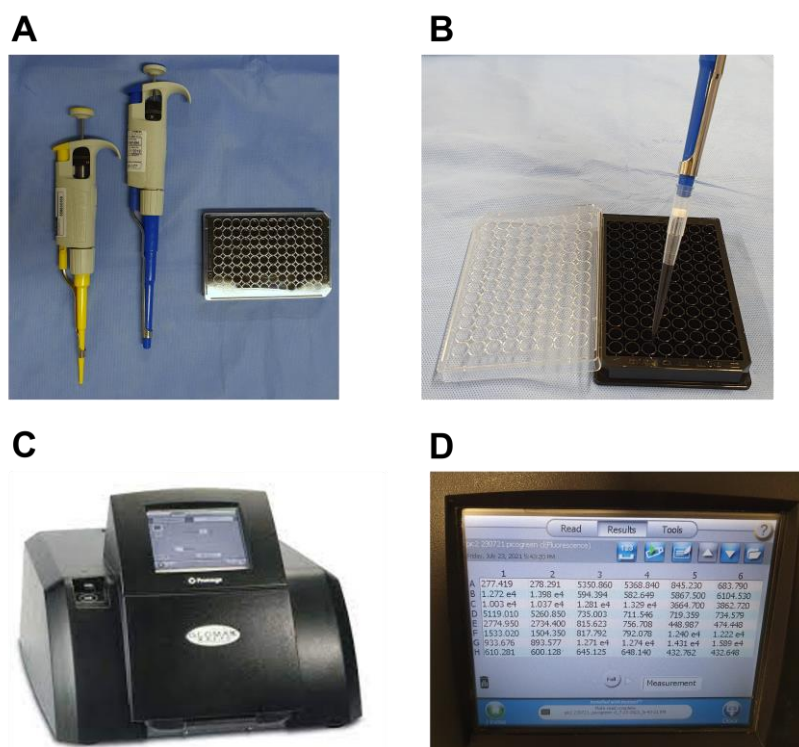


Figura 8. Etapas e equipamentos necessários para a quantificação de DNA livre nas amostras de líquido sinovial. (A) Pipetas e placa de 96 poços de fundo preto. (B) Pipetagem das amostras nos poços da placa opaca de fundo preto. (C) Luminômetro GlowMax utilizado para leitura da fluorescência. (D) Destaque no painel do aparelho mostrando os valores obtidos na leitura das amostras.

4.7 Quantificação de DNA livre em fluorímetro portátil

Para avaliação do método rápido de quantificação de DNA livre, foi utilizado o fluorímetro portátil Quantus (Promega, EUA). A calibração do aparelho foi realizada de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Foram utilizadas duas soluções padrão com concentração de DNA lambda de 20 e 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. As configurações de calibração ficam salvas no aparelho.

Para a quantificação de DNA livre, o líquido sinovial foi descongelado e centrifugado por 10 minutos a 16.000g. Quatro microlitros de LS foram adicionados a 96 μl de tampão Tris-EDTA. Esta solução foi transferida para um microtubo de 600 μl , e foram adicionados 100 μl do reagente Picogreen dsDNA. A amostra foi incubada no escuro e a leitura foi realizada após cinco

minutos. Para esta quantificação, não foi necessário ajustar a diluição, uma vez que o aparelho faz este ajuste automaticamente (**Figura 9**).

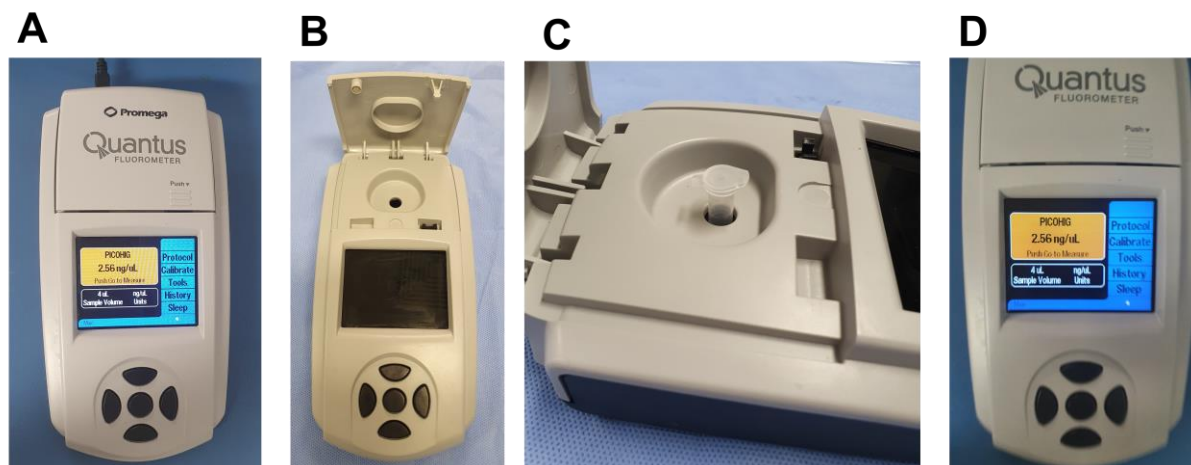


Figura 9. Etapas e equipamentos necessários para a quantificação de DNA livre nas amostras de líquido sinovial utilizando fluorímetro portátil. (A) Visão superior do fluorímetro portátil. (B) Compartimento para colocação do tubo contendo a amostra. (C) Destaque para o posicionamento do microtubo contendo a amostra no aparelho. (D) Painel do aparelho após a leitura, indicando a concentração de DNA livre na amostra.

4.8 Análise dos resultados

Considerando o número baixo de revisões de ATJ realizadas anualmente no INTO, o tamanho da amostra foi calculado considerando o número médio de procedimentos realizados por ano, tendo sido estabelecido um período de recrutamento dos participantes por dois anos.

Para análise descritiva dos dados relativos às características clínicas e demográficas dos pacientes foram calculadas médias, medianas, desvio padrão, intervalo interquartil (IIQ) e proporções. As variáveis categóricas foram expressas através de suas frequências e porcentagens. Os valores de sensibilidade (verdadeiros positivos (VP) / [VP + falso negativos (FN)]) e especificidade (verdadeiros negativos (VN) / [falsos positivos (FP) + VN]),

assim como a área sob a curva (AUC, do inglês “*area under the curve*”) ROC (do inglês “*receiver operator characteristic*”), foram calculados considerando-se como padrão ouro a adaptação dos critérios definidores de infecção propostos em 2018 (46). A acurácia dos métodos diagnósticos propostos foi calculada pelo somatório dos VP e dos VN, dividido pelo número de testes feitos. Variáveis contínuas foram analisadas pelo teste T-student ou Mann-Whitney, quando indicado. O valor de p foi considerado significativo quando menor que 0,05. Todas as análises foram realizadas utilizando os softwares Med Calc versão 21 e GraphPad Prism versão 7.0.

5.1 População de estudo

Foram incluídos no estudo 69 pacientes. A partir da avaliação dos dados clínicos e exames laboratoriais, os pacientes foram avaliados quanto ao diagnóstico de PJI de acordo com os critérios propostos em 2018. Sendo assim, 29 pacientes foram incluídos no grupo infecção e 40 pacientes, por não preencherem os critérios diagnósticos, compuseram o grupo não infecção. As características demográficas de ambos os grupos estão resumidas na **Tabela 1**. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à idade ($p= 0,77$), sexo ($p= 0,8$ e IMC ($p=0,92$).

Tabela 1. Características da população de estudo.

	Não infecção (n=40)	Infecção (n=29)	P
Sexo			
Masculino	14 (35%)	11 (38%)	0,8 ^a
Feminino	26 (65%)	18 (62%)	
Idade (anos), mediana [IIQ]	70,9 [67-76]	70,5 [63-78]	0,77 ^b
IMC (kg/m²), mediana [IIQ]	31,62 [27-34]	32,2 [26-33]	0,92 ^b
Implante prévio			
Primária	35	20	0,07 ^a
Revisão	5	9	

Dados apresentados com mediana com amplitude interquartilica, ou soma com a respectiva percentagem. ^a Teste de Fischer. ^b Teste de Mann Whitney. IMC: índice de massa corporal

Dos pacientes do grupo infecção, seis apresentaram fístula. Vinte pacientes apresentaram crescimento de micro-organismos na cultura microbiológica de duas ou mais amostras. Oito deste pacientes apresentavam infecções polimicrobianas. O

patógeno mais frequentemente identificado foi o *Staphylococcus aureus*. Na **tabela 2** estão descritas as bactérias identificadas nas culturas microbiológicas dos pacientes com PJI e a frequência com que foram identificadas.

Os valores de sensibilidade e especificidade encontrados para o teste microbiológico foram 68,9% [IC 95%: 49,1 – 84,7] e 100% [IC 95%: 91,1 – 100], respectivamente.

Tabela 2. Perfil microbiológico dos pacientes do grupo infecção.

Patógeno	Frequência N (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	9 (31%)
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	6 (21%)
<i>Streptococcus spp</i>	2 (7%)
<i>Enterococcus spp</i>	3 (10%)
Gram negativas	7 (24%)
Polimicrobiana ^a	8 (27%)
Cultura negativa	9 (31%)

^a ≥ 2 dois patógenos diferentes. O número total / porcentagem de pacientes com cultura positiva é >20/100% devido aos 8 pacientes com infecções polimicrobianas.

5.2 Exames laboratoriais

Em relação a quantificação de PCR no plasma dos pacientes, a média do grupo infecção foi significativamente maior que a observada no grupo não infectado ($1,08 \pm 1,1$ vs $9,48 \pm 9,8$, $p < 0,0001$) (**Figura 10A**). Considerando os valores de corte propostos pelo consenso em 2018, quinze pacientes do grupo não infecção apresentaram resultado acima do valor de corte, indicando resultado falso positivo.

Dois pacientes do grupo infecção apresentaram valor de PCR < 1mg/dl. Dessa forma, para nossa casuística encontramos valores de sensibilidade e de especificidade de 92% [IC 95%: 73,9 – 99] e 51,6% [IC 95%: 33,06 – 69,8], respectivamente.

Quanto ao VHS, a média observada no grupo infecção foi significativamente maior que a observada no grupo de pacientes não infectados ($39,5 \pm 25,4$ vs $82,7 \pm 23,2$, $p < 0,0001$) (**Figura 10B**). Um paciente do grupo infecção apresentou valor de VHS abaixo do ponto de corte preconizado pelo consenso internacional. No grupo não infecção, dezessete pacientes apresentaram valores de VHS acima do ponto de corte, indicando resultados falso positivo. Para este exame, a sensibilidade foi de 95% [IC 95%: 75,1 – 99,8] e a especificidade de 41,4% [IC 95%: 23,5 – 61,1].

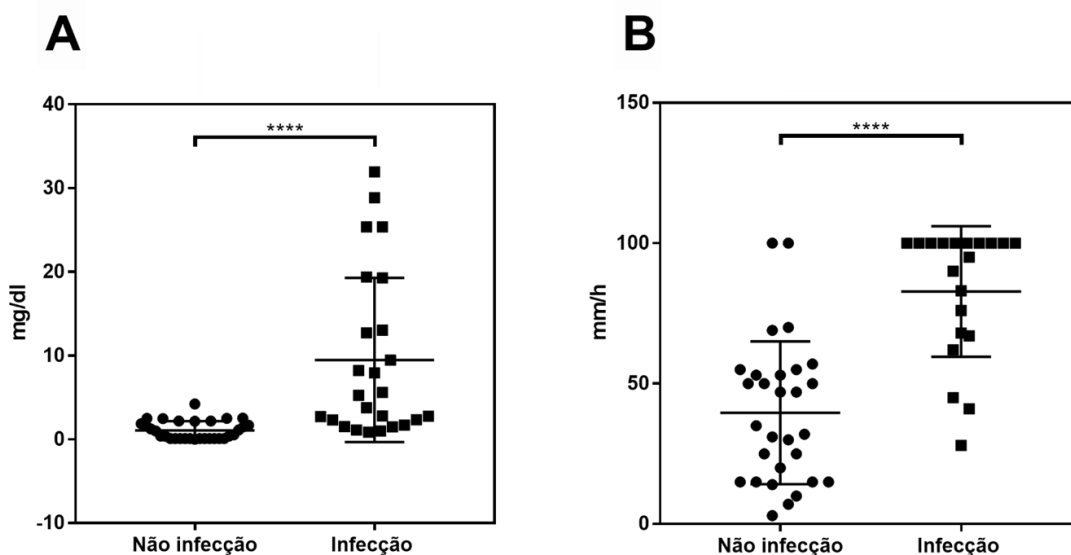


Figura 10. Avaliação da proteína C reativa e da velocidade de hemossedimentação. A PCR (A) e a VHS (B) dos pacientes foram quantificadas no pré-operatório. Cada símbolo representa os valores obtidos para cada paciente. A linha horizontal central representa a média obtida para cada grupo e as linhas das extremidades representam o desvio padrão. **** $p < 0,0001$. PCR: proteína C reativa; VSH: velocidade de hemossedimentação. Teste Mann Whitney.

Na avaliação do líquido sinovial, foram encontrados níveis significativamente maiores de leucócitos nos pacientes do grupo infecção em relação ao grupo não

infectado (54598 ± 250088 vs 742376 ± 148159 , $p=0,0005$) (**Figura 11A**). Quatro pacientes do grupo infecção apresentaram valores abaixo do ponto de corte preconizado pelo consenso internacional, e cinco pacientes do grupo não infecção apresentaram resultado acima do ponto de corte. Dessa forma, os valores de sensibilidade e de especificidade encontrados foram de 75% [IC 95%: 47,6 – 92,7] e 81,5% [IC 95%: 61,9 – 93,7], respectivamente.

Quanto à avaliação do percentual de polimorfonucleares no líquido sinovial, foram identificados níveis significativamente maiores nos pacientes com infecção em relação aos pacientes sem infecção ($19,4 \pm 12,9$ vs $67,9 \pm 29,7$, $p < 0,0001$) (**Figura 11B**). Oito pacientes do grupo infecção apresentaram percentual abaixo do ponto de corte determinado pelo consenso internacional. Nenhum paciente do grupo não infecção apresentou percentual de polimorfonucleares acima do ponto de corte. Para este parâmetro, a sensibilidade foi de 50% [IC 95%: 24,6 – 75,3] e a especificidade de 100% [IC 95%: 87,3 – 100].

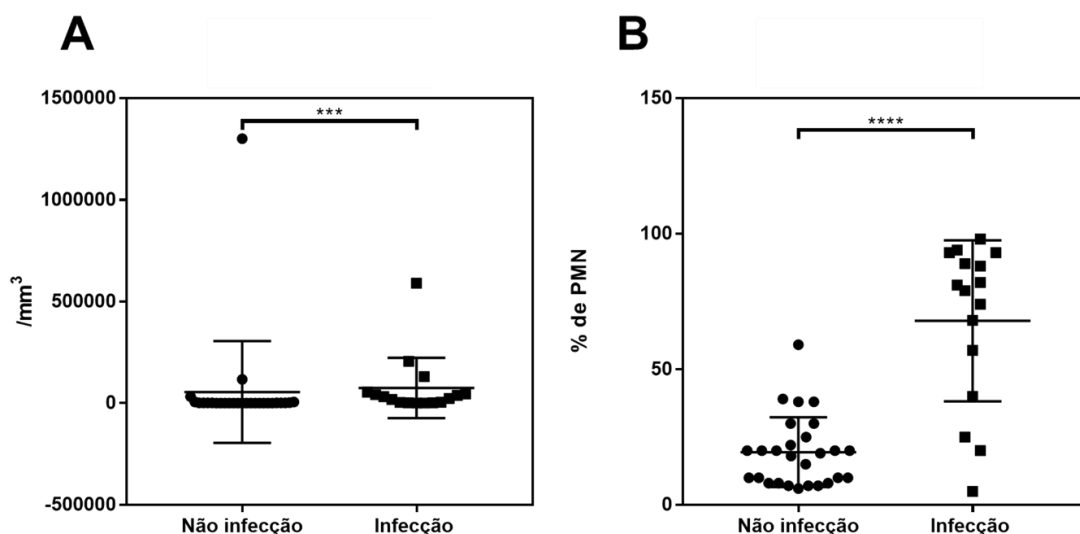


Figura 11. Contagem de células brancas e percentual de polimorfonucleares. Foi determinada a citometria global (A) e o percentual de polimorfonucleares (B) no líquido sinovial. Cada símbolo representa os valores obtidos para cada paciente. A linha horizontal central representa a média obtida para cada grupo e as linhas das extremidades representam o desvio padrão. *** $p=0,0005$, **** $p < 0,0001$. Teste de Mann Whitney.

5.3 Quantificação de DNA livre no líquido sinovial

A quantificação de DNA livre no líquido sinovial foi realizada por ensaio fluorimétrico com a sonda Picogreen. Os níveis de DNA livre no líquido sinovial dos pacientes do grupo infecção foi de $124,8 \pm 56,6$ ng/ μ l, sendo significativamente maior que o encontrado nos pacientes do grupo não infecção, que foi de $4,6 \pm 2,8$ ng/ μ l ($p < 0,0001$) (Figura 12).

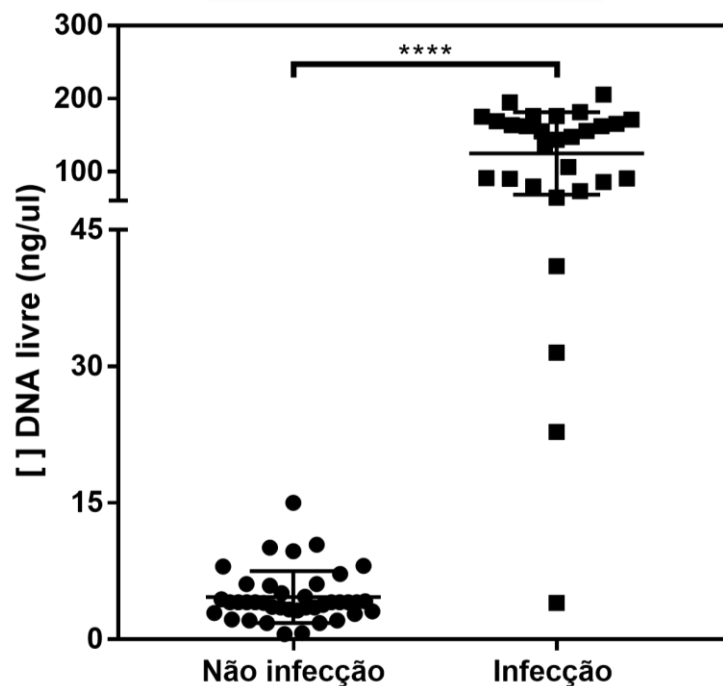


Figura 12. Quantificação de DNA livre. Os níveis de DNA livre foram determinados utilizando a sonda Picogreen. Cada símbolo representa os valores obtidos para cada paciente. A linha horizontal central representa a média obtida para cada grupo e as linhas das extremidades representam o desvio padrão. **** $p < 0,0001$. Teste de Mann Whitney.

A área sob a curva ROC foi calculada, e o resultado foi de 0,981 [0,914 — 0,999]. O limiar de reatividade foi determinado de acordo com o índice de Youden usando curvas ROC. O ponto do corte ideal foi de 15 ng/ μ l, e os valores de

sensibilidade e de especificidade foram de 96,5% e 100%, respectivamente (**Figura 13**).

Considerando este limiar de reatividade, identificamos um paciente do grupo infecção com nível de DNA livre abaixo do ponto de corte. Nenhum paciente do grupo não infecção apresentou níveis de DNA livre acima de 15ng/μl (**Figura 13**).

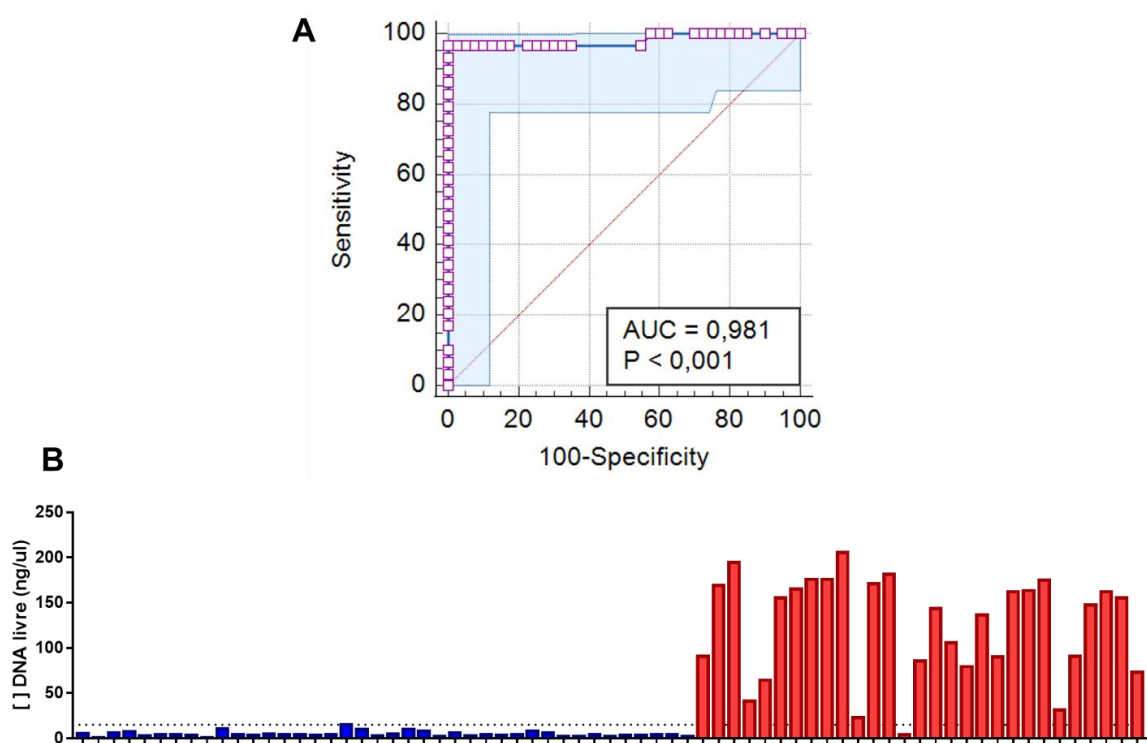


Figura 13. Curva ROC para quantificação de DNA livre. (A) Curva ROC. (B) Valores de DNA livre no líquido sinovial dos pacientes do grupo não infecção (azul) e infecção (vermelho). A linha tracejada indica o limiar de reatividade calculado.

Com o objetivo de estabelecermos um teste rápido de quantificação do DNA livre, avaliamos a quantificação deste biomarcador utilizando um fluorímetro portátil. Através desta metodologia, também observamos níveis significativamente maiores deste biomarcador nos pacientes do grupo infecção ($40,4 \pm 14,5$) em relação aos pacientes sem infecção ($3,3 \pm 2,5$, $p < 0,0001$) (**Figura 14**).

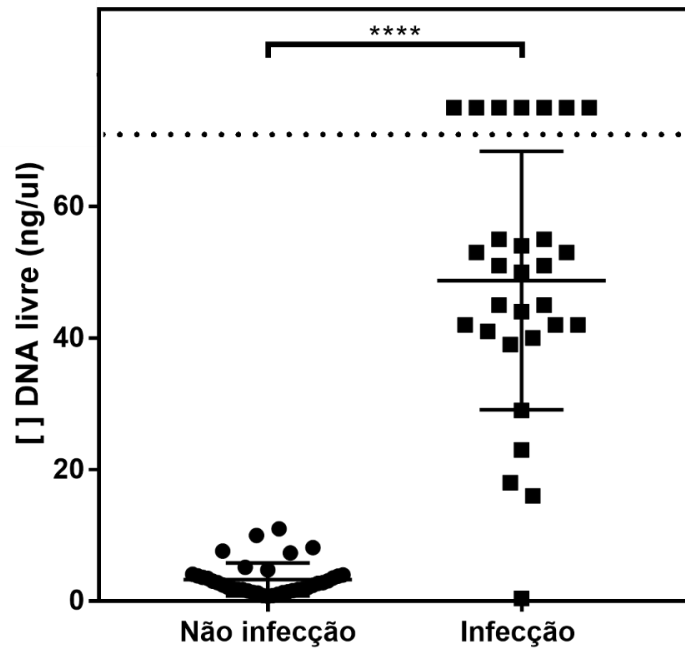


Figura 14. Quantificação de DNA livre utilizando fluorímetro portátil. Os níveis de DNA livre foram determinados utilizando a sonda Picogreen e um fluorímetro portátil. Cada símbolo representa os valores obtidos para cada paciente. A linha horizontal central representa a média obtida para cada grupo e as linhas das extremidades representam o desvio padrão. **** $p < 0,0001$. Teste de Mann Whitney.

A área sob a curva ROC foi calculada, e o resultado foi de 0,955 [0,867 — 0,992] (**Figura 15**). O limiar de reatividade ideal foi de 11 ng/μl, e os valores de sensibilidade e de especificidade foram 95,5% e 100%, respectivamente.

Utilizando este limiar de reatividade, de forma semelhante ao observado nas análises com o luminômetro de bancada, identificamos quatro pacientes do grupo infecção com valores de DNA livre abaixo do ponto de corte. Nenhum paciente do grupo não infecção apresentou níveis de DNA livre acima de 11ng/μl (**Figura 15**).

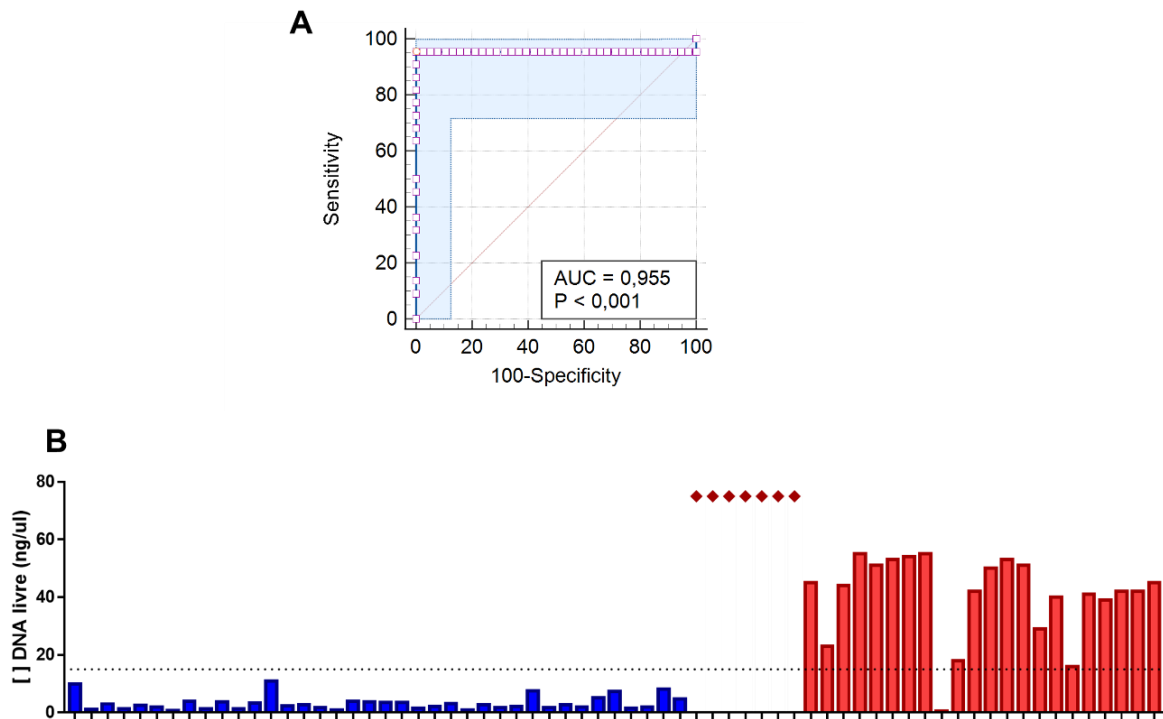


Figura 15. Curva ROC para quantificação de DNA livre utilizando fluorímetro portátil. (A) Curva ROC. (B) valores de DNA livre no líquido sinovial dos pacientes do grupo não infecção (azul) e infecção (vermelho). A linha tracejada indica o limiar de reatividade calculado.

Os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia de todos os testes avaliados são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Avaliação do desempenho diagnóstico dos testes avaliados no estudo.

Exame	Sens.	Especif.	Acur.
Cultura microbiológica	68,9%	100%	86,9%
PCR	92%	51,6%	69,6%
VHS	95%	41,4%	63,2%
Leuco LS	75%	81,5%	79%
% PMN LS	50,0%	100%	81,3%
Histopatológico	50%	100%	87,5%
DNA livre	96,5%	100%	98,5%
DNA livre (portátil)	96,5%	100%	98,5%

Abreviações: PCR: proteína C reativa; VHS: velocidade de hemossedimentação; Leuco LS: contagem de células brancas no líquido sinovial; % PMN LS: percentual de células polimorfonucleares no líquido sinovial; Sens.: sensibilidade; Especif.: especificidade; Acur.: Acurácia.

A definição e os critérios para o diagnóstico da PJI ainda são alvo de extensos debates nas comunidades médica e científica. A falta de um critério diagnóstico absoluto, a heterogeneidade nas suas formas de apresentação e as lacunas existentes sobre os processos de interação entre patógenos e hospedeiros tornam o diagnóstico desta complicação um enorme desafio (69,70).

Nosso estudo é o primeiro a mostrar o aumento de DNA livre no líquido sinovial de pacientes com PJI e a avaliar o potencial diagnóstico da quantificação deste biomarcador para identificação da PJI. Além disso, conseguimos estabelecer um sistema rápido e portátil para quantificação de DNA livre, que pode ser realizado em menos de cinco minutos, fornecendo os resultados ainda durante a cirurgia.

Nos últimos anos, diversos pesquisadores vêm apontando a superioridade de biomarcadores presentes no líquido sinovial no diagnóstico da PJI (69). Estes biomarcadores são, invariavelmente, proteínas produzidas por células do sistema imune, envolvidas no processo de eliminação dos patógenos. Na presença de infecção, há um aumento na concentração de tais proteínas, tornando-as biomarcadores sensíveis para a PJI (69). Além do aumento expressivo destes fatores, é importante destacar que nos processos infecciosos a presença de DNA extracelular também é uma característica comum, ainda que a origem deste DNA não tenha sido elucidada (71,72).

Diversos estudos *in vitro* apontam o DNA extracelular produzido pelas bactérias como um importante componente estrutural e estabilizador dos biofilmes. Por outro lado, estudos sobre a resposta imune evidenciam que a presença de bactérias e de biofilmes bacterianos estimula a liberação de NETs por parte dos neutrófilos, assim como deflagra a resposta imune inata para conter a infecção, levando à ativação de

diferentes mecanismos de morte celular. Todos estes processos estão associados, direta ou indiretamente, à produção / liberação de DNA livre (73,74).

No microambiente articular da PJI, todos os fatores citados acima estão presentes, e nossos resultados mostram que os níveis de DNA livre no LS de pacientes com infecção são cerca de 20 vezes maiores que os encontrados nos pacientes sem infecção. Entretanto, nosso estudo se limitou a determinar os níveis de DNA livre, sendo necessários novos estudos que possam identificar a origem deste DNA.

Lögters e colaboradores (2009) avaliaram valor diagnóstico da quantificação de DNA livre no líquido sinovial na identificação da artrite séptica. Este estudo usou uma metodologia similar à utilizada no presente estudo e encontrou níveis significativamente maiores deste biomarcador no LS de pacientes com artrite séptica em comparação com pacientes com osteoartrite ($3,286 \pm 386$ ng/ml vs 278 ± 34 ng/ml, $p < 0,01$). Importante ressaltar que na casuística do estudo de Lögters, dos nove pacientes diagnosticados com artrite séptica seis possuíam uma prótese de joelho ou quadril (75). Entretanto, o autor não chama atenção para este fato, tampouco compara os níveis de DNA livre destes pacientes aos de pacientes com falha asséptica da artroplastia. Nosso estudo compara especificamente pacientes com falha da artroplastia com o objetivo de caracterizar a utilidade da quantificação de DNA livre no LS na discriminação entre as falhas séptica e asséptica da artroplastia de joelho.

Um paciente do grupo infecção apresentou nível de DNA livre abaixo do ponto de corte determinado. De forma interessante, uma análise mais detalhada deste paciente evidenciou que o mesmo não apresentava parâmetros pré-operatórios indicativos de infecção, sendo submetido à cirurgia de revisão aparentemente asséptica, contudo, apresentando resultado positivo na cultura microbiológica de espécimes coletados no intraoperatório. A avaliação da cultura microbiológica deste paciente revelou ainda que

a infecção foi causada por estafilococos coagulase negativa. Sendo importante ressaltar que alguns estudos apontam que infecções causadas por estafilococos coagulase negativa estão associadas a uma menor quantidade de leucócitos no líquido sinovial, além de não serem capazes de deflagrar uma resposta neutrofílica robusta (30,76). Apesar de outros pacientes que tinham infecção causada por estafilococos coagulase negativa terem apresentado níveis elevados de DNA livre no líquido sinovial, novos estudos são necessários para avaliar se nas infecções causadas por estes micro-organismos há uma tendência a encontrar resultados falso negativos com este biomarcador.

A cultura microbiológica é, até o momento, o único exame que permite a identificação do micro-organismo infectante, mas trata-se de um teste demorado, levando pelo menos 14 dias para liberação do resultado, além de apresentar alta taxa de resultados falsos negativos (17-53%) (77,78). Neste aspecto, o DNA livre se mostrou um biomarcador sensível, uma vez que nove pacientes do grupo infecção, apesar de não apresentarem crescimento de bactérias nas culturas microbiológicas, apresentaram níveis elevados de DNA livre no LS, fornecendo o diagnóstico correto desta complicação.

Nos últimos anos, o DNA livre vem sendo estudado como um biomarcador de prognóstico para condições como sepse, tuberculose, trauma, câncer, diabetes e outros (71,74,79–81). Estudos realizados em pacientes com sepse mostram que níveis aumentados de DNA livre no plasma estão associados a maior mortalidade (82). Já em pacientes com trauma, os níveis de DNA livre no plasma se correlacionaram com a gravidade da lesão, e níveis elevados desse biomarcador foram associados à ocorrência de eventos adversos como lesão pulmonar aguda, síndrome do desconforto respiratório agudo e morte (83). Um estudo recente correlacionou os níveis de DNA

extracelular produzidos *in vitro* por bactérias isoladas de próteses de quadril e joelho infectadas com os desfechos em 3 e 12 meses. Os resultados indicaram que as bactérias isoladas de pacientes que apresentaram critérios de cura da PJI em 12 meses produziram menor quantidade de DNA extracelular que os pacientes que tiveram infecção persistente, apontando o DNA extracelular produzido pelas bactérias infectantes como um fator de virulência e sua quantificação como um potencial biomarcador de desfecho e prognóstico (84). Com base neste achado, seria interessante o acompanhamento em longo prazo dos pacientes avaliados no presente estudo, de forma a avaliar os desfechos da infecção, verificando assim a possibilidade de correlação entre níveis mais altos de DNA no LS com uma evolução desfavorável da doença.

Os estudos sobre DNA livre geralmente utilizam metodologias distintas para avaliar este biomarcador. O DNA livre pode ser medido diretamente do fluido biológico ou pode ser realizada uma etapa de extração do DNA para posterior quantificação. A extração de DNA, além de aumentar o tempo até a obtenção do resultado, pode levar a perdas de DNA durante o processamento. Ademais, os diferentes kits disponíveis para extração do DNA livre apresentam diferentes eficiências. Por outro lado, a quantificação do DNA livre diretamente do plasma ou do soro pode estar sujeita à autofluorescência e à presença de substâncias interferentes, como albumina e imunoglobulinas, que resultam em perda da acurácia do método (85).

Em nosso estudo, optamos pela quantificação de DNA diretamente do líquido sinovial, com o objetivo de dar celeridade à realização do teste e assim desenvolver uma metodologia *point-of-care* para o diagnóstico da PJI. Esta metodologia, que é mais rápida, não requer equipamentos específicos e apresenta

menor custo, foi proposta pela primeira vez por Goldshtein et al em 2009 (86). Sua utilização minimiza os artefatos relacionados à etapa de extração do DNA e reduz o tempo de obtenção dos resultados, tornando-o viável e prático para uso clínico. Recentemente esta metodologia foi avaliada por vários autores, mostrando boa correlação e reprodutibilidade quando comparada ao método tradicional (87–89). Portanto, a quantificação direta de DNA livre não é apenas confiável e econômica, como já foi proposta como uma abordagem *point-of-care* para a avaliação de pacientes críticos (87)

A descoberta e o desenvolvimento de novos métodos para detecção de biomarcadores para diagnóstico da PJI têm levantado questionamentos quanto aos custos de tais exames, que apresentam valores bastante discrepantes. Um levantamento realizado no Reino Unido evidenciou o custo médio de alguns testes que compõem os critérios para diagnóstico da PJI. A quantificação de D-dímero tem custo médio de 28 dólares, a esterase leucocitária de 0,80 dólares, adicionado a aproximadamente 460 dólares da minicentrífuga, 690 dólares para o teste de alfa-defensina (fluxo lateral) e 380 dólares para cultura microbiológica tradicional (78). O kit para quantificação de DNA de fita dupla Picogreen tem custo médio de 500 dólares, com capacidade de realização de até 2.000 testes. O fluorímetro portátil apresenta valor médio de 2.000 dólares. Dessa forma, cada exame tem valor médio de 4 dólares, caracterizando este teste como um exame de baixo custo.

Nos últimos anos, diversos marcadores séricos e de líquido sinovial vêm sendo avaliados e disponibilizados para utilização clínica. A sensibilidade e especificidade de tais marcadores são aferidas tanto em estudos quanto na prática clínica, fornecendo evidências para sua inclusão ou exclusão nos critérios do SIME. Diversos estudos discutem as características do biomarcador ideal, dentre elas a

acurácia, o ponto de corte definido, a reprodutibilidade e o custo-efetividade (90). Nesse sentido, nossos resultados evidenciam que o biomarcador identificado e avaliado no presente estudo apresenta as características citadas acima, sendo necessários estudos com uma casuística maior que corroborem estes resultados.

Nossos resultados apresentam como limitação o número reduzido de participantes e a impossibilidade de calcular os valores preditivos positivos e negativos, uma vez que a frequência de pacientes com PJI em nossa casuística é diferente do encontrado na população geral. Outro aspecto a ser considerado é o fato de não termos realizado as quantificações nas amostras frescas. As quantificações da DNA livre nas amostras recém-coletadas estão sendo realizadas, porém, ainda não possuímos casuística suficiente para as análises. Outra avaliação pendente, que também está em andamento, é a comparação do valor diagnóstico da quantificação de DNA livre no LS em relação aos outros testes rápidos propostos pelo consenso, especificamente a esterase leucocitária e alfa-defensina.

Por fim, nossos resultados mostram que a quantificação de DNA livre no líquido sinovial é um teste rápido e com alta sensibilidade e especificidade, sendo útil para o diagnóstico da PJI.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram um aumento de DNA livre no líquido sinovial de pacientes com PJI e evidenciam a quantificação deste biomarcador no líquido sinovial como um teste com elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da infecção periprotética após artroplastia de joelho.

Além disso, a quantificação de DNA livre através do fluorímetro portátil se mostrou uma ferramenta útil, fornecendo resultados de forma rápida e se apresentando com o potencial de ser utilizado como uma metodologia *point-of-care* para o diagnóstico da infecção periprotética.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Inacio MCS, Paxton EW, Graves SE, Namba RS, Nemes S. Projected increase in total knee arthroplasty in the United States - an alternative projection model. *Osteoarthritis Cartilage*. novembro de 2017;25(11):1797–803.
2. Calliess T, Ettinger M, Hülsmann N, Ostermeier S, Windhagen H. Update on the etiology of revision TKA -- Evident trends in a retrospective survey of 1449 cases. *The Knee*. junho de 2015;22(3):174–9.
3. Khan M, Osman K, Green G, Haddad FS. The epidemiology of failure in total knee arthroplasty. *Bone Jt J*. 1º de janeiro de 2016;98-B(1 Supple A):105–12.
4. Lidgren L. Joint prosthetic infections: a success story. *Acta Orthop Scand*. dezembro de 2001;72(6):553–6.
5. Matar WY, Jafari SM, Restrepo C, Austin M, Purtill JJ, Parvizi J. Preventing infection in total joint arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. dezembro de 2010;92 Suppl 2:36–46.
6. Bozic KJ, Kurtz SM, Lau E, Ong K, Chiu V, Vail TP, et al. The Epidemiology of Revision Total Knee Arthroplasty in the United States. *Clin Orthop*. janeiro de 2010;468(1):45–51.
7. Koh CK, Zeng I, Ravi S, Zhu M, Vince KG, Young SW. Periprosthetic Joint Infection Is the Main Cause of Failure for Modern Knee Arthroplasty: An Analysis of 11,134 Knees. *Clin Orthop*. setembro de 2017;475(9):2194–201.
8. Rezapoor M, Parvizi J. Prevention of Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*. junho de 2015;30(6):902–7.
9. Izakovicova P, Borens O, Trampuz A. Periprosthetic joint infection: current concepts and outlook. *EFORT Open Rev*. 1º de julho de 2019;4(7):482–94.
10. Silverwood V, Blagojevic-Bucknall M, Jinks C, Jordan JL, Protheroe J, Jordan KP. Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1º de abril de 2015;23(4):507–15.
11. Guccione AA, Felson DT, Anderson JJ, Anthony JM, Zhang Y, Wilson PW, et al. The effects of specific medical conditions on the functional limitations of elders in the Framingham Study. *Am J Public Health*. março de 1994;84(3):351–8.
12. Hunter DJ. Osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. fevereiro de

2013;39(1):xv–xviii.

13. Hunter DJ. Osteoarthritis. *Rheum Dis Clin N Am*. fevereiro de 2013;39(1):xv–xviii.
14. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*. agosto de 2010;26(3):355–69.
15. Sharma L. Osteoarthritis of the Knee. *N Engl J Med*. 7 de janeiro de 2021;384(1):51–9.
16. Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*. janeiro de 2010;18(1):24–33.
17. Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States: Part II. *Arthritis Rheum*. 1º de janeiro de 2008;58(1):26–35.
18. Jevsevar DS. Treatment of Osteoarthritis of the Knee: Evidence-Based Guideline, 2nd Edition. *J Am Acad Orthop Surg*. 9 de janeiro de 2013;21(9):571–6.
19. Pandit H, Hamilton TW, Jenkins C, Mellon SJ, Dodd C a. F, Murray DW. The clinical outcome of minimally invasive Phase 3 Oxford unicompartmental knee arthroplasty. *Bone Jt J*. 1º de novembro de 2015;97-B(11):1493–500.
20. Liddle AD, Pandit H, Judge A, Murray DW. Optimal usage of unicompartmental knee arthroplasty. *Bone Jt J*. 1º de novembro de 2015;97-B(11):1506–11.
21. De Martino I, D’Apolito R, Sculco PK, Poultsides LA, Gasparini G. Total Knee Arthroplasty Using Cementless Porous Tantalum Monoblock Tibial Component: A Minimum 10-Year Follow-Up. *J Arthroplasty*. 12 de abril de 2016;
22. Kurtz SM, Ong KL, Lau E, Bozic KJ. Impact of the Economic Downturn on Total Joint Replacement Demand in the United States. *J Bone Jt Surg Am*. 16 de abril de 2014;96(8):624–30.
23. Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of Primary and Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Jt Surg Am*. 1º de abril de 2007;89(4):780–5.
24. Cram P, Lu X, Kates SL, Singh JA, Li Y, Wolf BR. Total knee arthroplasty volume, utilization, and outcomes among Medicare beneficiaries, 1991-2010. *JAMA J Am Med Assoc*. 26 de setembro de 2012;308(12):1227–36.
25. Woude JAD van der, Nair SC, Custers RJH, Laar JM van, Kuchuck NO,

Lafeber FPJG, et al. Knee Joint Distraction Compared to Total Knee Arthroplasty for Treatment of End Stage Osteoarthritis: Simulating Long-Term Outcomes and Cost-Effectiveness. PLOS ONE. 12 de maio de 2016;11(5):e0155524.

26. Losina E, Walensky RP, Kessler CL, Emrani PS, Reichmann WM, Wright EA, et al. Cost-effectiveness of Total Knee Arthroplasty in the United States. Arch Intern Med. 22 de junho de 2009;169(12):1113–22.

27. Thiele K, Perka C, Matziolis G, Mayr HO, Sostheim M, Hube R. Current Failure Mechanisms After Knee Arthroplasty Have Changed: Polyethylene Wear Is Less Common in Revision Surgery. J Bone Jt Surg Am. 6 de maio de 2015;97(9):715–20.

28. Calliess T, Ettinger M, Hülsmann N, Ostermeier S, Windhagen H. Update on the etiology of revision TKA — Evident trends in a retrospective survey of 1449 cases. The Knee. 1º de junho de 2015;22(3):174–9.

29. Dalury DF, Pomeroy DL, Gorab RS, Adams MJ. Why are Total Knee Arthroplasties Being Revised? J Arthroplasty. 1º de setembro de 2013;28(8):120–1.

30. Tande AJ, Patel R. Prosthetic joint infection. Clin Microbiol Rev. abril de 2014;27(2):302–45.

31. Koh IJ, Cho W-S, Choi NY, Kim TK. Causes, Risk Factors, and Trends in Failures After TKA in Korea Over the Past 5 Years: A Multicenter Study. Clin Orthop. janeiro de 2014;472(1):316–26.

32. Shahi A, Parvizi J. Prevention of Periprosthetic Joint Infection. Arch Bone Jt Surg. abril de 2015;3(2):72–81.

33. Maathuis PGM, Neut D, Busscher HJ, van der Mei HC, van Horn JR. Perioperative contamination in primary total hip arthroplasty. Clin Orthop. abril de 2005;(433):136–9.

34. Chiu F-Y, Chen C-M, Lin C-FJ, Lo W-H. Cefuroxime-impregnated cement in primary total knee arthroplasty: a prospective, randomized study of three hundred and forty knees. J Bone Joint Surg Am. maio de 2002;84-A(5):759–62.

35. Laffer RR, Graber P, Ochsner PE, Zimmerli W. Outcome of prosthetic knee-associated infection: evaluation of 40 consecutive episodes at a single centre. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. maio de 2006;12(5):433–9.

36. Daines BK, Dennis DA, Amann S. Infection prevention in total knee arthroplasty. J Am Acad Orthop Surg. junho de 2015;23(6):356–64.

37. Gandhi R, Razak F, Pathy R, Davey JR, Syed K, Mahomed NN. Antibiotic

bone cement and the incidence of deep infection after total knee arthroplasty. *J Arthroplasty*. outubro de 2009;24(7):1015–8.

38. Cobra H, Cavanellas N, MottaFillho G, Mozella A. Causas de Falha de Artroplastia Total De Joelho. *Rev INTO*. dezembro de 2009;7(4):11–8.

39. Antony S, Farran Y. Prosthetic Joint and Orthopedic Device Related Infections. The Role of Biofilm in the Pathogenesis and Treatment. *Infect Disord Drug Targets*. 2016;16(1):22–7.

40. Vrgoc G, Japjec M, Gulan G, Ravlić-Gulan J, Marinović M, Bandalović A. Periprosthetic infections after total hip and knee arthroplasty--a review. *Coll Antropol*. dezembro de 2014;38(4):1259–64.

41. Zimmerli W. Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. *J Intern Med*. agosto de 2014;276(2):111–9.

42. Tsukayama DT, Goldberg VM, Kyle R. Diagnosis and management of infection after total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A Suppl 1:S75-80.

43. Segawa H, Tsukayama DT, Kyle RF, Becker DA, Gustilo RB. Infection after total knee arthroplasty. A retrospective study of the treatment of eighty-one infections. *J Bone Joint Surg Am*. outubro de 1999;81(10):1434–45.

44. del Arco A, Bertrand ML. The Diagnosis of Periprosthetic Infection. *Open Orthop J*. 14 de junho de 2013;7:178–83.

45. Shohat N, Bauer T, Buttaro M, Budhiparama N, Cashman J, Della Valle CJ, et al. Hip and Knee Section, What is the Definition of a Periprosthetic Joint Infection (PJI) of the Knee and the Hip? Can the Same Criteria be Used for Both Joints?: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. *J Arthroplasty*. fevereiro de 2019;34(2S):S325–7.

46. Parvizi J, Tan TL, Goswami K, Higuera C, Valle CD, Chen AF, et al. The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *J Arthroplasty*. 1º de maio de 2018;33(5):1309-1314.e2.

47. McNally M, Sousa R, Wouthuyzen-Bakker M, Chen AF, Soriano A, Vogely HC, et al. The EBJIS definition of periprosthetic joint infection. *Bone Jt J*. 31 de dezembro de 2020;103-B(1):18–25.

48. Davidson DJ, Spratt D, Liddle AD. Implant materials and prosthetic joint infection: the battle with the biofilm. *EFORT Open Rev*. novembro de 2019;4(11):633–9.

49. Korn MF, Stein RR, Dolf A, Shakeri F, Buness A, Hilgers C, et al. High-Dimensional Analysis of Immune Cell Composition Predicts Periprosthetic Joint Infections and Dissects Its Pathophysiology. *Biomedicines*. 17 de setembro de 2020;8(9):E358.
50. Tan C, Aziz M, Wang P. The vitals of NETs. *J Leukoc Biol* [Internet]. [citado 14 de junho de 2021];n/a(n/a). Disponível em: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/JLB.3RU0620-375R>
51. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. fevereiro de 2018;18(2):134–47.
52. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 5 de março de 2004;303(5663):1532–5.
53. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*. novembro de 2009;30(11):513–21.
54. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacker W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. outubro de 2009;5(10):e1000639.
55. Dwyer M, Shan Q, D’Ortona S, Maurer R, Mitchell R, Olesen H, et al. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *J Innate Immun*. 2014;6(6):765–79.
56. Labbé K, Saleh M. Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ*. setembro de 2008;15(9):1339–49.
57. Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, Caldwell C, et al. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:657–82.
58. Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, et al. Cell death and infection: A double-edged sword for host and pathogen survival. *J Cell Biol*. 12 de dezembro de 2011;195(6):931–42.
59. Hu Z, Chen H, Long Y, Li P, Gu Y. The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion. *Crit Rev Oncol Hematol*. janeiro de 2021;157:103166.

60. Mandel P, Metais P. Nuclear Acids In Human Blood Plasma. C R Seances Soc Biol Fil. fevereiro de 1948;142(3-4):241-3.
61. Wong BCK, Lo YMD. Cell-free DNA and RNA in plasma as new tools for molecular diagnostics. Expert Rev Mol Diagn. novembro de 2003;3(6):785-97.
62. Mondelo-Macía P, Castro-Santos P, Castillo-García A, Muínelo-Romay L, Diaz-Peña R. Circulating Free DNA and Its Emerging Role in Autoimmune Diseases. J Pers Med. 20 de fevereiro de 2021;11(2):151.
63. Abdelal IT, Zakaria MA, Sharaf DM, Elakad GM. Levels of plasma cell-free DNA and its correlation with disease activity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. Egypt Rheumatol. 1º de outubro de 2016;38(4):295-300.
64. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. Biol Rev Camb Philos Soc. agosto de 2018;93(3):1649-83.
65. Hamaguchi S, Hirose T, Matsumoto N, Akeda Y, Irisawa T, Seki M, et al. Neutrophil extracellular traps in bronchial aspirates: a quantitative analysis. Eur Respir J. junho de 2014;43(6):1709-18.
66. Schechter MC, Buac K, Adekambi T, Cagle S, Celli J, Ray SM, et al. Neutrophil extracellular trap (NET) levels in human plasma are associated with active TB. PloS One. 2017;12(8):e0182587.
67. Morawietz L, Tiddens O, Mueller M, Tohtz S, Gansukh T, Schroeder JH, et al. Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening. Histopathology. junho de 2009;54(7):847-53.
68. Krenn V, Morawietz L, Perino G, Kienapfel H, Ascherl R, Hassenpflug GJ, et al. Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. Pathol Res Pract. dezembro de 2014;210(12):779-86.
69. Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, Cameron A, Schiller K, Parvizi J. Diagnosing periprosthetic joint infection: has the era of the biomarker arrived? Clin Orthop. novembro de 2014;472(11):3254-62.
70. Parvizi J, Adeli B, Zmistowski B, Restrepo C, Greenwald AS. Management of periprosthetic joint infection: the current knowledge: AAOS exhibit selection. J Bone Joint Surg Am. 18 de julho de 2012;94(14):e104.
71. Pan S-W, Su W-J, Chan Y-J, Chuang F-Y, Feng J-Y, Chen Y-M.

Mycobacterium tuberculosis-derived circulating cell-free DNA in patients with pulmonary tuberculosis and persons with latent tuberculosis infection. *PLoS One*. 2021;16(6):e0253879.

72. Zeerleder S, Zwart B, Willemin WA, Aarden LA, Groeneveld ABJ, Caliezi C, et al. Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis. *Crit Care Med*. julho de 2003;31(7):1947–51.

73. Fernández-Carballo BL, Broger T, Wyss R, Banaei N, Denking CM. Toward the Development of a Circulating Free DNA-Based In Vitro Diagnostic Test for Infectious Diseases: a Review of Evidence for Tuberculosis. *J Clin Microbiol*. abril de 2019;57(4):e01234-18.

74. Huttunen R, Kuparinen T, Jylhävä J, Aittoniemi J, Vuento R, Huhtala H, et al. Fatal outcome in bacteremia is characterized by high plasma cell free DNA concentration and apoptotic DNA fragmentation: a prospective cohort study. *PLoS One*. 2011;6(7):e21700.

75. Lögters T, Paunel-Görgülü A, Zilkens C, Altrichter J, Scholz M, Thelen S, et al. Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. novembro de 2009;27(11):1401–7.

76. 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*. 15 de outubro de 2004;117(8):556–62.

77. Rothenberg AC, Wilson AE, Hayes JP, O'Malley MJ, Klatt BA. Sonication of Arthroplasty Implants Improves Accuracy of Periprosthetic Joint Infection Cultures. *Clin Orthop*. julho de 2017;475(7):1827–36.

78. Palan J, Nolan C, Sarantos K, Westerman R, King R, Foguet P. Culture-negative periprosthetic joint infections. *EFORT Open Rev*. outubro de 2019;4(10):585–94.

79. Butt AN, Swaminathan R. Overview of circulating nucleic acids in plasma/serum. *Ann N Y Acad Sci*. agosto de 2008;1137:236–42.

80. Saukkonen K, Lakkisto P, Pettilä V, Varpula M, Karlsson S, Ruokonen E, et al. Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock. *Clin Chem*. junho de 2008;54(6):1000–7.

81. Basnet S, Zhang Z-Y, Liao W-Q, Li S-H, Li P-S, Ge H-Y. The Prognostic Value of Circulating Cell-Free DNA in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *J Cancer*.

2016;7(9):1105–13.

82. Dwivedi DJ, Toltl LJ, Swystun LL, Pogue J, Liaw K-L, Weitz JI, et al. Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Crit Care Lond Engl*. 13 de agosto de 2012;16(4):R151.

83. Lo YM, Rainer TH, Chan LY, Hjelm NM, Cocks RA. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem*. março de 2000;46(3):319–23.

84. Zatorska B, Arciola CR, Haffner N, Segagni Lusignani L, Presterl E, Diab-Elschahawi M. Bacterial Extracellular DNA Production Is Associated with Outcome of Prosthetic Joint Infections. *BioMed Res Int*. 2018;2018:1067413.

85. Goggs R, Jeffery U, LeVine DN, Li RHL. Neutrophil-Extracellular Traps, Cell-Free DNA, and Immunothrombosis in Companion Animals: A Review. *Vet Pathol*. janeiro de 2020;57(1):6–23.

86. Goldshtein H, Hausmann MJ, Douvdevani A. A rapid direct fluorescent assay for cell-free DNA quantification in biological fluids. *Ann Clin Biochem*. novembro de 2009;46(Pt 6):488–94.

87. Marcatti M, Saada J, Okereke I, Wade CE, Bossmann SH, Motamedi M, et al. Quantification of Circulating Cell Free Mitochondrial DNA in Extracellular Vesicles with PicoGreenTM in Liquid Biopsies: Fast Assessment of Disease/Trauma Severity. *Cells*. 6 de abril de 2021;10(4):819.

88. Kim J-J, Park K, Han YR, Kim SH, Oh S-B, Oh SY, et al. Verification of performance of a direct fluorescent assay for cell-free DNA quantification, stability according to pre-analytical storage conditions, and the effect of freeze-thawing. *Biomed Rep*. agosto de 2021;15(2):68.

89. Coimbra S, Rocha S, Nascimento H, Valente MJ, Catarino C, Rocha-Pereira P, et al. Cell-free DNA as a marker for the outcome of end-stage renal disease patients on haemodialysis. *Clin Kidney J*. maio de 2021;14(5):1371–8.

90. Rhodes A, Cecconi M. Cell-free DNA and outcome in sepsis. *Crit Care Lond Engl*. 8 de novembro de 2012;16(6):170.

91. McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirliff M, et al. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol*. 2014;9(8):987–1007.

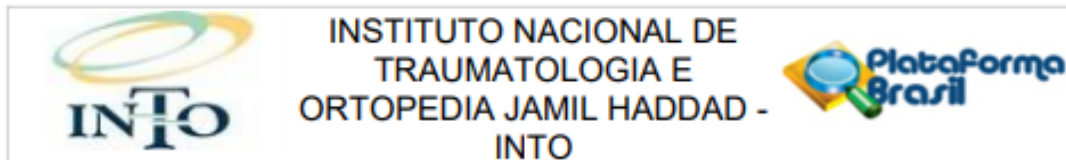
92. Miyata T, Fan X. A second hit for TMA. *Blood*. 9 de agosto de 2012;120(6):1152–4.

93. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the

second function of chromatin? *J Cell Biol.* 3 de setembro de 2012;198(5):773–83.

94. McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol.* 28 de novembro de 2011;10(1):39–50.

ANEXO A. Parecer de aprovação do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM TESTE RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PERIPROTÉTICA

Pesquisador: Ana Carolina Leal de Oliveira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 20307019.1.0000.5273

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.734.880

Apresentação do Projeto:

O projeto encontra-se bem estruturado, com todos os itens essenciais para o desenvolvimento da pesquisa. A infecção periprotética (IP) é uma das complicações mais frequentes e graves após artroplastia total de joelho. O diagnóstico preciso e o tratamento adequado são imprescindíveis para evitar a perda funcional e a evolução para infecção sistêmica. Entretanto, o diagnóstico correto da IP ainda é um desafio ao cirurgião, uma vez que ainda não há um método de diagnóstico acurado e os critérios de diagnóstico existentes se baseiam em testes sorológicos, histológicos e microbiológicos que são imprecisos e demorados. Recentemente, as redes extracelulares de neutrófilos (NETs), filamentos de DNA e proteínas liberados por neutrófilos ativados, tem sido investigados como biomarcadores para diversas doenças como câncer, trombose e sepse.

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo tem como objetivo investigar o valor diagnóstico da quantificação de NETs na identificação da IPs e desenvolver e validar um teste rápido de quantificação destas estruturas.

Objetivo Geral - Avaliar o potencial diagnóstico liberação de NETs, através da quantificação de cell

Endereço: Avenida Brasil, nº 500
Bairro: São Cristóvão **CEP:** 20.940-070
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-5000 **Fax:** (21)2134-5228 **E-mail:** cep.into@into.saude.gov.br

free DNA, no diagnóstico rápido da infecção articular periprotética de joelho.

Objetivos Específicos -

- Determinar a concentração de cell free DNA no líquido sinovial de pacientes com e sem infecção periprotética do joelho.
- Calcular os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do para a quantificação de cell free DNA no diagnóstico da IP pós artroplastia de joelho.
- Determinar o limiar de reatividade do cell free DNA para diagnóstico de IP pós artroplastia de joelho.
- Correlacionar os resultados da quantificação de cell free DNA com os resultados dos exames preconizados pelo algoritmo da SIME para diagnóstico da IP.
- Desenvolver e validar o teste de quantificação de cell free DNA utilizando fluorímetro portátil.
- Comparar os resultados diagnósticos e os custos do método rápido de quantificação de cell free DNA com outros métodos rápidos para diagnóstico da IP clinicamente disponíveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há risco adicional ao participante, já que a coleta de líquido sinovial é parte da rotina do grupo, para a realização de exames para diagnóstico da infecção periprotética.

Benefícios:

- Possibilitar o desenvolvimento de uma nova ferramenta rápida e barata para o diagnóstico da infecção periprotética. Contribuir para o conhecimento sobre a infecção periprotética ajudando, assim, outros pacientes que necessitam da cirurgia de revisão da artroplastia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, uma vez que pretende validar um teste rápido para detecção da infecção periprotética

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram devidamente apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as orientações do parecer anterior foram atendidas. Não havendo pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Avenida Brasil, n° 500	CEP: 20.940-070
Bairro: São Cristóvão	
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-5000	Fax: (21)2134-5228
	E-mail: cep.into@into.saude.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -
INTO



Continuação do Parecer: 3.734.880

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1415089.pdf	06/11/2019 15:50:34		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	06/11/2019 15:48:39	Ana Carolina Leal de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_particular.pdf	06/11/2019 15:47:04	Ana Carolina Leal de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_cepmod2.docx	06/11/2019 15:46:50	Ana Carolina Leal de Oliveira	Aceito
Outros	ANUENCIA_PARTICULAR.pdf	06/11/2019 15:45:31	Ana Carolina Leal de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	05/09/2019 13:57:25	Ana Carolina Leal de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMOS_PESQUISADOR.pdf	20/08/2019 14:20:33	Ana Carolina Leal de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 29 de Novembro de 2019

Assinado por:
Eduardo Branco de Sousa
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Brasil, nº 500
Bairro: São Cristóvão CEP: 20.940-070
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-5000 Fax: (21)2134-5228 E-mail: cep.into@into.saude.gov.br

ANEXO B. Termo de Consentimento Livre Esclarecido



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução do CNS nº 466 de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa "Desenvolvimento e validação de um teste rápido de quantificação de *cell free* DNA para diagnóstico da infecção periprotética pós artroplastia de joelho". Você foi selecionado por ter feito uma cirurgia de artroplastia de joelho que agora necessita de uma cirurgia de revisão e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. O seu tratamento será o mesmo, esteja você participando ou não deste estudo.

Os objetivos deste estudo são desenvolver um novo teste para o diagnóstico rápido da infecção periprotética.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em permitir que os pesquisadores colem informações clínicas, laboratoriais e antropométricas do seu prontuário além de permitir que uma amostra do líquido que banha a sua articulação, que é normalmente coletada para a realização de exames, seja destinada à pesquisa.

O líquido da articulação será encaminhado para o laboratório de pesquisa no INTO, onde este projeto será realizado. Este estudo não vai interferir com o seu tratamento e o fato de você concordar em participar não traz nenhum risco adicional para você, já que a coleta do líquido que banha a sua articulação é normalmente feita para a realização de exames. Os benefícios relacionados com a sua participação são contribuir para o conhecimento sobre a infecção periprotética ajudando, assim, outros pacientes que necessitam da cirurgia de revisão da artroplastia.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados da pesquisa serão divulgados de forma a não possibilitar sua identificação. Você será identificado, na pesquisa, apenas por um número de acordo com a ordem de inclusão no estudo e seu nome permanecerá em total sigilo.

Este Termo foi redigido em três vias, sendo uma para o participante, outra para o pesquisador e uma para ser anexada ao prontuário do participante, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP. Você poderá esclarecer suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento através dos números dos telefones ou endereço de e-mail disponível neste Termo.



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

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____

Pesquisador responsável: Hugo Alexandre Cobra

Contato com o pesquisador responsável:

Endereço: Avenida Brasil, 500
e-mail: aloliveira@into.saude.gov.br

Telefone: 21345141

Responsável pela aplicação do termo
Assinatura e carimbo

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO/MS.

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ
CEP: 20940-070 Tel.: (21) 2134-5000/(21) 2134-5061 e-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Participante da pesquisa: _____

Assinatura do participante da pesquisa