



PG-LOCOMOTOR

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

ALAN DE PAULA MOZELLA

ESTUDO DO PERFIL METABÓLICO DO LÍQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES
COM INFECÇÃO PERIPROTÉTICA DO JOELHO

Ribeirão Preto

2022

Alan de Paula Mozella

ESTUDO DO PERFIL METABÓLICO DO LÍQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES
COM INFECÇÃO PERIPROTÉTICA DO JOELHO

Versão Original

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotora Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Salim

Coorientadora: Prof^a. 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.

Mozella, Alan de Paula

Estudo do perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com infecção periprotética do joelho. Ribeirão Preto, 2022. 127f. : 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. Metabólica.
4. Diagnóstico.
5. Biomarcador.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Alan de Paula Mozella

Título: Estudo do perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com infecção periprotética do joelho

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotora 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

A Deus, em primeiro lugar, por iluminar minhas escolhas e trajetória.

Aos meus pais, Ana Luzia e Ascindino, pelo incentivo à leitura e estudo.

Sem eles minhas conquistas não teriam sido possíveis.

Aos meus irmãos, Alini e Thadeu, pela compreensão da ausência.

À minha esposa, Cláudia, pelo amor e apoio incondicional.

Ao amigo Hugo Cobra, pela amizade e dedicação na realização das cirurgias, coleta de dados e assistência aos pacientes.

Ao Prof. Gilson Costa dos Santos Jr, pela parceria e compartilhamento de conhecimentos.

Aos meus orientadores, Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Leal e Prof. Dr. Rodrigo Salim pela oportunidade, dedicação e conhecimento proporcionado.

Ao Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia e ao Centro de Cirurgia de Joelho do INTO pelo incentivo e possibilidade de compartilhamento de conhecimento e crescimento profissional.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por conceder oportunidade para realização deste Doutorado.

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

Sumário

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE QUADROS E TABELAS	XIII
1 INTRODUÇÃO.....	- 1 -
2 REVISÃO DA LITERATURA	- 4 -
2.1 Infecção articular periprotética	- 4 -
2.2 Fisiopatologia da infecção articular periprotética	- 6 -
2.3 Diagnóstico da infecção periprotética.....	- 11 -
2.4 Desafio diagnóstico e o biomarcador ideal.....	- 26 -
2.5 Metabolômica.....	- 28 -
3 OBJETIVOS.....	- 34 -
3.1 Objetivo Geral	- 34 -
3.2 Objetivos Específicos	- 34 -
4 METODOLOGIA	- 35 -
4.1 Participantes do estudo	- 35 -
4.2 Coleta das informações clínicas e de exames sorológicos.....	- 36 -
4.3 Procedimento cirúrgico e rotina de coleta das amostras biológicas -	37 -
4.4 Análise do líquido sinovial	- 38 -

4.5	Análise do Tecido ósseo e membrana periprotética	- 40 -
4.6	Definição do diagnóstico e formação dos grupos.....	- 42 -
4.7	Metabolômica do líquido sinovial	- 43 -
4.8	Classificações da infecção articular periprotética	- 46 -
4.9	Análise dos resultados	- 47 -
5	RESULTADOS	- 49 -
5.1	População de estudo.....	- 49 -
5.2	Exames laboratoriais.....	- 51 -
5.3	Espectroscopia por ressonância magnética nuclear	- 56 -
6	DISCUSSÃO	- 70 -
7	CONCLUSÃO	- 83 -
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 84 -
	ANEXO A. LICENÇA DA COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP/INTO)	- 104 -
	ANEXO B. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	- 109 -
	APÊNDICE A – PRODUTOS BIBLIOGRÁFICOS	111

RESUMO

Mozella AP. Estudo do perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com infecção periprotética do joelho [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2022.

A infecção articular periprotética (IAP) é uma das mais desafiadoras e graves complicações da artroplastia total do joelho (ATJ). Apesar de sua importância, há uma escassez de estudos sobre sua patogênese, impactando na identificação assertiva de biomarcadores que auxiliem no seu diagnóstico. Recentemente, diversos estudos têm demonstrado que a reprogramação metabólica celular desempenha um papel importante na progressão e desfecho das doenças infecciosas. Uma visão geral dos aspectos metabólicos dos sistemas biológicos pode ser realizada através da Metabolômica, entretanto, tal abordagem ainda não foi aplicada no contexto da IAP. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição de metabólitos no líquido sinovial (LS) de pacientes com IAP ou falha asséptica de ATJ. Para isso, os LS de 21 pacientes submetidos a cirurgia de revisão da artroplastia total do joelho (11 com diagnóstico IAP e 10 com falha asséptica) foram analisados usando espectroscopia por ressonância magnética nuclear. Foram realizadas análises estatísticas uni e multivariadas para identificar os metabólitos diferencialmente abundantes entre esses grupos. Após a aquisição e análise dos espectros, foram identificados e anotados 28 metabólitos no LS de pacientes com falha da artroplastia. Cinco destes metabólitos se encontravam diferencialmente abundantes entre LS infectado e não infectado. Lactato, acetato e 3-hidroxiacetato estavam em maior concentração, e glicose e creatina foram encontradas reduzidas no LS de pacientes com IAP. Nossos resultados revelaram ainda a presença de dois perfis metabólicos distintos nos pacientes com IAP, caracterizados por diferenças nos níveis de lactato. Dentre os pacientes com IAP, não foram encontradas diferenças no perfil metabólico em relação às infecções agudas vs crônicas e nas diferentes classificações de Tsukayama. Entretanto, pacientes com infecções causadas por *Staphylococcus aureus* apresentavam níveis mais elevados de lactato e acetato no LS. A performance diagnóstica dos metabólitos diferencialmente abundantes foi avaliada e o lactato, a glicose e a creatina apresentaram-se como potenciais biomarcadores, por apresentarem AUC ROC >0,8. Além disso, o acetato se apresentou como um potencial biomarcador para discriminar entre as infecções causadas por *S. aureus* em relação às causadas por outros tipos de bactérias. Nossos resultados evidenciam que o LS de pacientes com IAP exibe um perfil metabólico distinto, possivelmente refletindo as adaptações metabólicas que ocorrem no microambiente periprotético. Através da metabolômica foi possível a identificação de três potenciais biomarcadores da IAP (lactato, glicose e creatina). Mais estudos são necessários para obter uma visão mais ampla das vias metabólicas ativadas por patógenos e células imunes no contexto da IAP, assim como para uma avaliação mais específica dos potenciais biomarcadores identificados neste estudo.

Palavras-chave: infecção articular periprotética. artroplastia total de joelho. metabolômica. diagnóstico. biomarcador.

ABSTRACT

Mozella AP. Study of the metabolic profile of the synovial fluid of patients with periprosthetic infection of the knee [Thesis]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto; 2022.

Periprosthetic joint infection (PJI) is one of the most challenging and serious complications of total knee arthroplasty. Despite its importance, there is a lack of studies in the literature on its pathogenesis, impacting the assertive identification of biomarkers to aid in its diagnosis. Recently, several studies have shown that cellular metabolic reprogramming plays an important role in the progression and outcome of infectious diseases. A broader view of the metabolic aspects of biological systems can be achieved through Metabolomics, however, such an approach has not yet been applied in the context of PJI. Therefore, the aim of this study was to evaluate the synovial fluid (SF) metabolite composition of patients with PJI or aseptic failure of total knee arthroplasties. For this, synovial fluid from 21 patients undergoing total knee arthroplasty revision surgery (11 with a diagnosis of PJI and 10 with aseptic failure) were analyzed using nuclear magnetic resonance spectroscopy. Univariate and multivariate statistical analyzes were performed to identify differentially abundant metabolites between these groups. After the acquisition and analysis of the spectra obtained, 28 metabolites were identified and anotated in the SF of patients with arthroplasty failure. Five of these metabolites were differentially abundant between infected and non-infected cohorts. Lactate, acetate and 3-hydroxybutyrate were in higher concentration, and glucose and creatine were found to be reduced in the synovial fluid of patients with PJI. Our results also revealed the presence of two distinct metabolic profiles in patients with PJI, characterized by differences in lactate levels. Among patients with PJI, no differences were found in the metabolic profile in relation to acute vs. chronic infections and in the different Tsukayama classifications. However, infections caused by *Staphylococcus aureus* had higher levels of lactate and acetate in the SL. The diagnostic performance of the differentially abundant metabolites was evaluated, and lactate, glucose and creatine were presented as potential biomarkers, as they presented AUC ROC >0.8. In addition, acetate presented itself as a potential biomarker to discriminate between infections caused by *S. aureus* in relation to those caused by other types of bacteria. Our results show that the synovial fluid of patients with PJI exhibits a distinct metabolic profile, possibly reflecting metabolic adaptations that occur in the periprosthetic microenvironment. Through metabolomics, it was possible to identify four potential PJI biomarkers (lactate, glucose, and creatine). More research and studies are needed to obtain a broader view of the metabolic pathways involved by pathogens and immune cells in the context of PJI, as well as for a more specific assessment of the potential biomarkers identified in the present study.

Keywords: periprosthetic joint infection. total knee arthroplasty. metabolomics. diagnosis. biomarker.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°	grau
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
AAOS	Academia Americana de Cirurgiões Ortopédicos, do inglês <i>American Academy of Orthopaedic Surgeons</i>
ATJ	artroplastia total de joelho
C	Celsius
CAE	Centro de Atenção Especializada
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNRNM	Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear
CPC	Centro de Processamento Celular
dL	decilitro
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDR	taxa de falsas descobertas, do inglês <i>false discovery ratio</i>
IAP	infecção articular periprotética
ICM	Reunião do Consenso Internacional, do inglês <i>International Consensus Meeting</i>
IDSA	Sociedade Americana de Doenças infecciosas, do inglês <i>Infectious Disease Society of America</i>
IMC	índice de massa corporal
INBEB	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagen
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
kDa	quilo Daltons
LS	líquido sinovial
mg	miligrama
MHz	mega Hertz
mL	mililitros
mM	mili Molar

mm/h	milímetros por hora
mm ³	milímetros cúbicos
mmHg	milímetros de Mercúrio
MRSA	Staphylococcus Aureus Resistente à Meticilina, do inglês <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MSIS	Sociedade de Infecção Musculoesquelética, do inglês <i>Musculoskeletal Infection Society</i>
OA	Osteoartrite
PC	componente principal, do inglês <i>principal component</i>
PCA	análise de componente principal, do inglês <i>principal component analyses</i>
PCR	proteína C reativa
pH	potencial de Hidrogênio
PMN	polimorfonucleares
ppm	partes por milhão
RNM	ressonância nuclear magnética
rpm	rotações por minuto
SIDA	síndrome da imunodeficiência adquirida
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VHS	velocidade de hemossedimentação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Abordagens para estudo da metabolômica..	- 30 -
Figura 2. Procedimento cirúrgico e coleta de materiais biológicos.	- 38 -
Figura 3. Análise microbiológica e contagem celular do líquido sinovial....	- 40 -
Figura 4. Metabolômica.....	- 44 -
Figura 5. Velocidade de hemossedimentação.....	- 52 -
Figura 6. Proteína C reativa.....	- 53 -
Figura 7. Contagem de células brancas no líquido sinovial.....	- 54 -
Figura 8. Percentual de células polimorfonucleares no líquido sinovial.. ...	- 55 -
Figura 9. Perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com e sem infecção periprotética.	- 57 -
Figura 10. Discriminação dos pacientes com e sem infecção periprotética por análise dos componentes principais.....	- 59 -
Figura 11. Discriminação dos subgrupos identificados dentre os pacientes do grupo infecção por análise dos componentes principais.....	- 61 -
Figura 12. Comparação da abundância de lactato entre os subgrupos identificados nos pacientes com infecção periprotética.....	- 61 -
Figura 13. Discriminação dos pacientes com infecção causada por bactérias Staphylococcus coagulase negativa ou positiva por análise dos componentes principais.	- 62 -
Figura 14. Discriminação dos pacientes com infecção causada por bactérias Staphylococcus aureus por análise dos componentes principais.	- 63 -
Figura 15. Discriminação dos pacientes com infecção aguda ou crônica por análise dos componentes principais.....	- 65 -
Figura 16. Discriminação dos pacientes classificados segundo os critérios de Tskayama por análise dos componentes principais.....	- 66 -
Figura 17. Curvas ROC dos metabólitos diferencialmente abundantes entre os pacientes com e sem infecção periprotética.....	- 67 -

Figura 18. Curvas ROC dos metabólitos diferencialmente abundantes entre os pacientes com infecção periprotética causadas ou não por Staphylococcus aureus. - 69 -

Figura 19. Microambiente da articulação protética infectada. - 77 -

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Definição de infecção periprotética proposta pela Sociedade de Infecção Musculoesquelética em 2011.....	- 12 -
Quadro 2. Definição de infecção periprotética proposto pelo Consenso Internacional de 2013.....	- 13 -
Quadro 3. Algoritmo para diagnóstico da infecção articular periprotética do Consenso Internacional 2018.....	- 15 -
Quadro 4. Algoritmo para diagnóstico da infecção articular periprotética do Sociedade Europeia de Infecção periprotética.....	- 16 -
Quadro 6. Classificação de Morawietz. Adaptado de Morawietz et al., 2009.	- 42 -
Tabela 1. Características dos participantes do estudo.....	- 49 -
Tabela 2. Distribuição dos pacientes de acordo com as classificações da infecção articular periprotética.....	- 50 -
Tabela 3. Distribuição e frequência dos patógenos identificados nas culturas microbiológicas dos pacientes com infecção periprotética....	- 51 -
Tabela 4. Metabólitos identificados no líquido sinovial de pacientes submetidos à cirurgia de revisão de artroplastia total do joelho.	- 58 -
Tabela 5. Análise univariada: múltiplo Teste t entre os pacientes dos grupos com e sem infecção.	- 60 -
Tabela 6. Análise univariada: múltiplo Teste t entre os pacientes dos grupos coagulase negativo e coagulase positivo.....	- 63 -
Tabela 7. Análise univariada: múltiplo Teste t entre os pacientes dos grupos com infecção causada por <i>S. aureus</i> versus infecção causada por outros patógenos.	- 64 -
Tabela 8. Análise univariada: múltiplo Teste t entre os pacientes com infecções agudas ou crônicas.	- 65 -
Tabela 9. Comparação entre os pacientes classificados de acordo com a classificação de Tsukayama.	- 67 -
Tabela 10. Performance diagnóstica dos metabólitos para identificação da IAP.	- 68 -

Tabela 11. Performance diagnóstica do acetato e do lactato para identificação das infecções causadas por *Staphylococcus aureus*.... - 69 -

1 INTRODUÇÃO

A artroplastia total primária do joelho (ATJ) é um procedimento cirúrgico eletivo de substituição da articulação do joelho por próteses metálicas. É indicado para o tratamento de pacientes com osteoartrite (OA) avançada, primária ou secundária do joelho, apresentando bons ou excelentes resultados clínicos em mais de 90% dos casos e durabilidade superior a 95% em seguimento de 10 anos (1,2).

Atualmente, são realizadas nos Estados Unidos, aproximadamente, um milhão de próteses de joelho por ano. Estimativas futuras, entretanto, apontam para a contínua elevação do número de cirurgias realizadas, com potencial para alcançar cerca de 4 milhões de próteses de joelho em 2030, apenas nos EUA (3,4). A infecção após artroplastia total do joelho acomete 1% a 4% dos pacientes, sendo uma das mais graves complicações deste procedimento. Assim, estima-se a elevação do número absoluto de pacientes diagnosticados com infecção periprotética do joelho nos próximos anos (5–7).

O diagnóstico acurado e precoce da infecção articular periprotética (IAP), assim como a identificação do patógeno infectante e do perfil de resistência antimicrobiana, é de fundamental importância para a escolha da estratégia de tratamento e erradicação da infecção (8–12). Entretanto, apesar dos inúmeros avanços nos métodos de diagnóstico e das recentes pesquisas de diversos biomarcadores sanguíneos e do líquido sinovial (LS), ainda hoje, não há um teste ideal, com adequada sensibilidade e especificidade, para a comprovação diagnóstica; dificultando, assim, o manejo e o tratamento da IAP (13–20).

No microambiente da articulação periprotética infectada, ocorre uma complexa interação entre o patógeno e os componentes do sistema imunológico do hospedeiro, resultando em alterações celulares e moleculares que refletem o estado da infecção e potencialmente podem ser utilizadas no diagnóstico da IAP e no monitoramento da resposta ao tratamento (8,21). No entanto, apesar de sua importância e do crescente corpo de conhecimento com foco em seu tratamento, perfil microbiológico e diagnóstico, ainda existe uma escassez de informações sobre a patogênese da IAP.

A maioria dos dados sobre a fisiopatologia da IAP deriva de abordagens reducionistas que buscam investigar o papel de um único componente isolado de um sistema biológico maior (22,23). No entanto, as doenças infecciosas são particularmente complexas, pois envolvem dois componentes principais: o hospedeiro e o patógeno; e as evidências mostram que, em relação aos sistemas biológicos complexos, “o todo é mais do que a soma das partes”, exigindo uma análise minuciosa e o entendimento da conexão entre as partes para se obter uma melhor compreensão do processo (24).

A metabolômica, que se refere à identificação e quantificação de metabólitos dentro de um sistema biológico, é uma metodologia que tem sido utilizada no estudo da fisiopatologia de doenças e na descoberta de novos biomarcadores. Tal abordagem pode revelar vários aspectos da intrincada e complexa conexão entre o patógeno infectante, a resposta imune do hospedeiro e o metabolismo energético. Este método está mais intimamente relacionado ao fenótipo, uma vez que os metabólitos em conjunto refletem a condição instantânea de um sistema biológico em condições saudáveis ou doentes (25). Sua importância é destacada por evidências crescentes que implicam que a

reprogramação metabólica modula as mudanças funcionais das células do sistema imune (26–28). No entanto, essas alterações metabólicas não foram exploradas em infecção articular periprotética. Portanto, o objetivo deste estudo é utilizar a espectroscopia de ressonância magnética nuclear para comparar o perfil metabólico do líquido sinovial em pacientes com IAP com aqueles com falhas assépticas de artroplastia total do joelho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infecção articular periprotética

A IAP é definida como uma infecção envolvendo a prótese articular e os tecidos adjacentes (29,30). É uma complicação grave, ocorrendo entre 1% e 4% dos pacientes submetidos à artroplastia primária do joelho e entre 4% e 10% das artroplastias de revisão do joelho (5,6,8,9,31–33). Em diversas séries, a IAP é a causa mais comum de revisão da artroplastia total do joelho, acometendo cerca de um terço dos pacientes submetidos à troca de implantes (5–7,34–36). Desse modo, em decorrência do aumento do número de próteses primárias sendo realizadas anualmente, estima-se a elevação do número absoluto de pacientes diagnosticados com infecção periprotética do joelho (8,33,37,38).

A infecção periprotética é uma complicação devastadora para o paciente, ocasionando redução da qualidade de vida, prejuízo da função articular e da locomoção (10,32,39–42), sendo, inclusive, a maior causa de amputação do membro após a ATJ (43,44) e, também, encontra-se diretamente relacionada ao aumento da taxa de mortalidade (45–48).

A IAP é causada, principalmente, por contaminação bacteriana por diferentes mecanismos: i) inoculação direta de contaminantes externos, ii) disseminação hematogênica a partir de outros sítios e iii) disseminação por contiguidade. A inoculação direta, sobretudo de germes da microbiota cutânea, durante o ato cirúrgico, é o principal mecanismo de contaminação, respondendo por cerca de dois terços dos casos de infecção (8,49–51). A disseminação hematogênica por bacteremia a partir de um foco infeccioso a distância é a

segunda forma mais comum de contaminação (31,52,53). A disseminação por contiguidade ocorre mais frequentemente por contaminação a partir de um foco infeccioso próximo, como infecções de partes moles, entretanto, também pode ocorrer por meio de contaminação direta devido à exposição da prótese ao meio externo, como em fraturas periprotéticas expostas (8,50).

Dependendo da virulência do patógeno, a infecção pode se manifestar precocemente após a inoculação, isto é, com menos de quatro semanas de pós-operatório; ou, mais tardiamente, entre três meses e três anos. As infecções precoces com manifestações locais e sistêmicas claras são, normalmente, causadas por germes de alta virulência, tais como *Staphylococcus aureus*, estreptococos e enterococos. As infecções tardias, frequentemente, manifestam-se com sintomatologia menos pronunciada, sendo, por vezes, evidenciadas apenas pela manutenção de dor ou soltura precoce dos implantes, e são, normalmente, causadas por patógenos de menor virulência, tais como *Staphylococcus coagulase-negativo* ou *Cutibacterium sp.* (8,53–57).

2.1.1 Classificações

A infecção articular periprotética pode ser classificada com base no tempo transcorrido entre a implantação dos componentes e o surgimento dos sintomas. A utilização do critério temporal apresenta correlação com o estágio de maturação do biofilme, sendo, assim, de fundamental importância para a decisão da estratégia terapêutica (8,49,50,53,55). A infecção é considerada aguda quando os sintomas surgem em menos de quatro semanas após a implantação dos componentes, demonstrando, assim, a existência de um biofilme

potencialmente imaturo. Quando considerada a disseminação hematogênica, a infecção aguda é caracterizada quando os sintomas aparecem com menos de três semanas (8,50,53,55). As infecções hematogênicas com duração de sintomas superior a três semanas, assim como pacientes com mais de quatro semanas após implantação dos componentes, são classificados como infecção crônica, denotando a potencial existência de biofilme maduro (8,50,53,55,58).

As IAP podem ser mono ou polimicrobianas. As polimicrobianas variam de 6% a 37%. Embora patógenos comuns como *Staphylococcus aureus* sejam, frequentemente, isolados nessas infecções, patógenos de maior virulência como *Enterococcus sp.*, bacilos gram-negativos, *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e bactérias anaeróbicas são, mais comumente, associados às infecções polimicrobianas (56,59–62).

2.2 Fisiopatologia da infecção articular periprotética

Os biomateriais ortopédicos constituem um ambiente propício para a colonização bacteriana, aumentando, assim, a susceptibilidade à IAP (8,49,50,53). Alguns estudos apontam que a concentração bacteriana necessária para induzir infecção é reduzida em mais de 100 mil vezes na presença de um corpo estranho, como os implantes ortopédicos (8,49,50,57). Além de favorecerem a adesão e proliferação bacteriana, a presença do implante acarreta degranulação parcial e menor capacidade fagocítica por parte dos granulócitos encontrados no tecido periprotético, resultando no estabelecimento de uma imunodeficiência local (8,49–51). Este conjunto de fatores constitui o cenário ideal para o estabelecimento das IAPs.

As bactérias causadoras da IAP podem se apresentar, principalmente, em três formas: em biofilme, em suspensão ou intracelular (29,49,53,63,64). A capacidade de crescimento e persistência do patógeno na superfície do implante e tecido necrótico, na forma de biofilme, representa importante mecanismo de sobrevivência que possibilita aos patógenos infectantes resistirem à ação do sistema imune do hospedeiro (8,57). O biofilme é uma agregação estruturada de células bacterianas, que se organizam em colônia encapsulada por uma matriz extracelular autoproduzida, conhecida como substância polimérica extracelular, constituída de polissacarídeos, proteínas, lipídios e DNA extracelular. Essa matriz extracelular protege as bactérias da ação das células do sistema imune do hospedeiro, além de regular o transporte de substâncias para o interior do biofilme, limitando, por exemplo, a dispersão de antibióticos e facilitando, assim, a perpetuação e propagação da infecção. As evidências apontam que 99% das bactérias na natureza residem em biofilmes. Três quartos de todas as infecções relacionadas a biofilmes em implantes médicos são causadas por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* (49,51,53,63,64).

Outra consequência da formação do biofilme é que as bactérias localizadas na periferia consomem os nutrientes, impondo às bactérias localizadas em posição central uma condição de depleção de recursos. Essa falta de nutrientes e outros fatores de estresse estimulam as bactérias a entrarem em estado de latência, persistindo metabolicamente inativas, formando variantes persistentes e de pequenas colônias. Desse modo, essas bactérias podem sobreviver em altas concentrações de antibiótico devido à sua inatividade metabólica (49,63–67).

Recentemente, foi demonstrado que bactérias associadas à IAP podem invadir células fagocíticas do hospedeiro (macrófagos), assim como, células ósseas (osteoblastos e osteócitos), sendo capazes de sobreviver e proliferar no interior destas células (49,63,65,68). Dessa forma, conseguem reduzir sua exposição ao sistema imunológico e aos antibióticos. A similaridade entre os patógenos intracelulares e os encontrados nos biofilmes sugere que esses patógenos sejam oriundos do biofilme (49,57,67), sendo os *Staphylococcus aureus* os mais frequentes (8,68). Essa estratégia de resistência bacteriana também ajuda a explicar a dificuldade de detecção das bactérias com métodos convencionais de cultura (61,62,65,67,69).

A colonização do sistema canalicular da matriz óssea nativa pode, também, representar outro mecanismo de resistência bacteriana, haja vista que a concentração do antibiótico necessária para a erradicação das bactérias no interior da rede canicular pode não ser alcançada (63–65).

Do ponto de vista do hospedeiro, a presença de uma infecção bacteriana acarreta a ativação do sistema imune, com o objetivo de conter a infecção. A resposta imune orquestrada no contexto da IAP ainda não é completamente conhecida, contudo, estudos mostram que, assim como em outros processos infecciosos, as células do sistema imune inato, como macrófagos e neutrófilos, representam a primeira linha de defesa, promovendo o controle da infecção por meio de mecanismos como: fagocitose, estresse oxidativo e liberação de peptídeos antimicrobianos (29). Os neutrófilos desempenham um importante papel neste cenário, uma vez que diversos estudos evidenciaram um aumento destas células no líquido sinovial de pacientes com IAP (13,70,71). Além disso, a quantificação destas células e de fatores produzidos e liberados por elas, como

α -defensina e esterase leucocitária, são importantes biomarcadores para o diagnóstico desta complicação (72–74).

A IAP pode ser causada por diversos agentes infecciosos, entretanto, há poucas evidências sobre os aspectos específicos da resposta imune frente às infecções causadas por estes diferentes patógenos. Além disso, grande parte do conhecimento acerca da fisiopatologia da IAP advém de estudos em modelos animais, que podem não representar exatamente os processos que ocorrem em seres humanos (75,76).

Na última década, diversos estudos têm demonstrado um papel central do metabolismo energético na regulação das funções celulares. Esta relação tem sido amplamente estudada no âmbito da imunologia e, a esta íntima relação entre o sistema imune e o metabolismo, deu-se o nome de imunometabolismo (77,78). Neste sentido, diversos estudos demonstraram alterações em vias metabólicas intracelulares durante a ativação da resposta imune, evidenciando a modulação destas vias como um importante mecanismo de regulação da resposta imune (78,79). Os diferentes tipos de leucócitos utilizam várias vias metabólicas diferentes para gerar níveis adequados de estoques de energia para sustentar sua sobrevivência e a produção de vários intermediários biossintéticos importantes para sua ativação e proliferação. Além disso, a própria produção de determinados conjuntos de citocinas parece ser regulado por modulações em vias metabólicas específicas (80,81).

Além da regulação da resposta imune, outros artigos têm demonstrado que, no contexto das doenças infecciosas, estas alterações metabólicas regulam, também, o comportamento dos patógenos, sendo capazes de influenciar diretamente o desfecho da infecção (82,83). Durante um processo

infeccioso, a competição por nutrientes, a liberação de intermediários metabólicos capazes de modular o funcionamento de outras células, e, até mesmo, a quantidade e status de organelas relacionadas à geração de energia que as células dispõem são capazes de influenciar a progressão da doença (84). É importante ressaltar que os produtos do metabolismo, tanto das células do hospedeiro quanto do patógeno influenciam na composição do microambiente infeccioso, além de regularem, de forma bidirecional, o metabolismo celular. Dessa forma, o produto final destas alterações metabólicas depende da interação entre vários fatores do hospedeiro, patógeno e do próprio microambiente. O entendimento sobre como essas relações acontecem, levando em consideração os diferentes atores envolvidos no processo, é bastante complexo (78,82–84). Entretanto, apesar de, recentemente, diversos estudos estarem voltados para compreender a relação entre metabolismo, sistema imune e patógeno, pouco se sabe como esta relação de fato ocorre, especialmente em situações clínicas reais.

A compreensão sobre estes aspectos é importante, uma vez que estas alterações metabólicas podem, entre outras coisas, alterar o funcionamento local de células do sistema imune e a sensibilidade aos antibióticos por parte dos patógenos, influenciando diretamente no desfecho da infecção (78,84).

No âmbito das infecções ósseas, esse conhecimento é ainda mais escasso. Apesar do grande número de estudos sobre biomarcadores, testes diagnósticos, aspectos microbiológicos e tratamento, como mencionado anteriormente, pouco se sabe sobre o microambiente da IAP. Diversos estudos apontam que o comportamento de patógenos *in vitro* pode ser bastante diferente daquele observado *in vivo*, especialmente quando se leva em consideração a

interação destes com o sistema imune e outros componentes do microambiente. Além disso, do ponto de vista do hospedeiro, apenas recentemente a composição de células do sistema imune presente no líquido sinovial de pacientes com IAP foi avaliada (77,78,82,84). Dessa forma, ainda há uma grande lacuna de conhecimento a ser preenchida em relação à fisiopatologia da IAP.

2.3 Diagnóstico da infecção periprotética

O diagnóstico acurado e precoce da infecção articular periprotética é fundamental para a definição do tratamento a ser implementado e, conseqüentemente, para o resultado clínico. Entretanto, o diagnóstico é, frequentemente, difícil devido a diversos fatores, entre eles: a paucidade de sintomas, presença de sinais e sintomas não específicos que podem, facilmente, ser confundidos com evolução habitual do pós-operatório, e inexistência de exame comprobatório com elevada sensibilidade e especificidade (14–16,85–89).

Ainda hoje, as comunidades médica e científica trabalham para definir e estabelecer os critérios para diagnóstico da IAP. A primeira proposta de parâmetros para a confirmação diagnóstica de infecção periprotética surgiu apenas em 2011, e, ao longo dos últimos anos, variados critérios de diagnóstico foram propostos por diversas sociedades e organizações (50,88,90,91). A proposta de definição desenvolvida pela Sociedade de Infecção Musculoesquelética (MSIS, do inglês *Musculoskeletal Infection Society*), em 2011, preconizava que o diagnóstico desta complicação deveria ser baseado em um conjunto de critérios clínicos e laboratoriais. De acordo com os critérios

propostos, o diagnóstico definitivo era confirmado na presença de um trajeto fistuloso se comunicando com o implante ou a presença do mesmo patógeno em duas ou mais culturas de tecido peri-implante. Na ausência dos critérios maiores, a associação de quatro critérios menores, entre seis possíveis, também confirmava o diagnóstico de infecção (**Quadro 1**) (8,18,50,92).

Embora esta definição tenha sido de fundamental importância para a padronização dos critérios da IAP, o diagnóstico de infecção não poderia ser confirmado pelos critérios menores no período pré-operatório, haja vista que três desses critérios são achados de intraoperatórios (8,18,90,92).

Quadro 1. Definição de infecção periprotética proposta pela Sociedade de Infecção Musculoesquelética em 2011.

Critérios infecção periprotética	
Critérios maiores (pelo menos 1)	Duas culturas periprotéticas com micro-organismos fenotipicamente idênticos
	Fístula
Critérios menores (pelo menos 4)	Elevação de PCR e VHS plasmáticos
	Aumento de leucócitos no líquido sinovial
	Aumento do percentual de polimorfonucleares no líquido sinovial
	Presença de purulência na articulação
	Cultura positiva única
	Resultado histopatológico positivo de tecido periprotético (≥ 5 neutrófilos / campo)

PCR: proteína C reativa. VHS: velocidade de hemossedimentação.

Em 2013, o Consenso Internacional (ICM, do inglês *International Consensus Meeting*) modificou ligeiramente os critérios diagnósticos da MSIS e

publicou um consenso com os critérios para a padronização do diagnóstico da IAP, conforme o **Quadro 2** (8,50,92).

Quadro 2. Definição de infecção periprotética proposto pelo Consenso Internacional de 2013.

Crítérios maiores		
Duas culturas periprotéticas com micro-organismos fenotipicamente idênticos		
Fístula		
Crítérios menores (pelo menos 3)		
Exame	Limiar	
	Aguda < 90 dias	Crônica >90 dias
PCR (mg/L)	100	100
E		
VHS (mm/h)	-	30
Leucócitos LS (células/ μ L)	10000	3000
OU		
Esterase leucocitária	++	++
PMN LS	$\geq 90 \%$	$\geq 80 \%$
1 cultura positiva		
Histopatológico positivo		

PCR: proteína C reativa. VHS: velocidade de hemossedimentação.
PMN: polimorfonucleares. LS: líquido sinovial.

Entretanto, estudos subsequentes demonstraram que um número considerável de infecções crônicas de baixo grau não era identificado com esses critérios padronizados, especialmente quando relacionadas a germes de menor virulência como o *Propionibacterium acnes* (8,50).

Em 2018, um estudo multicêntrico produziu uma atualização dos critérios de diagnóstico que haviam sido propostos pela MSIS, em 2011, e pelo ICM, em 2013. De acordo com essa proposta, para a confirmação diagnóstica de IAP, é necessária uma abordagem estagiada. O diagnóstico é confirmado caso apresente um critério maior. Na ausência dos critérios maiores, os critérios menores são pontuados. Diferentes pontuações são sinalizadas para cada teste específico. Assim, pontuação maior ou igual a 6 indica a presença de infecção e pontuação igual ou menor que 1 indica ausência de infecção. Se a pontuação for entre 2 e 5, a infecção é considerada como possível, devendo ser realizados testes adicionais e avaliados parâmetros intraoperatórios (90,18,93,94). Essa atualização demonstrou melhora da sensibilidade para 97,7%, comparada com a sensibilidade de 86,9% do MSIS (2011) e de 79,3% do ICM (2013). Os parâmetros avaliados em cada estágio da abordagem com a respectiva pontuação são demonstrados no **Quadro 3** (8,9,18,50,90,92).

Quadro 3. Algoritmo para diagnóstico da infecção articular periprotética do Consenso Internacional 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	
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	0-1 Não infectado	
	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

PCR: proteína C reativa. VHS. Velocidade de hemossedimentação. PMN: polimorfonucleares. LS: líquido sinovial.

Mais recentemente, a Sociedade Europeia de Infecções Ósseas e Articulares (EBJIS, do inglês *European Bone and Joint Infection Society*) propôs uma nova metodologia baseada em uma abordagem em três níveis, que foi endossada pela MSIS e pelo Grupo de Estudos de Infecções Associadas a Implantes da Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas. Este novo algoritmo leva em consideração aspectos clínicos, avaliações sorológicas e do líquido sinovial, além do exame histopatológico, para categorizar as infecções em três categorias: improvável, provável e confirmada.

Esta abordagem apresenta melhores resultados na identificação de infecções causadas por patógenos de baixa virulência, reduzindo o risco de subdiagnóstico das IAPs (88) (**Quadro 4**).

Quadro 4. Algoritmo para diagnóstico da infecção articular periprotética do Sociedade Europeia de Infecção Periprotética.

	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	

Como mencionado, o diagnóstico da IAP é confirmado com base na avaliação de um conjunto de parâmetros clínicos, análises laboratoriais e avaliação de espécimes clínicos obtidos durante a cirurgia (8,50,88,90,95). De uma forma geral, os testes atualmente disponíveis podem ser divididos em duas grandes classes: os que detectam a presença de bactérias, como a cultura microbiológica, e os que avaliam a resposta imune gerada para combater a

infecção, e incluem: (i) a avaliação de marcadores sistêmicos, com proteína C reativa (PCR), velocidade de hemossedimentação (VHS), D-dímero; e (ii) a avaliação de marcadores locais, como a quantificação de células e os testes de esterase leucocitária e alfa defensina, realizados no LS, além da avaliação histopatológica da membrana periprotética (13,19,62,85,96–100). Ambos os grupos apresentam limitações, uma vez que os testes de detecção bacteriana são passíveis de contaminação no campo cirúrgico, durante o manuseio da amostra, e os testes que avaliam a resposta imune podem apresentar positividade na presença de outras causas de inflamação (13,15,16,50,85,86,92,101–103).

2.3.1 Exames sorológicos

2.3.1.1 Proteína C reativa e velocidade de hemossedimentação

Em 2011, a MSIS e, em 2013, a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA, do inglês *Infectious Diseases Society of America*) recomendaram a avaliação da VHS e dosagem da PCR como a primeira linha de avaliação diagnóstica em pacientes com suspeita de infecção periprotética. Entretanto, o Consenso Internacional em 2018 delimitou que os resultados negativos desses testes sorológicos não excluem a possibilidade de IAP (52,90,92,93).

Para diagnóstico de IAP aguda, PCR maior que 10 mg/L é o limite, e VHS maior que 30mm/h. O PCR eleva-se após a cirurgia alcançando o pico em dois dias, retornando aos valores de pré-operatório após três semanas. O VHS alcança o pico no 5º dia após a cirurgia e pode permanecer elevado por até 12

meses de pós-operatório (22,31,104,105). Entretanto, esses marcadores apresentam-se elevados em qualquer tipo de inflamação e infecção, comprometendo, assim, a sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da IAP. Desse modo, valores dentro da faixa de normalidade não são capazes de excluir infecção periprotética, haja vista que diversos estudos evidenciam que, em pacientes portadores de infecções com germes de baixa virulência, podem não apresentar elevação da PCR e VHS. De modo similar, a utilização prévia de antimicrobianos sistêmicos pode comprometer os valores desses marcadores (13,15,22,52,106,107). Pérez-Prieto *et al.* demonstraram que um terço das infecções periprotéticas apresentavam PCR dentro da normalidade e que dois terços desses apresentavam, também, VHS dentro da normalidade (108).

2.3.1.2 D-dímero

Numerosos estudos têm demonstrado que infecções locais ou sistêmicas podem resultar em atividades fibrinolítica (109–111). Ribera *et al.* demonstraram elevação da concentração do D-dímero no líquido sinovial de modelos animais com artrite séptica, sugerindo que a resposta inflamatória devido à infecção produziu forte ativação da atividade fibrinolítica na articulação afetada (110). Este biomarcador foi incluído no último algoritmo para diagnóstico proposto pelo ICM 2018, como uma alternativa à PCR, entretanto, como o D-dímero não é um marcador específico de infecção, alguns autores apontam limitação na utilização dessa molécula para confirmação do diagnóstico de infecção periprotética, haja vista que a elevação poderia estar correlacionada à processo inflamatório e não, necessariamente, relacionada à infecção (111,112).

2.3.2 Avaliações no líquido sinovial

2.3.2.1 - Contagem total de leucócitos e percentual de polimorfonucleares

A aspiração articular para a realização da contagem total de células brancas e a contagem diferencial vem sendo apontada como o mais importante procedimento para o diagnóstico de infecção articular periprotética do joelho (18,68,113,114). A determinação do número total de leucócitos e o percentual de polimorfonucleares no LS representam um teste rápido, fácil e potencialmente acurado para a distinção entre infecção periprotética e falha asséptica (8,13,15,50). O limite de 1700 leucócitos/mm³ recomendado pela Academia Americana de Cirurgiões Ortopédicos (AAOS, do inglês *American Academy of Orthopaedic Surgeons*), em 2010, e pelo IDSA, em 2013, apresenta maior sensibilidade, porém menor especificidade que o limite de 3000 leucócitos/mm³ sugerido pelo Consenso Internacional 2018 (8,50,52,93,106). Entretanto, deve-se destacar que a contagem de células brancas no LS pode estar aumentada em pacientes portadores de artrite reumatoide, naqueles com fratura periprotética e, também, em pacientes no período pós-operatório precoce de ATJ, aumentando o risco de resultados falso-positivo (52,92,113,115).

A administração prévia de antibióticos, entretanto, pode alterar a efetividade da contagem de leucócitos no LS para a confirmação do diagnóstico de IAP. A sensibilidade da contagem de leucócitos reduziu de 93,4% para 69,3% entre os pacientes com administração prévia de antimicrobianos (13,15,50,85,116).

2.3.2.2 – Teste da α -defensina

A α -defensina, também denominada como proteína neutrofílica humana, é um peptídeo antimicrobiano sintetizado pelos leucócitos polimorfonucleados, e secretada no LS em resposta ao patógeno, promovendo a despolarização da membrana celular e consequente lise bacteriana (8,14,18,19,73). Recentes evidências demonstraram que a α -defensina pode ser utilizada como biomarcador da IAP, sendo incluída pelo Consenso Internacional 2018 como critério menor para o diagnóstico (16,22,90,113,117,118). A concentração de 4,8 $\mu\text{g/mL}$ de α -defensina no LS apresentou sensibilidade e especificidade variando entre 85% a 100% (23,73).

O teste da α -defensina pode ser positivo mesmo em infecções periprotéticas com culturas negativas (73,119–122). Uma importante vantagem do método é que sua concentração não é alterada pela administração prévia de antimicrobianos ou pela presença de doença inflamatória sistêmica, entretanto, a presença de sangue pode influenciar o resultado do teste (18,19,73,104,123,124). Outra vantagem deste teste é a possibilidade do diagnóstico no período pós-operatório precoce, isto é, com menos de seis semanas da cirurgia. Neste período, a especificidade da contagem de leucócitos no LS é de apenas 60%, enquanto que o teste da α -defensina pode ser aplicado, alcançando especificidade de até 99% (8,18,100,122,124,125). Entretanto, a dosagem da α -defensina apresenta, também, limitações como o baixo valor preditivo positivo e a redução da especificidade quando na presença de metalose ou reação tecidual local adversa, além do alto custo (18,126–129).

A eficácia da α -defensina no diagnóstico da IAP foi avaliada em uma revisão sistemática realizada por Chen *et al.* em que foi encontrada sensibilidade de 87% e especificidade de 97%. Nesse estudo, a identificação da α -defensina pelo método qualitativo do fluxo lateral demonstrou sensibilidade de 85% e especificidade de 96%, enquanto a utilização do método de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) elevou a sensibilidade e especificidade, respectivamente, para 92% e 99% (19).

2.3.2.3 - Esterase leucocitária

A esterase leucocitária é uma enzima produzida pela ativação dos neutrófilos no sítio de infecção e que pode ser detectada pela utilização de uma tira colorimétrica, comumente utilizada em teste clínico de infecção urinária (19,22,74,130,131). Em 2011, Parvizi *et al.* foram os primeiros a descrever o potencial desse teste para diagnóstico da IAP (72). Durante o exame, a alteração da cor na fita de teste caracteriza o exame positivo, contudo, pode ser influenciado pela presença de sangue no LS, assim, é recomendado realizar previamente a centrifugação do LS antes do teste (19,104). Quando considerada apenas a leitura com ++, Parvizi *et al.* identificaram sensibilidade de 80,6%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100% e valor preditivo negativo de 93,3% para o diagnóstico da IAP do joelho (72). A sensibilidade foi elevada para 93,5% quando o teste positivo foi considerado para leitura de + ou ++, contudo, a especificidade e valor preditivo positivo reduziram para, respectivamente, 86,7% e 72,5%, enquanto o valor preditivo negativo elevou-se para 97,3% (72). Identificaram, também, que os níveis de esterase leucocitária

foram fortemente correlacionados com o percentual de polimorfonucleares no LS, contudo, a correlação positiva foi, ainda, significativa com VHS, PCR e contagem de leucócitos no líquido sinovial (19,72,114).

A sensibilidade da esterase leucocitária para o diagnóstico da IAP foi de 83,1%, entretanto, em pacientes que haviam sido submetidos à administração prévia de antibióticos, a sensibilidade foi de 77,8%, desse modo, os resultados sugerem que a esterase leucocitária mantém a performance diagnóstica mesmo com a administração prévia de antibiótico (130).

Em recente metanálise, a sensibilidade e especificidade à marcação ++ no teste de esterase leucocitária foram de 97,1% e 93%, respectivamente. Assim a acurácia diagnóstica para o teste com ++ foi de 90%, reduzindo para 81% quando considerado apenas + (13).

2.3.3 Ensaios microbiológicos

2.3.3.1 - Cultura microbiológica do líquido sinovial e tecidos periprotéticos

Embora os critérios diagnósticos propostos pelo ICM 2018 possibilitem o diagnóstico da IAP por meio de um sistema de pontuação mesmo na ausência de culturas positivas, os médicos ainda devem empenhar esforços para a identificação do patógeno e, conseqüentemente, melhorar os resultados do tratamento (9,18,90,132–134).

A identificação do patógeno por meio de cultura é crítica, não somente para a confirmação diagnóstica, mas também para auxiliar na determinação do tratamento antimicrobiano mais apropriado. Idealmente, a coleta das amostras deve ser realizada com o mínimo de duas semanas sem antibióticos para

melhorar a eficiência dos resultados (50,68,116,135–138). Entretanto, existem dados limitados acerca do tempo ideal em que as culturas de amostras peri-implantes devem ser mantidas para que seja observado crescimento bacteriano. Nesta questão, os 93% dos delegados do ICM 2018 concordaram que as culturas deveriam ser mantidas por 5 a 14 dias (50,62,93,94,116).

Objetivando melhorar o desempenho das culturas para identificação do patógeno, parte do LS pode ser transferido para frascos de hemocultura e mantido por 14 a 21 dias para identificação de patógenos de crescimento lento (62,135,136). Um estudo evidenciou que o LS foi a amostra mais sensível para o crescimento bacteriano em tecidos peri-implantes infectados, com sensibilidade de 69,9%, enquanto que a sensibilidade da membrana periprotética e a neosinovia foram, respectivamente, de 44,6% e 46,4% (61). Entretanto, outros estudos demonstram resultados limitados com a cultura do líquido sinovial (9,62,136,139).

A cultura microbiológica pode falhar em identificar o agente causador da infecção periprotética em 5 a 45% dos casos (9,60,104). Entretanto, em trabalho realizado por Tan *et al.*, embora a incidência suspeitada de IAP com cultura negativa tenha sido de 22%, quando obedecidos os critérios diagnósticos da MSIS, esta incidência foi de 6,4% (60). Segundo Palan *et al.*, a verdadeira incidência de infecção periprotética com culturas negativas varia entre 7% a 15% (104).

Em relação à cultura de tecidos, a recomendação atual é pela coleta e cultura de, no mínimo, três e, idealmente, cinco amostras de tecidos peri-implante durante a cirurgia de revisão. Entretanto, não existe consenso claro

quanto ao tipo de tecido sólido é mais adequado como amostra para a realização de culturas convencionais (18,62,88,90).

Recente metanálise avaliando a acurácia dos testes diagnósticos para IAP crônica evidenciou que a sensibilidade e a especificidade da cultura de tecidos periprotéticos foram de 97,5% e 72,9% com acurácia de 70% (13).

No estudo de Klement *et al.*, os autores utilizaram pacientes com infecção periprotética aguda do quadril ou do joelho e compararam as culturas convencionais (5 dias) com culturas estendidas (14 dias) para determinar alterações na capacidade de identificação de patógenos e, conseqüentemente, potencial efeito sobre o sucesso do tratamento (62). Os autores concluíram que a duração prolongada da cultura, por mais de cinco dias, não alterou o resultado da cultura nem influenciou no sucesso do tratamento cirúrgico. Embora o crescimento de *Propionibacterium acnes* tenha sido mais frequente na coorte estendida, a alta associação com apenas uma cultura positiva e o crescimento polimicrobiano fomentam o questionamento quanto à contaminação ou validação desse germe como patógeno infectante (62).

2.3.4 Exame histopatológico

O exame histopatológico da membrana peri-implante obtida durante a cirurgia de revisão de ATJ deve ser procedimento padrão na investigação da IAP. A contagem do número de neutrófilos presentes por campo de grande aumento com magnificação de 400 x é um indicativo da presença de IAP. As definições de inflamação aguda variam entre diferentes autores, variando de 1 a 10 neutrófilos por campo de grande aumento (18,88,90,140,141).

É reconhecido que os diferentes mecanismos de falha da artroplastia total do joelho produzem diferentes padrões de reação e inflamação tecidual, entretanto, a ausência de neutrófilos nas amostras a fresco de tecido peri-implante auxiliam a suportar a suspeita de soltura asséptica (89,140,13,142,103). Entretanto, a probabilidade de infecção é alta se, no mínimo, 5 neutrófilos forem encontrados em campo de grande aumento da amostra tecidual, contudo, o diagnóstico de infecção não pode ser excluído se observado número inferior de polimorfonucleares por campo (89,103,140).

Em 2006, Morawietz *et al.* propuseram um sistema de classificação histopatológica das membranas periprotéticas de pacientes com soltura protética (140). De acordo com esta classificação, são encontrados 4 tipos de membrana: tipo I - membrana peri-implante induzida por desgaste, caracterizada abundância de *debris* resultantes do desgaste do implante e pela presença de macrófagos e células gigantes multinucleadas; tipo II - membrana periprotética do tipo infeccioso, em que predomina tecido de granulação, fibroblastos ativos, neutrófilos granulocíticos e células plasmáticas em abundância e poucos linfócitos; tipo III - membrana periprotética do tipo misto, que resulta de uma combinação das membranas do tipo I e II; e tipo IV - membrana periprotética do tipo indiferente em que se observa a presença de tecido fibroso rico em fibras de colágeno. A classificação da membrana periprotética nos tipos II e III é considerada indicativo de infecção, devendo ser correlacionada com a sintomatologia clínica do paciente (140,103).

2.4 Desafio diagnóstico e o biomarcador ideal

O diagnóstico precoce da IAP é crítico, uma vez que existe uma curta janela de oportunidade para o tratamento da infecção aguda com desbridamento e retenção dos implantes, antes do desenvolvimento do biofilme maduro. Mesmo nas infecções crônicas o diagnóstico desta complicação pode ser desafiador, seja pela paucidade de sinais e sintomas, seja pela inexistência de um biomarcador ou teste clínico que possa acuradamente confirmar ou excluir o diagnóstico. Deve-se, ainda, ressaltar que diversos biomarcadores, atualmente utilizados para o diagnóstico da IAP, podem permanecer alterados por longos períodos no pós-operatório padrão, dificultando, ainda mais, o diagnóstico (92,100,105,125,143,144).

Assim sendo, até os dias atuais, diversas pesquisas são realizadas objetivando a identificação de um novo biomarcador capaz de: (1) apresentar valor de corte definido capaz de diferenciar entre os pacientes com e sem infecção, assim como, ser capaz de ser detectado precocemente, (2) apresentar sensibilidade entre 80% e 100% e especificidade acima de 80%, (3) apresentar perfil farmacocinético, em que rápida elevação da expressão da molécula seja observada na presença de infecção, (4) apresentar boa estabilidade bioquímica, e (5) idealmente deveria poder ser correlacionado com a estratificação de risco e com o tipo de tratamento (114,144). Esses critérios expõem as limitações da abordagem atual para a detecção de infecção e a necessidade de identificação de novo biomarcador (23,87,145,16).

Nos últimos anos, observa-se aumento do interesse por análises do LS e a busca por biomarcadores presentes neste fluido, sendo, inclusive, apontadas

como uma das análises de maior valor diagnóstico para a IAP. O líquido sinovial é um biofluido intra-articular, formado por um ultrafiltrado do plasma e contendo moléculas produzidas por diferentes tipos celulares presentes no espaço articular. Desse modo, reflete os processos biológicos complexos que ocorrem no interior da articulação. Além disso, encontra-se em contato direto com os diferentes tecidos da articulação e, também, com os implantes ortopédicos articulares (13,15,20,105,120,146,147).

Inicialmente, as análises do LS se limitavam à contagem de leucócitos, diferencial de polimorfonucleados e cultura. Recentemente, avaliações como a α -defensina e, mais recentemente, a quantificação de PCR no LS foram introduzidas aos critérios para avaliação da IAP. Nos últimos anos, entretanto, significativo número de moléculas presentes no líquido sinovial, sobretudo citocinas e peptídeos com ação antimicrobiana, tem sido pesquisado como potenciais biomarcadores para o diagnóstico de infecção periprotética (16,20,107,148,149).

A identificação destes novos biomarcadores vem sendo possível devido aos avanços nos estudos sobre os mecanismos envolvidos no estabelecimento e desenvolvimento desta doença. A introdução de novas ferramentas metodológicas complexas permite uma maior compreensão das bases moleculares desta complicação, fornecendo evidências para a identificação destes marcadores e possibilitando o desenvolvimento de novos testes diagnósticos (20,134,150–152).

Estas novas ferramentas aplicadas ao estudo da IAP compreendem uma gama de metodologias com alta sensibilidade, amplamente utilizadas para

identificar marcadores biológicos nas mais diversas condições fisiológicas ou patológicas. Dentre estas metodologias, destacamos a Metabolômica.

2.5 Metabolômica

A metabolômica se refere à avaliação global, qualitativa e quantitativa dos produtos finais de processos celulares, os metabólitos. Os metabólitos são, geralmente, moléculas com menos de 1,5 KDa que são resultado do metabolismo intermediário ou final dos processos celulares em um sistema biológico. O conjunto de metabólitos produzidos por uma célula ou organismo vivo é chamado metaboloma (152–157). A metabolômica permite a identificação e a quantificação simultânea de centenas a milhares de metabólitos. As alterações no metaboloma são dinâmicas, fazendo com que marcadores metabólicos reflitam as alterações fisiológicas de forma mais rápida e acurada (152,158,159). Dessa forma, por meio da metabolômica, é possível avaliar as alterações nas quantidades destes metabólitos e correlacioná-las a diferentes eventos celulares ou sistêmicos (25,160–162).

A metabolômica, ao realizar o estudo sistemático dos produtos finais dos processos celulares (metabólitos), tem se tornado uma importante ferramenta para o entendimento da resposta do organismo a diversas doenças, e tem sido empregada para o desenvolvimento de testes diagnósticos e, também, preditores de prognóstico ou de acompanhamento em diversas patologias, tais como: sepse, câncer, insuficiência cardíaca, síndromes metabólicas e diversas doenças infecciosas (156,159–161,163).

Os estudos de metabolômica, geralmente, utilizam duas técnicas principais: a ressonância nuclear magnética (RNM) e a espectrometria de massas. A primeira apresenta como vantagem a facilidade de preparação das amostras, reprodutibilidade e seu caráter não destrutivo (25,160,162). Já a espectrometria de massas requer um complexo protocolo de preparo das amostras e resulta na destruição das amostras ao final da análise, porém, apresenta maior sensibilidade e maior especificidade na identificação dos metabólitos (160,164–167).

Existem duas abordagens básicas, que podem ser usadas de forma complementar, para utilização da metabolômica: a não direcionada e a direcionada (25,160,162,168). A abordagem não direcionada realiza uma análise do perfil metabólico de um sistema biológico, por meio de avaliação e quantificação global de todos os metabólitos de uma amostra buscando identificar potenciais biomarcadores. O princípio dessa abordagem é a identificação das alterações no metaboloma causadas por um único fator, como por exemplo, uma infecção. Nessa abordagem, o objetivo não é a quantificação absoluta dos metabólitos em si, mas a identificação dos metabólitos alterados pela condição estudada. Após a identificação dos potenciais biomarcadores, a metabolômica direcionada pode ser utilizada para validação dos resultados (163,164,168,169). A abordagem direcionada é, geralmente, usada para testar uma hipótese previamente formulada em que apenas um conjunto específico de metabólitos, relativos à pergunta investigada, é avaliado (**Figura 1**) (25,160,170).

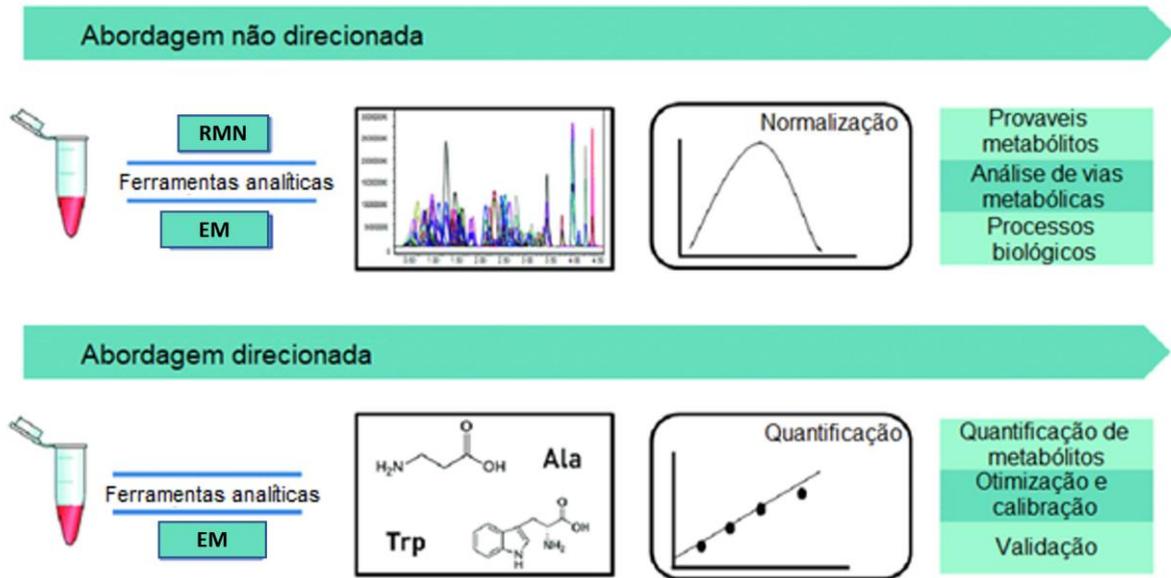


Figura 1. Abordagens para estudo da metabolômica. Imagem ilustrativa indicando as etapas necessárias para desenvolvimento das abordagens direcionada e não direcionada. Adaptado de San Martin *et al.*, 2020 (171).

A metabolômica é a abordagem “ômica” que melhor avalia o fenótipo, sendo a mais informativa a respeito da interação entre diferentes sistemas biológicos (25). Em relação aos processos infecciosos, as alterações no metabolismo apresentam papel central no desenvolvimento da reposta imune, uma vez que a ativação, função e regulação dos leucócitos são altamente dependentes da síntese e degradação de fatores e citocinas (172).

Existem diversos estudos acerca do metaboloma, tanto de células eucariotas quanto de procariontas. Inicialmente, tais estudos objetivavam descrever os perfis metabólicos dos organismos e como eles se alteravam frente à diferentes condições fisiológicas. A partir dos estudos em procariontas, pode-se observar que o perfil metabólico bacteriano pode ser alterado dependendo das condições ambientais (presença ou ausência de glicose, por exemplo), crescimento em forma planctônica ou biofilme, assim como há diferença no perfil

metabólico de cepas que diferem na resistência a antibióticos. Tais achados pavimentam o caminho para o uso da metabolômica no diagnóstico de infecções e identificação de bactérias patogênicas (25,159,163).

Em pacientes com infecções, as análises de metabolômica fornecem informações tanto sobre o metabolismo do patógeno quanto sobre alterações metabólicas dos pacientes infectados, sendo potencialmente possível identificar assinaturas diagnósticas distintas para tipos específicos de infecção (173,174). Diversos estudos foram realizados a partir da análise do plasma de pacientes com sepse. Nesses pacientes, há uma resposta inflamatória exacerbada e uma alteração no padrão metabólico das células do sistema imune. A análise do metaboloma revelou que a quantidade de alguns metabólitos, como os glicerofosfolídeos e esfingolípídeos, diferem entre pacientes com sepse e pacientes com síndrome da resposta inflamatória sistêmica por causas não infecciosas, sendo possível utilizá-los para distinguir entre ambas as condições (159-161). Outro estudo comparou pacientes com ou sem sepse, internados em unidade de tratamento intensivo e encontrou diferenças em cerca de 31 metabólitos. Este padrão metabólico foi utilizado para distinguir entre pacientes sépticos e não sépticos, apresentando área sob a curva ROC de 0,98, e, para prever a morte relacionada à doença, com AUC ROC=1 (175).

No campo da Ortopedia, ainda são escassos os estudos de metabolômica associados às infecções periprotéticas (163,169,176,177). Anderson *et al.* utilizaram a metabolômica realizada por RNM para analisar o líquido sinovial de cavalos acometidos com diferentes patologias. Os autores concluíram que o painel de metabólitos sinoviais é capaz de distinguir o fluido sinovial equino séptico do asséptico (177).

Mais recentemente, Akhbari *et al.* realizaram estudo por RNM do perfil metabólico do líquido sinovial humano para diferenciar entre patologias sépticas e assépticas (163). Os autores identificaram 16 metabólitos que apresentaram diferenças significativas na concentração entre os dois grupos. Três moléculas (lipídios, colesterol e moléculas N-acetiladas) relacionadas à inflamação e infecção foram identificadas em maior concentração do grupo portador de patologias sépticas. Outras 13 moléculas (citrato, glicina, glicosaminoglicanos, creatinina, histidina, lisina, formato, glicose, prolina, valina, dimetilsulfona, manose e glutamina) encontram-se em menor concentração no líquido sinovial infeccioso. Essas moléculas são relacionadas ao metabolismo dos carboidratos, dos nucleotídeos e do glutamato; ao aumento do estresse oxidativo e à redução da degradação de cartilagem (163). Entretanto, o reduzido número de pacientes avaliados nesse estudo representa importante limitação. Ressalta-se, ainda, que os autores realizaram análise do líquido sinovial de diferentes articulações nativas e, também, protéticas, o que entendemos poder interferir nos resultados, haja vista que em estudo prévio os mesmos autores identificaram diferenças significativas entre o líquido sinovial da articulação do quadril e do joelho (163,169).

Desse modo, persiste a necessidade de trabalhos científicos que forneçam evidências sobre as alterações celulares e moleculares que ocorrem no microambiente da infecção periprotética, de modo a permitir a identificação, de forma mais assertiva, de novos biomarcadores específico para o diagnóstico precoce de infecção periprotética. Assim, considerando a potencial diferença na composição dos metabólitos do líquido sinovial das diferentes articulações e

condições patológicas, sugerimos análise do líquido sinovial exclusivamente da articulação do joelho com substituição protética.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com infecção periprotética do joelho.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever as características clínicas dos pacientes submetidos à cirurgia de revisão com vistas a preencher os critérios diagnósticos preconizados pelo Consenso Internacional de 2018;
- Identificar os principais patógenos causadores da infecção articular periprotética do joelho;
- Determinar o perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com falha da artroplastia de joelho que serão submetidos à cirurgia de revisão;
- Comparar o perfil metabólico dos pacientes com e sem infecção periprotética do joelho, buscando identificar uma assinatura metabólica associado à infecção;
- Avaliar o valor diagnóstico da análise do perfil metabólico do líquido sinovial no diagnóstico da infecção periprotética.

4 METODOLOGIA

4.1 Participantes do estudo

Foi realizado um estudo prospectivo, com pacientes submetidos à cirurgia de revisão de artroplastia total do joelho, realizadas no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO), no período compreendido entre novembro de 2019 e maio de 2021. Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Instituição (nº 20309419.0.0000.5273, **Anexo A**), os voluntários confirmaram a sua participação no estudo após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, **Anexo B**). Todos os pacientes foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, realizado pela equipe de profissionais do Centro de Atenção Especializada (CAE) do Joelho do INTO.

Os critérios de exclusão foram:

- pacientes que se recusarem a assinar o TCLE;
- pacientes submetidos à revisão de artroplastia unicompartmental do joelho;
- pacientes submetidos ao 2º tempo de revisão (reimplante em pacientes com espaçador);
- aqueles em que não foi possível a coleta de líquido sinovial;
- pacientes que não tinham informações suficientes para a confirmação ou exclusão do diagnóstico de infecção articular periprotética;
- pacientes com diagnóstico de infecção, em que não foi observado crescimento de bactérias nas culturas microbiológicas;

- pacientes com diagnóstico de infecção em que foi identificado crescimento de patógeno em apenas uma amostra de cultura microbiológica;
- pacientes que utilizaram medicações antibióticas no período de 15 dias prévios ao procedimento cirúrgico;
- pacientes submetidos à revisão inicialmente asséptica, que apresentaram crescimento de bactéria em uma amostra de cultura;
- pacientes com doenças inflamatórias crônicas, como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide, assim como, pacientes com outras doenças infecciosas bacteriana ativas e aqueles síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA);

Foram realizadas no período do estudo 55 cirurgias de revisão de ATJ. Após a aplicação dos critérios de exclusão, permaneceram no estudo 21 pacientes de ambos os gêneros, com idade entre 57 a 87 anos.

4.2 Coleta das informações clínicas e de exames sorológicos

Os prontuários médicos dos pacientes foram consultados para a coleta das seguintes informações: data de nascimento, peso, altura, sexo, data e local da cirurgia primária, medicamentos utilizados nos 15 dias anteriores à cirurgia de revisão, data de início dos sintomas atuais, presença e tipo de comorbidades.

O exame físico ortopédico foi realizado para avaliação quanto à presença de fístula comunicante com a articulação do joelho ou potenciais alterações mecânicas dos implantes ortopédicos.

No dia anterior à cirurgia de revisão, todos os pacientes realizaram

exames radiográficos anteroposterior com carga, perfil e axial da patela com 30 graus de flexão da articulação a ser abordada. As imagens foram analisadas para identificação da presença de linhas de radioluscência, osteólise ou soltura de componente protético conforme critérios de avaliação radiográfica e escore da *Knee Society* (178). Todas as imagens foram realizadas pelo Setor de Radiologia do INTO.

No dia anterior à cirurgia de revisão, todos os pacientes foram submetidos à punção venosa periférica e coleta de amostra de sangue periférico para realização de exames sorológicos da rotina pré-operatório da instituição, a qual incluía VHS, PCR e D-dímero. Todos os exames foram realizados pelo laboratório de análises clínicas do INTO.

4.3 Procedimento cirúrgico e rotina de coleta das amostras biológicas

Todos os pacientes foram submetidos à anestesia raquidiana associada a bloqueio periférico do nervo isquiático e do nervo femoral ou do canal adutor com auxílio de instrumento de eletroestimulação ou guiado por ultrassonografia. Todos os procedimentos foram realizados sob isquemia com o manguito pneumático posicionado na porção proximal da coxa e inflado com pressão de 100 mmHg superior à pressão arterial sistólica. A degermação e preparação do membro a ser operado foram realizadas com solução de clorexedina degermante 2% e clorexedina alcoólica 0,5%.

Com o paciente posicionado em decúbito dorsal, após exsanguinação do membro e colocação dos campos cirúrgicos, foi realizada a coleta de líquido sinovial por meio de punção articular direta (artrocentese) com agulha 20G, isto

é, sem acesso cirúrgico e, também, sem bloqueio anestésico local adicional, com objetivo de minimizar a possibilidade de contaminação do líquido sinovial por sangue ou agentes contaminantes (**Figura 2**). Nos casos em que não foi possível a coleta de LS nesse momento, uma segunda tentativa foi realizada por visualização direta após realização do acesso cirúrgico parapatelar medial.

Durante o ato cirúrgico, após a remoção dos componentes protéticos, foram coletadas as seguintes amostras para análise microbiológica: três amostras de tecido ósseo femoral, três amostras de tecido ósseo tibial e, se possível, um fragmento de membrana periprotética. Para a análise histopatológica, foi coletada uma amostra de membrana periprotética do fêmur e uma amostra da membrana periprotética da tíbia.

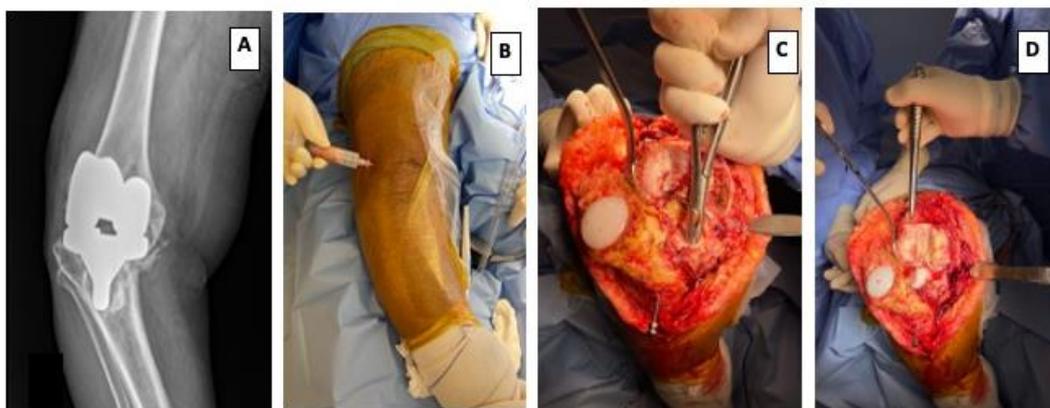


Figura 2. Procedimento cirúrgico e coleta de materiais biológicos. (A) Radiografia anteriorposterior do joelho direito evidenciando falha da artroplastia total do joelho; (B) Após a colocação dos campos estéreis, foi realizada a artrocentese antes da incisão cirúrgica para evitar contaminação do líquido sinovial por sangue, (C) Coleta de amostras de tecido ósseo periprotético para análise microbiológica, (D) Coleta de membrana periprotética para análise histopatológica.

4.4 Análise do líquido sinovial

4.4.1 Citometria global e específica do líquido sinovial

Após a coleta do líquido sinovial durante a cirurgia de revisão, 1 a 2 mL

da amostra coletada foram armazenados em tubo de coleta de sangue a vácuo, contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e enviada imediatamente para o laboratório de análises clínicas do INTO para a realização da contagem de células brancas e identificação do percentual de polimorfonucleares no líquido sinovial. A citometria global e específica do LS foi realizada por método automatizado em aparelho Cell Dyn 3700 SL (Abbott).

4.4.2 Avaliação da esterase leucocitária

A análise da presença de esterase leucocitária no LS foi realizada aplicando uma gota de LS diretamente sobre a almofada da fita reagente, com leitura do resultado após um minuto. De acordo com as instruções do fabricante, se a almofada de reagente indicar traço, uma segunda leitura é necessária no 2º minuto, e esta deve ser utilizada como valor da leitura final. Nas amostras contaminadas com sangue, o líquido sinovial coletado foi transferido para um microtubo e centrifugado a 6600 rotações por minuto (rpm) por 2 minutos, seguindo protocolo já publicado para este método (179). O sobrenadante obtido foi então aplicado sobre a almofada da fita reagente e o resultado anotado no instrumento de coleta de dados específico do paciente. A cor final desta reação foi lida como negativo (branco), traço (levemente arroxeadada), + (roxo claro), ou ++ (roxo escuro). Foi considerado como resultado positivo a leitura ++. Todas as análises da presença de esterase leucocitária foram realizadas no Centro de Processamento Celular (CPC) do INTO.

4.4.3 Análise microbiológica do líquido sinovial

Após a coleta do líquido sinovial durante a cirurgia de revisão, 3 a 5 mL da amostra coletada foram inoculadas em um tubo de hemocultura para aeróbio e, caso possível, 3 a 5 mL do LS foram, também, inoculados em um tubo de hemocultura para anaeróbio (**Figura 3**). Os tubos de hemocultura foram imediatamente enviados para o laboratório de microbiologia do INTO para realização dos testes de cultura microbiológica, de acordo com a rotina adotada pela instituição. Todas as amostras foram cultivadas por 14 dias. As informações sobre o número de culturas positivas e micro-organismos isolados foram coletadas do laudo fornecido pelo laboratório.



Figura 3. Análise microbiológica e contagem celular do líquido sinovial. (A) Frascos de hemocultura utilizados para realização de culturas microbiológicas do líquido sinovial coletado durante o procedimento cirúrgico. (B) Tubo a vácuo de coleta de sangue contendo EDTA utilizado para acondicionamento de líquido sinovial destinado à contagem total de leucócitos e percentual de polimorfonucleares.

4.5 Análise do Tecido ósseo e membrana periprotética

4.5.1 Análise microbiológica do tecido ósseo e membrana periprotética

Para as análises microbiológicas do tecido ósseo, imediatamente após a

coleta, os fragmentos ósseos foram acondicionados em tubos estéreis. Em cada tubo estéril foi adicionado 1 mL de soro fisiológico 0,9%. As amostras foram imediatamente enviadas ao laboratório de microbiologia do INTO, para realização dos testes de cultura microbiológica, de acordo com a rotina adotada pela instituição. Todas as amostras foram cultivadas por 14 dias. As informações sobre o número de culturas positivas e tipo de micro-organismos isolados foram coletadas do laudo fornecido pelo laboratório.

4.5.2 Análise histopatológica da membrana sinovial

Para o exame histopatológico, um ou dois fragmentos de membrana periprotética foram coletados e armazenados em frasco contendo formol a 10% e enviados para o Laboratório de Anatomia Patológica do INTO, em que foram processadas e analisadas de acordo com o protocolo institucional, sendo avaliadas em grande aumento microscópico (400 x) por médico patologista. As membranas foram classificadas de acordo com os parâmetros propostos por Morawietz *et al.*, em que a membrana periprotética é avaliada quanto às características do infiltrado inflamatório, à presença de fibrose, à presença de *debris* celulares e ao número de neutrófilos por campo de grande aumento (**Quadro 5**) (140).

Quadro 5. Classificação de Morawietz. Adaptado de Morawietz *et al.*, 2006.

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

4.6 Definição do diagnóstico e formação dos grupos

O grupo com infecção articular periprotética do joelho (grupo infecção) foi constituído por pacientes que apresentaram confirmação do diagnóstico devido à identificação de crescimento do mesmo patógeno em duas ou mais culturas de tecidos periprotéticos, conforme os critérios maiores preconizados pelo Consenso Internacional de 2013 (**Quadro 2**).

O grupo sem infecção periprotética do joelho (grupo não infecção) foi constituído por pacientes que:

- i) não apresentaram fístula;
- ii) não foi observado crescimento de bactérias em nenhuma das amostras de tecido ou líquido sinovial analisadas.

E que apresentaram positividade para, no máximo, 2 dos seguintes critérios menores:

1. Elevação dos níveis séricos PCR e VHS;

2. Elevação da contagem de células brancas no líquido sinovial OU ++ de mudança na fita de esterase leucocitária;
3. Aumento da porcentagem de células polimorfonucleares no líquido sinovial;
4. Análise histológica de tecido periprotético mostrando número ≥ 5 neutrófilos em 10 campos de grande aumento (400x).

4.7 Metabolômica do líquido sinovial

Amostra do líquido sinovial com no mínimo 1 mL foi acondicionado em frasco estéril contendo EDTA e enviado ao Centro de Processamento Celular (CPC) do INTO, no prazo máximo de 30 minutos após a coleta. No CPC, a totalidade da amostra de líquido sinovial foi imediatamente centrifugada a 6600 rpm durante cinco minutos em temperatura ambiente, para remoção de células e *debris*, sendo, então, aliqotado e congelado a -80 °C. As amostras foram mantidas congeladas por, no máximo, 6 meses até a preparação e realização da análise por espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H RNM).

Para tal, após o descongelamento, as amostras de líquido sinovial foram centrifugadas a 8.000 rpm por 20 minutos a 4° C para remoção adicional de *debris* e eventuais agregados proteicos. Então, 500 microlitros do sobrenadante obtido foram misturados a 1 mL de solução tampão fosfato de sódio (50 mM) com pH 7.4, contendo 100% de água deuterada. Essa solução foi filtrada em filtro Amicom (3-kDa *cutoff*), de acordo com as instruções do fabricante, sendo, então, centrifugada por 40 minutos a 4500 rpm com temperatura de 4° C. O

material eluído foi coletado e 600 μ L foram transferidos para tubos de RNM de 5 mm de diâmetro.

4.7.1 Aquisição do espectro

A espectroscopia por RNM das amostras do líquido sinovial foi realizada no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRNM) do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) (**Figura 4**).

Foram adquiridos espectros uni e bidimensionais de ^1H , em espectrômetro Bruker Avance III HD, operando a 500MHz. Os espectros unidimensionais de ^1H foram adquiridos com ZGESGP, 1K scans, TD de 64K e SW de 20 ppm. Para determinar a identificação dos metabólitos, o espectro bidimensional ^1H - ^1H *total correlation spectroscopy* (TOCSY) foi adquirido.

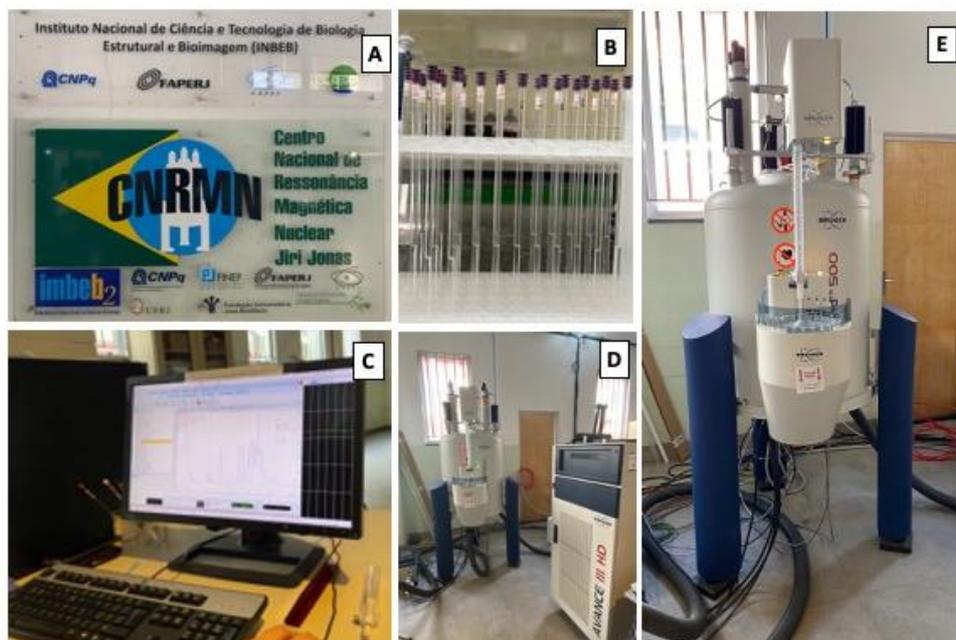


Figura 4. Metabolômica. (A) Laboratório no qual foi realizada a análise da metabolômica. (B) amostras do líquido sinovial acondicionadas em tubos de metabolômica de 5 mm após preparação. (C) Obtenção dos espectros para cada amostra. (D) Espectrômetro por RNM. (E) Espectrômetro por RNM de 500 MHz.

4.7.2 Qualidade espectral

Após aquisição, todos os espectros foram analisados quanto a integral conformidade com os padrões recomendados, incluindo aquisição de *Bucket table* 0,02 ppm, correção da linha de base, supressão dos *buckets* referentes ao branco, à água, a regiões com sinais negativos, às regiões referentes ao EDTA, e ao glicerol e etanol. Os espectros que não apresentaram esse padrão foram removidos das análises subsequentes.

4.7.3 Identificação dos metabólitos

Os espectros foram adquiridos e processados utilizando o software TopSpin 3.2 (Bruker) e IconNMR 4.6.7. Os assinalamentos foram realizados por meio da plataforma COLMAR. O software CCPNMR V2 com os pacotes de metabolômica HMDB 3.0 e BMRB foram utilizados para identificação dos metabólitos.

4.7.4 Análise estatística da metabolômica

Os estudos de metabolômica estão associados à geração de grande volume de dados, devido à identificação qualitativa e quantitativa de centenas a milhares de metabólitos simultaneamente. Desse modo, é necessário o emprego de análise estatística multivariada na qual cada metabólito constitui uma variável. A análise de componente principal (PCA) é um método não supervisionado, cujo objetivo é comparar grandes conjuntos de dados obtidos por meio dos respectivos espectros, sendo utilizada para visualização inicial, permitindo a

identificação de grupos de semelhança ou de diferença entre eles. O emprego dessas técnicas permite coletar informações que podem ser usadas novamente de forma supervisionada, até se chegar a uma resposta ao questionamento inicial.

As diferenças nas concentrações dos metabólitos podem ser apresentadas por comparação entre o grupo em estudo e o grupo controle com análise da significância estatística por meio do teste t ou análise de variância (ANOVA).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* Metaboanalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>). A normatização foi realizada pela soma das intensidades e o escalonamento das variáveis foi feito pelo método de Pareto para análise multivariada. Análise univariada foi realizada pelo múltiplo teste-T com aplicação da taxa de falsas descobertas (FDR) e *p*-valor de 0,05. Análise multivariável não supervisionada foi realizada via análise de componente principal (PCA).

4.8 Classificações da infecção articular periprotética

Os pacientes do grupo infecção foram classificados quanto à cronicidade da infecção por meio da:

- i) classificação temporal, em que infecções ocorrendo menos de 4 semanas após a cirurgia foram consideradas agudas e as que ocorrem após 4 semanas foram consideradas crônicas;
- ii) classificação de Tsukayama, em que aqueles que foram submetidos à cirurgia por falha asséptica, porém apresentaram resultado positivo na cultura

microbiológica, foram classificados como tipo 1. Os pacientes que apresentaram início dos sintomas até um mês após a cirurgia foram classificados como tipo II. Pacientes com infecção ocorrendo após episódio de bacteremia foram classificados como tipo III e aqueles com infecção crônica, ou seja, presente por mais de um mês, foram classificados como tipo IV (180).

4.9 Análise dos resultados

As análises descritivas para os dados quantitativos foram analisadas e apresentadas na forma de médias, acompanhadas dos respectivos desvios padrão (DP), medianas, e valores mínimos e máximos. As variáveis categóricas foram expressas por meio de suas frequências e porcentagens. Para comparar os parâmetros que apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste T de Student. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney. Para a comparação entre mais de 2 grupos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA). As variáveis categóricas foram analisadas com o teste de Qui Quadrado ou Exato de Fisher, quando necessário. Os valores de sensibilidade (verdadeiros positivos (VP) / [VP + falso negativos (FN)]), da especificidade (verdadeiros negativos (VN) / [falsos positivos (FP) + VN]), do valor preditivo positivo (VPP) ($VP / [VP + FP]$) e o valor preditivo negativo (VPN) ($VN / [FN + VN]$), assim como a área sob a curva (AUC, do inglês "*area under the curve*") da curva ROC (do inglês "*receiver operator characteristic*") foram calculados considerando-se como padrão ouro a adaptação dos critérios definidores de infecção propostos em 2013. A acurácia dos métodos diagnósticos propostos foi calculada pelo somatório dos VP e VN

dividido pelo número de testes feitos. Os pontos de corte para os metabólitos avaliados foram determinados a partir do índice de Youden. Todas as análises foram realizadas no software Med Calc e GraphPad Prism. O valor de p foi considerado significativo quando menor que 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 População de estudo

Foram incluídos no estudo 21 pacientes. A partir da avaliação dos dados clínicos e exames laboratoriais, os pacientes foram avaliados quanto ao diagnóstico de IAP de acordo com os critérios propostos em 2018. Dessa forma, 11 pacientes foram diagnosticados com IAP e compuseram o grupo infecção, e 10 integraram o grupo não infecção. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação à idade ($p=0,587$), sexo ($p=0,182$), IMC, ($p=0,833$) e presença de comorbidades. As características demográficas de ambos os grupos estão resumidas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Características dos participantes do estudo.

Variável	Não infecção (n=10)	Infecção (n=11)	P
Idade (anos)	73,3 ± 5,87	71,5 ± 8,8	0,587 a
Sexo			0,182 ^b
Masculino	2	6	
Feminino	8	5	
IMC (kg/m ²)	31,1 ± 4,9	31,6 ± 6,2	0,833 a
Comorbidades			-
HAS	9	9	
DM	2	3	
Doença Coronariana	1	2	
Doença Renal	1	3	

Hipotireoidismo	0	2
DPOC	1	1
Insuficiência Vascular	1	1
Hepatite	0	1

^a teste t, ^b teste exato de Fischer, HAS: Hipertensão arterial sistêmica, DM: Diabetes mellitus, DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica.

Nos pacientes do grupo não infecção, as causas de falha da artroplastia primária foram: soltura asséptica (5 pacientes), fratura periprotética (1 paciente), quebra do implante (1 paciente), instabilidade (1 paciente), dor (1 paciente) e lesão do mecanismo extensor (1 paciente).

Os pacientes do grupo infecção foram avaliados segundo as classificações temporais (30 dias) e Tsukayama (**Tabela 2**).

Tabela 2. Distribuição dos pacientes de acordo com as classificações da infecção articular periprotética.

Classificações	Número de pacientes
Temporal (30 dias)	
Aguda	4
Crônica	7
Tsukayama	
Tipo I	3
Tipo II	5
Tipo III	0
Tipo IV	3

Nenhum paciente do grupo infecção apresentou fístula. Todos os onze pacientes avaliados neste grupo apresentaram duas ou mais culturas microbiológicas positivas para o mesmo patógeno. Nove pacientes apresentaram infecções monomicrobianas, sendo identificadas bactérias Gram-positivas em oito pacientes. Apenas um paciente apresentou infecção com

agente Gram-negativo. Nos dois pacientes que apresentaram infecções polimicrobianas, as associações dos micro-organismos identificados foram: *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, e *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella aerogenes* e *Staphylococcus epidermidis*.

As bactérias identificadas nas culturas microbiológicas dos pacientes com IAP e a frequência com que foram identificadas estão descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Distribuição e frequência dos patógenos identificados nas culturas microbiológicas dos pacientes com infecção periprotética.

Micro-organismo	Frequência
<i>Staphylococcus aureus</i>	5
<i>Staphylococcus cohnii</i>	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	2
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1
<i>Staphylococcus hominis</i>	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1

5.2 Exames laboratoriais

5.2.1 VHS e PCR

A avaliação da VHS foi realizada em nove pacientes do grupo não infecção e 10 do grupo infecção. A mediana deste parâmetro no grupo infecção foi de 75 mm/h (IIQ: 27,25 – 96,25) e, no grupo não infecção, foi de 50 mm/h

(IIQ: 12 – 61,5), não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 5).

Identificamos que 44,4% (4/9) dos pacientes do grupo não infecção apresentaram valor de VHS superior ao ponto de corte do critério ICM 2018. No grupo infecção, 30% (3/10) dos pacientes apresentaram valor de VHS abaixo do valor de corte. Dessa forma, os valores de sensibilidade e especificidade encontrados foram de 70% e 55,56%, respectivamente.

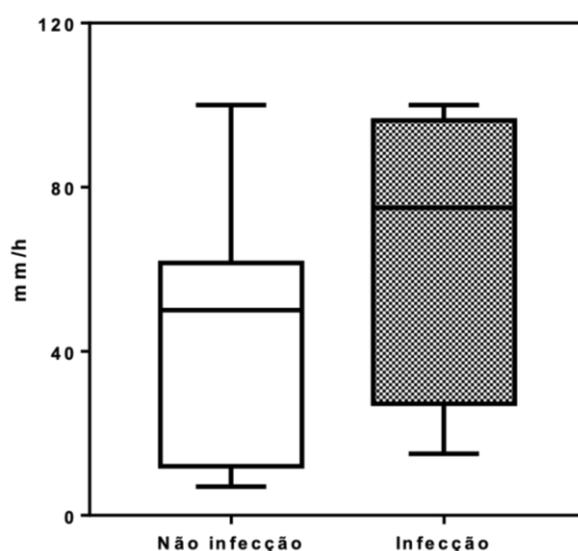


Figura 5. Velocidade de hemossedimentação. A VHS dos pacientes do grupo infecção e grupo não infecção foi quantificada. A linha horizontal indica a mediana dos valores obtidos. As linhas horizontais das extremidades dos retângulos representam os valores de amplitude interquartil, e as barras indicam os valores mínimos e máximos para cada grupo.

Em relação à quantificação da PCR no plasma, a mediana do grupo infecção foi 5,26 mg/dL (IIQ: 1,5 – 12,73) e do grupo não infecção foi de 0,36 mg/dL (IIQ: 0,1 – 1,44), diferença estatisticamente significativa ($p = 0,03$) (Figura 6).

Identificamos que 33,3% (3/9) dos pacientes do grupo não infecção apresentaram valores de PCR superior ao ponto de corte do critério ICM 2018.

Já no grupo infecção, 18,1% (2/11) dos pacientes apresentaram níveis abaixo do ponto de corte. Os valores de sensibilidade e especificidade encontrados foram de 81,82% e 66,67%, respectivamente.

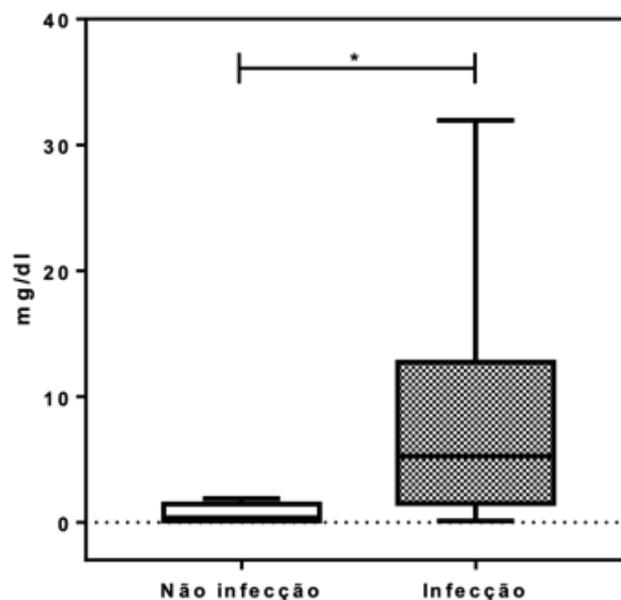


Figura 6. Proteína C reativa. A PCR dos pacientes do grupo infecção e grupo não infecção foi quantificada. A linha horizontal indica a mediana dos valores obtidos. As linhas horizontais das extremidades dos retângulos representam os valores de amplitude interquartil, e as barras indicam os valores mínimos e máximos para cada grupo. * $p=0,03$. Teste t.

5.2.2 Contagem de leucócitos no líquido sinovial

A quantificação de leucócitos no LS foi realizada em 15 pacientes, sendo sete do grupo infecção e nove do grupo não infecção. A mediana do grupo infecção foi 32000 células/ μL (IIQ: 3800 - 205875), sendo significativamente maior que a mediana do grupo não infecção, que foi de 230 células/ μL (IIQ: 57 - 1875, $p=0,01$) (**Figura 7**).

Utilizando os pontos de corte sugeridos pelo ICM 2013 (10.000 células/ μL se menos de noventa dias após a cirurgia primária, e 3.000 células/ μL se mais de noventa dias), observamos resultado positivo para este teste em um paciente

do grupo não infecção e negativo em um paciente do grupo infecção. Dessa forma, encontramos valores de sensibilidade e especificidade de 85,71% e 88,89%, respectivamente.

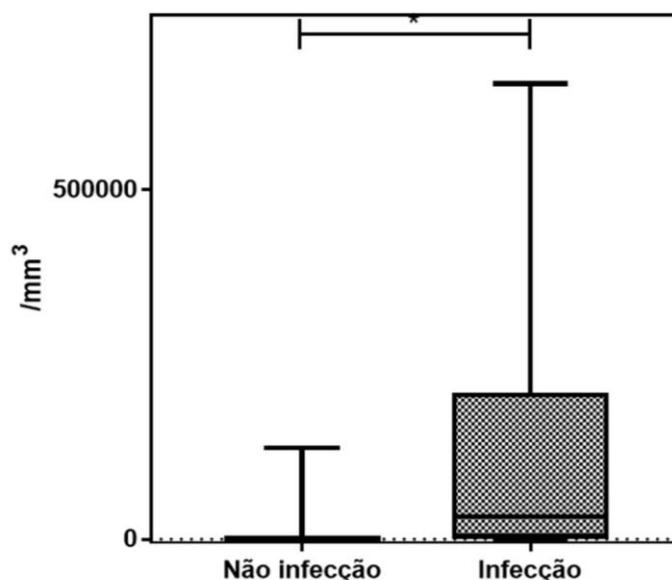


Figura 7. Contagem de células brancas no líquido sinovial. Foi determinada a contagem de células brancas no líquido sinovial dos pacientes do grupo infecção e do grupo não infecção. A linha horizontal indica a mediana dos valores obtidos. As linhas horizontais das extremidades dos retângulos representam os valores de amplitude interquartílica, e as barras indicam os valores mínimos e máximos para cada grupo. * $p=0,01$. Teste de Mann Whitney.

5.2.3 Percentual de polimorfonucleares no líquido sinovial

O percentual de PMN foi avaliado em 17 pacientes, sendo oito do grupo infecção e nove do grupo não infecção. Para avaliação do percentual de polimorfonucleares no líquido sinovial, foi usado o ponto de corte de 90% para os casos com menos de noventa dias após a cirurgia e de 80% para os casos com mais de noventa dias de pós-cirúrgico, como preconizado pelo ICM 2013. Identificamos que nenhum paciente do grupo não infecção apresentou percentual de PMN no líquido sinovial superior aos limites do critério, contudo,

cinco pacientes do grupo infecção apresentaram percentual de PMN inferiores ao limite para o diagnóstico de infecção.

A mediana do percentual de PMN no grupo infecção foi 63,5% (IIQ: 23 – 93,75) e, no grupo não infecção, foi de 30% (IIQ: 7,5 – 38,5), sendo significativamente maior no grupo infecção ($p = 0,034$) (**Figura 8**). Os valores de sensibilidade e especificidade foram 37,5% e 100%, respectivamente.

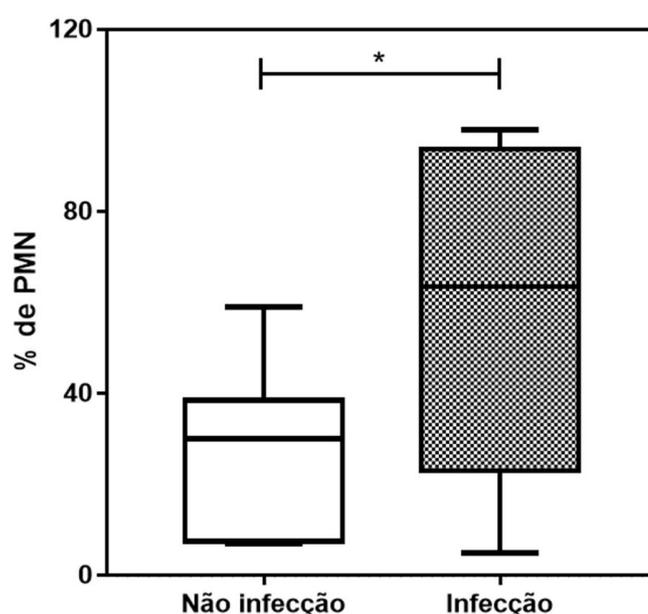


Figura 8. Percentual de células polimorfonucleares no líquido sinovial. Foi avaliado o percentual de polimorfonucleares no líquido sinovial dos pacientes do grupo infecção e no grupo não infecção. A linha horizontal indica a mediana dos valores obtidos. As linhas horizontais das extremidades dos retângulos representam os valores de amplitude interquartil, e as barras indicam os valores mínimos e máximos para cada grupo. Teste de Mann Whitney.

5.3 Espectroscopia por ressonância magnética nuclear

5.3.1 Identificação e quantificação dos metabólitos

Os líquidos sinoviais foram avaliados por RNM com o objetivo de identificar um perfil metabólico capaz de distinguir os pacientes com e sem IAP. A **Figura 9** mostra um espectro unidimensional ^1H RNM representativo do líquido sinovial de pacientes com e sem IAP. Esta análise evidenciou que os metabólitos mais abundantes foram lactato e a glicose.

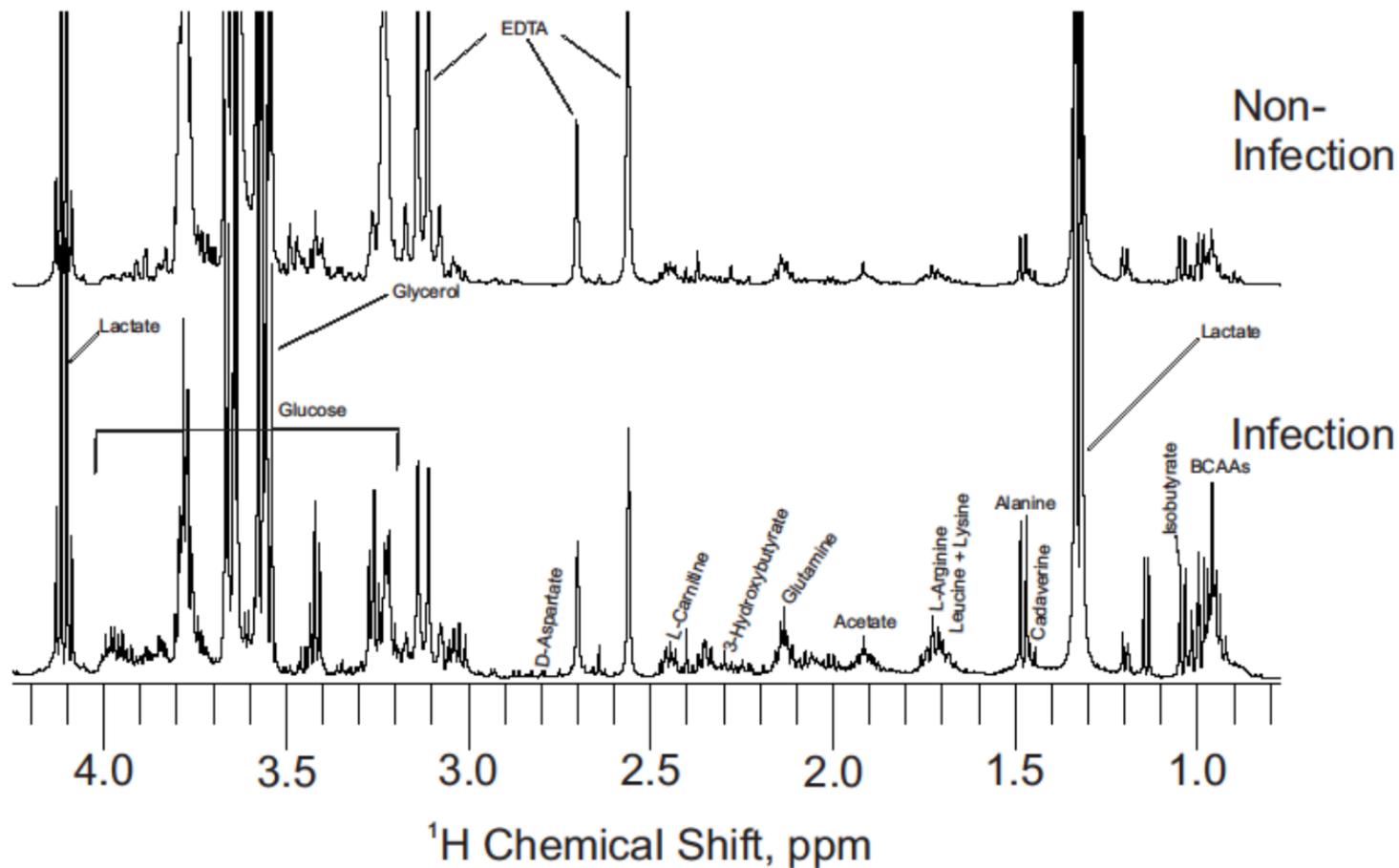


Figura 9. Perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com e sem infecção periprotética. Espectro unidimensional ¹H RNM representativo do líquido sinovial de pacientes sem (superior) e com (inferior) infecção articular periprotética.

Inicialmente, foram identificados 28 metabólitos nas amostras avaliadas (Tabela 4).

Tabela 4. Metabólitos identificados no líquido sinovial de pacientes submetidos à cirurgia de revisão de artroplastia total do joelho.

Metabólitos identificados
Butanol
Leucina
Valina
Etanol
3-Hidroxiacetato
Treonina
Lactato
Alanina
Acetato
Lisina
Tetra-hidrofurano
Ácido glutâmico
Glutamina
Ácido 3-hidroxi-propanoico
Carnitina
Citrato
Creatina
Fenilalanina
Histidina
Etanolamina
Cistina
Tirosina
Dietanolamina
Glicose
Betaína
Colina
Glicerol

5.3.2 Análise estatística e metabólitos diferencialmente abundantes

A análise multivariada não supervisionada não revelou uma separação clara entre os grupos, entretanto, identificamos que os pacientes do grupo infecção se distribuíram entre dois distintos perfis metabólicos do LS (**Figura 10**).

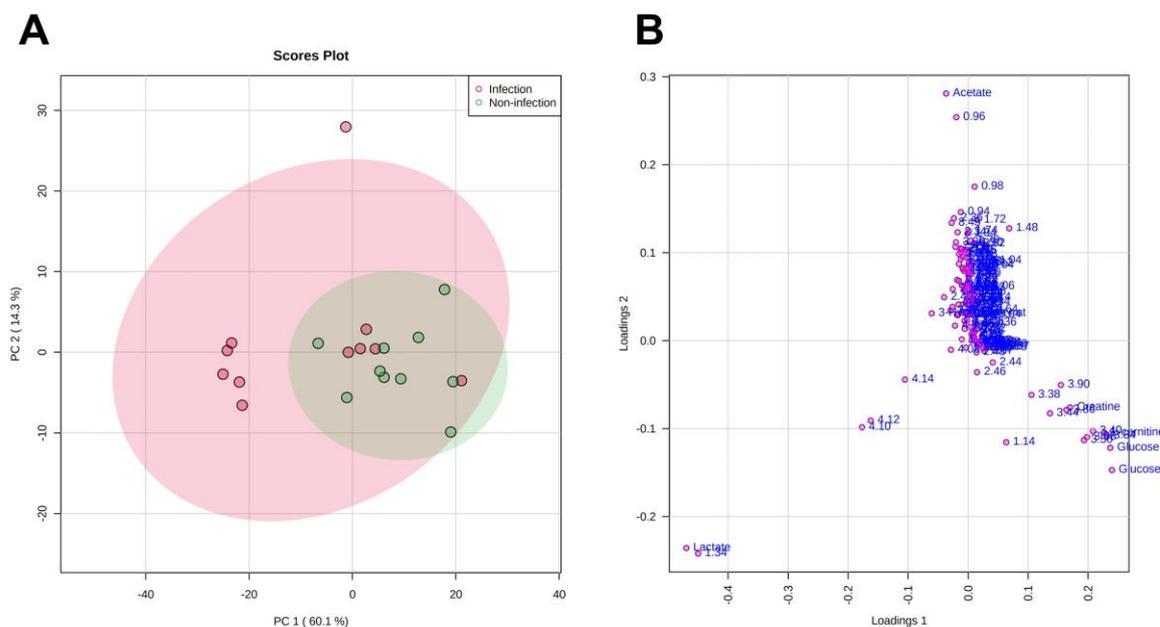


Figura 10. Discriminação dos pacientes com e sem infecção periprotética por análise dos componentes principais. (A) *Score-Plot* de PC1 versus PC2, em que cada ponto representa um paciente, sendo ponto vermelho - grupo infecção ; e verde – grupo não infecção. As elipses representam o intervalo de confiança de 95%. B) *Loading-Plot* (fator de carga), em que cada ponto rosa corresponde a um metabólito.

Através da avaliação do *Loading plot* (gráfico de fator de carga), foram identificados seis metabólitos que mais contribuíram para a separação entre os grupos: lactato, glicose, creatina, acetato e 3-hidroxiacetato. A comparação destes metabólitos entre os grupos, por meio da análise univariada, revelou que lactato, acetato e 3-hidroxiacetato se encontravam significativamente aumentados no grupo infecção, enquanto a glicose, e creatina foram significativamente menos abundantes neste grupo ($p=0,0045$) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Análise univariada: múltiplo Teste t entre os pacientes dos grupos com e sem infecção.

Metabólito	Desloc. químico (ppm)	Não infecção	Infecção	Status	P	Q*
Lactato	1.32	4785	7052	↑	<0.0001	<0.0000
Glicose	3.46-3.50	938	448	↓	<0.00001	0.0002
Creatina	3.92	585.6	310.7	↓	0.007	0.1002
Acetato	1.92	235.1	447	↑	0.03	0.445
3-Hidroxibutirato	1,20	242,2	448	↑	0.045	0.481

Dados apresentados como média da intensidade relativa de RNM \pm desvio padrão. ^a grupo infecção em relação ao grupo não infecção. * múltiplo Teste t.

Uma vez que foram identificados dois subgrupos dentre os pacientes com IAP, realizamos a análise multivariada apenas com os pacientes portadores de infecção periprotética, objetivando confirmar a existência dessa diferenciação no líquido sinovial, identificar os metabólitos que promovem essa distinção e buscar investigar possíveis causas desta variação. Esta análise indicou uma clara distinção dos pacientes portadores de IAP, confirmando a identificação de dois perfis metabólicos distintos no líquido sinovial dos pacientes com IAP (**Figura 11**).

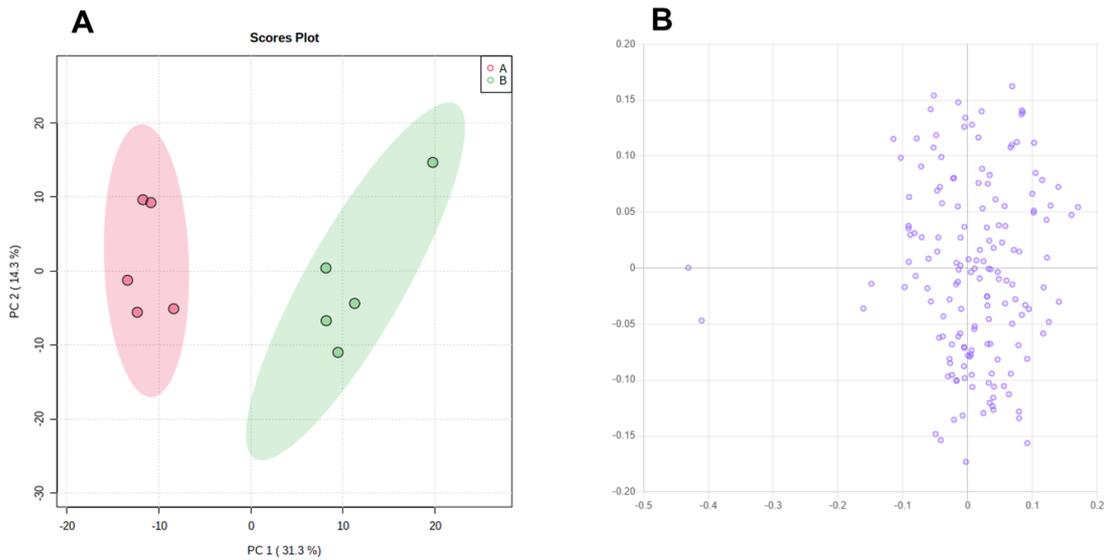


Figura 11. Discriminação dos subgrupos identificados dentre os pacientes do grupo infecção por análise dos componentes principais. (A) *Score-Plot* de PC1 versus PC2, em que cada ponto representa um paciente do grupo IAP, sendo os pontos vermelhos do subgrupo A e os pontos verdes pacientes com IAP subgrupo B. As elipses representam o intervalo de confiança de 95%. B) *Loading-Plot* (fator de carga), em que cada ponto rosa corresponde a um metabólito.

Através da avaliação do *Loading plot*, identificamos que o composto que mais contribuiu para a separação entre os subgrupos dos pacientes com infecção periprotética foi o lactato, cuja abundância variou, aproximadamente, duas vezes entre os subgrupos (**Figura 12**).

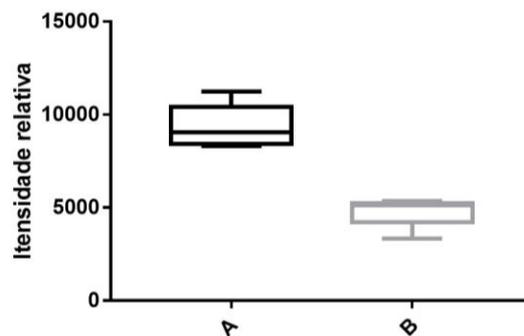


Figura 12. Comparação da abundância de lactato entre os subgrupos identificados nos pacientes com infecção periprotética. O gráfico representa a intensidade relativa quantificada para cada grupo. A linha horizontal indica a mediana dos valores obtidos. As linhas horizontais das extremidades dos retângulos representam os valores de amplitude interquartil, e as barras indicam os valores mínimos e máximos para cada grupo.

Objetivando identificar potenciais fatores associados aos perfis distintos identificados no grupo infecção, os pacientes deste grupo contaminados por bactérias do gênero *Staphylococcus* foram categorizados quanto à infecção por *Staphylococcus* coagulase-negativa ou positiva. A análise multivariada não supervisionada, considerando estes dois subgrupos, não resultou em uma clara distinção entre os grupos (**Figura 13**).

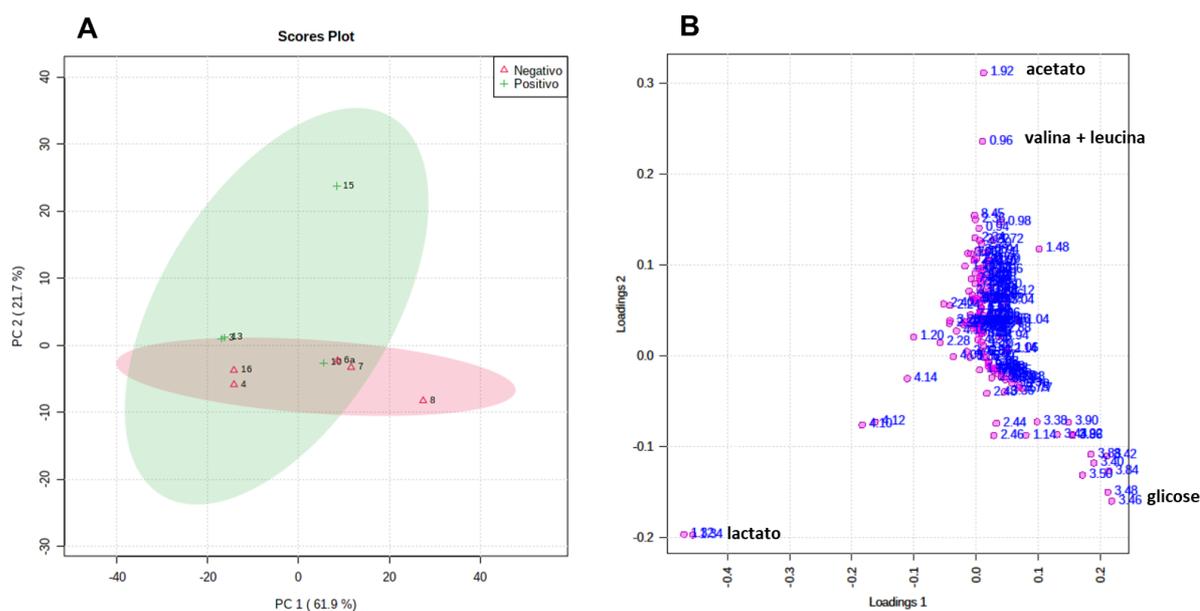


Figura 13. Discriminação dos pacientes com infecção causada por bactérias *Staphylococcus* coagulase negativa ou positiva por análise dos componentes principais. (A) *Score-Plot* de PC1 versus PC2, em que cada ponto representa um paciente. As elipses representam o intervalo de confiança de 95%. (B) *Loading-Plot* (fator de carga), em que cada ponto rosa corresponde a um metabólito. Vermelho – pacientes contaminados por *Staphylococcus* coagulase negativa, verde – pacientes contaminados por *Staphylococcus* coagulase positiva.

Na avaliação do *Loading plot*, foi possível identificar os quatro compostos que mais contribuíram para a separação entre os grupos: acetato, valina + leucina, lactato e glicose, entretanto, na análise univariada, estes fatores não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (**Tabela 6**).

Tabela 6. Análise univariada: múltiplo Teste t entre os pacientes dos grupos coagulase negativo e coagulase positivo.

Metabólito	Coagulase-negativa	Coagulase-positiva	Status ^a	P valor [*]	Q valor
Acetato	219,4 ± 36,2	774,1 ± 852,3	↑	0,0086	0,476
Valina + Leucina	437,2 ± 77,2	781,7 ± 636,5	-	0,102	>0,99
Lactato	6782 ± 3245	7502 ± 1476	↑	0,0006	0,055
Glicose	668 ± 470,6	296,8 ± 303,6	↓	0,078	>0,99

Dados apresentados como média da intensidade relativa de RNM ± desvio padrão.^a grupo coagulase-positiva em relação ao grupo coagulase-negativa. * múltiplo Teste T.

Os pacientes foram categorizados ainda em relação à infecção causada por *S. aureus* versus outros patógenos. Na **Figura 14A** está apresentado o gráfico da análise de componentes principais, com a indicação dos patógenos identificados em cada amostra de líquido sinovial dos pacientes do grupo infectado. Nesta análise, foi possível obter uma distinção parcial entre os grupos.

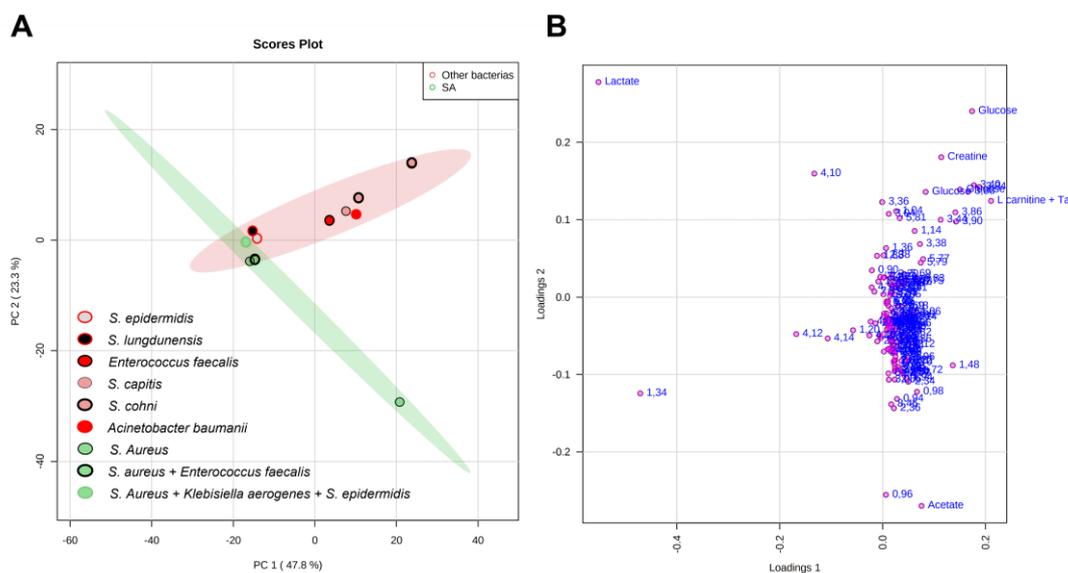


Figura 14. Discriminação dos pacientes com infecção causada por bactérias *Staphylococcus aureus* por análise dos componentes principais. (A) Score-Plot de PC1 versus PC2, onde cada ponto representa um paciente. As elipses representam o intervalo de confiança de 95%. (B) Loading-Plot (fator de carga), onde cada ponto rosa corresponde a um metabólito. Verde – pacientes contaminados por *Staphylococcus*

aureus, vermelho – pacientes contaminados por outras bactérias. As diferentes avriações de vermelho indicam os diferentes patógenos encontrados, de acordo com a legenda do gráfico.

Na avaliação do *Loading plot*, foi possível identificar que o lactato e o acetato foram os compostos que mais contribuíram para a separação entre os grupos. A análise univariada confirmou que ambos os compostos se encontravam aumentados nas infecções causadas por *S. aureus* em relação às causadas por outros patógenos.

Tabela 7. Análise univariada: múltiplo Teste t entre os pacientes dos grupos com infecção causada por *S. aureus* versus infecção causada por outros patógenos.

Metabólito	<i>S. aureus</i>	Outros	Status ^a	P valor	Q valor
				*	
Acetato	833,8 ± 811,3	226,1 ± 32,6	↑	0,0086	0,476
Lactato	8571 ± 765,6	6331 ± 2760	↑	0,0006	0,055

Dados apresentados como média da intensidade relativa de RNM ± desvio padrão.^a grupo coagulase-positiva em relação ao grupo coagulase-negativa. * múltiplo Teste T.

A seguir, os pacientes do grupo infecção foram categorizados quanto à cronicidade da infecção, considerando o critério temporal, que classifica as infecções ocorrendo em até 30 dias como agudas e aquelas ocorridas com mais de 30 dias como crônicas. A análise multivariada não supervisionada não evidenciou uma distinção entre os grupos (**Figura 15**).

Dados apresentados como média da intensidade relativa de RNM \pm desvio padrão.^a grupo crônica em relação ao grupo aguda. * múltiplo Teste T.

Por fim, os pacientes do grupo infecção foram agrupados segundo a classificação de Tsukayama. A análise multivariada não resultou em uma separação entre os grupos Tsukayama I, II e IV. (**Figura 16**).

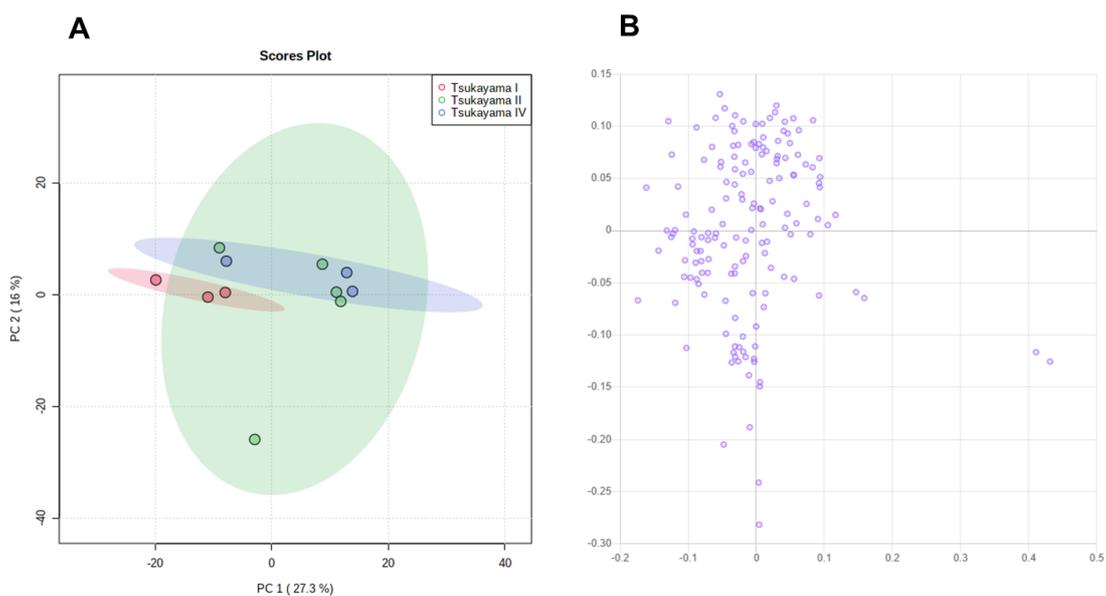


Figura 16. Discriminação dos pacientes classificados segundo os critérios de Tsukayama por análise dos componentes principais. (A) *Score-Plot* de PC1 versus PC2, em que cada ponto representa um paciente. As elipses representam o intervalo de confiança de 95%. (B) *Loading-Plot* (fator de carga), em que cada ponto rosa corresponde a um metabólito. Vermelho – pacientes Tsukayama I, verde – pacientes Tsukayama II e azul - Tsukayama IV.

Através da avaliação do *Loading plot*, identificamos três compostos que apresentaram maior variabilidade entre os grupos: lactato, acetato e valina + leucina, entretanto, nenhum deles apresentou diferenças significativas entre os grupos (**Tabela 9**).

Tabela 9. Comparação entre os pacientes classificados de acordo com a classificação de Tsukayama.

Metabólito	Tsukayama I	Tsukayama II	Tsukayama III	P valor *
Acetato	217,8 ± 50,7	713 ± 752,7	233,1 ± 20,4	0,366
Valina + Leucina	404,5 ± 36,6	711 ± 575,4	441,4 ± 112,5	0,535
Lactato	4544 ± 1040	7871 ± 1700	8540 ± 2798	0,074

Dados apresentados como média da intensidade relativa de RNM ± desvio padrão. ANOVA.

Por fim, foi determinada a performance diagnóstica dos metabólitos diferencialmente abundantes entre os pacientes com e sem IAP. Na **Figura 17** estão representadas as curvas ROC de cada metabólito, considerando como referência, o critério diagnóstico ICM 2018.

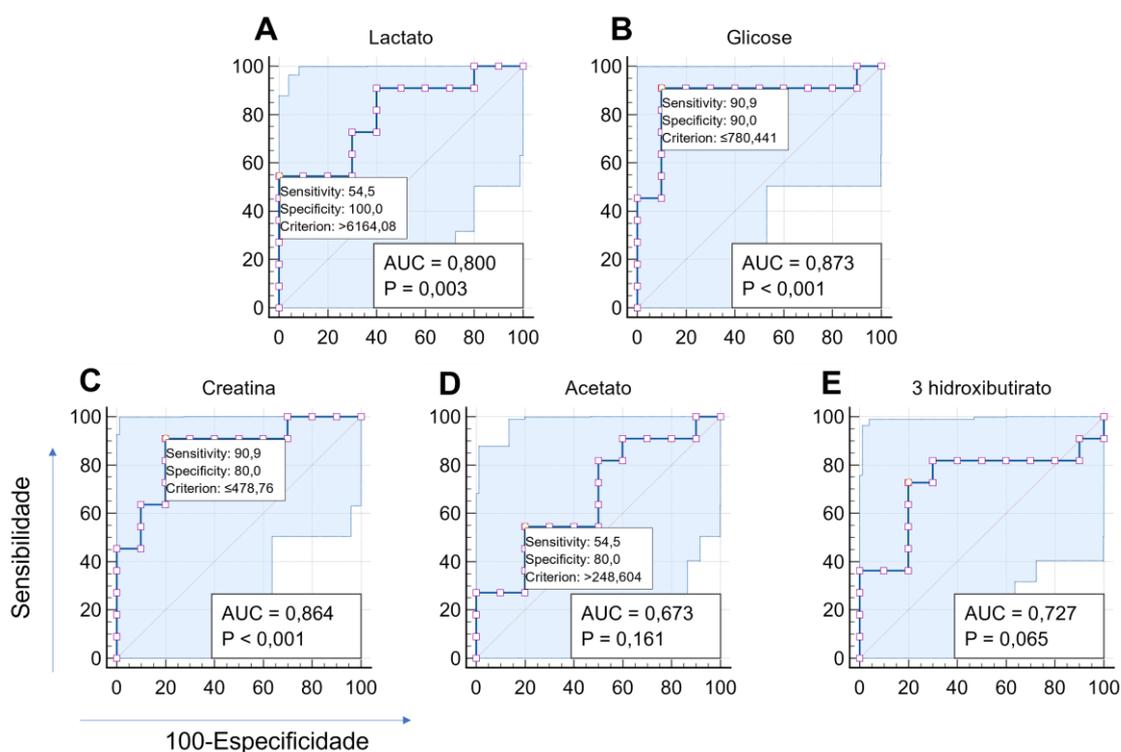


Figura 17. Curvas ROC dos metabólitos diferencialmente abundantes entre os pacientes com e sem infecção periprotética. A área sobre a curva ROC foi determinada (A) lactato, (B) glicose, (C) creatina, (D) acetato e (E) 3-hidroxiacetato.

Na **Tabela 10**, estão discriminados os pontos de corte, sensibilidade e especificidade para cada metabólito, onde é possível observar que a glicose, a creatina e o lactato apresentaram a melhor performance diagnóstica, com AUC ROC maior que 0,8.

Tabela 10. Performance diagnóstica dos metabólitos para identificação da IAP.

Metabólito	AUC ROC [IC95]	Cutoff	Índice de Youden	Sensib.	Especif.
3-Hidroxibutirato	0,73 [0,492 – 0,896]	> 297,5	0,52	72,8	80
Lactato	0,8 [0,57 – 0,94]	> 6164	0,545	54,6	100
Acetato	0,673 [0,436 – 0,858]	> 248	0,34	54,6	80
Glicose	0,873 [0,656 – 0,976]	≤ 780,4	0,809	90,9	90
Creatina	0,864 [0,644 – 0,972]	≤ 478,7	0,709	90,9	80

Uma vez que encontramos diferenças entre o lactato e o acetato entre os pacientes com IAP causadas por *S. aureus* em relação as infecções causadas por outras bactérias, avaliamos se este metabólito poderia ser utilizado para discriminar as infecções causadas pelo patógeno *S. aureus*. A curva ROC para ambos os metabólitos está demonstrada na **Figura 18**, onde pode ser observado que o acetato apresentou AUC ROC de 0,92, enquanto a do lactato foi de 0,75.

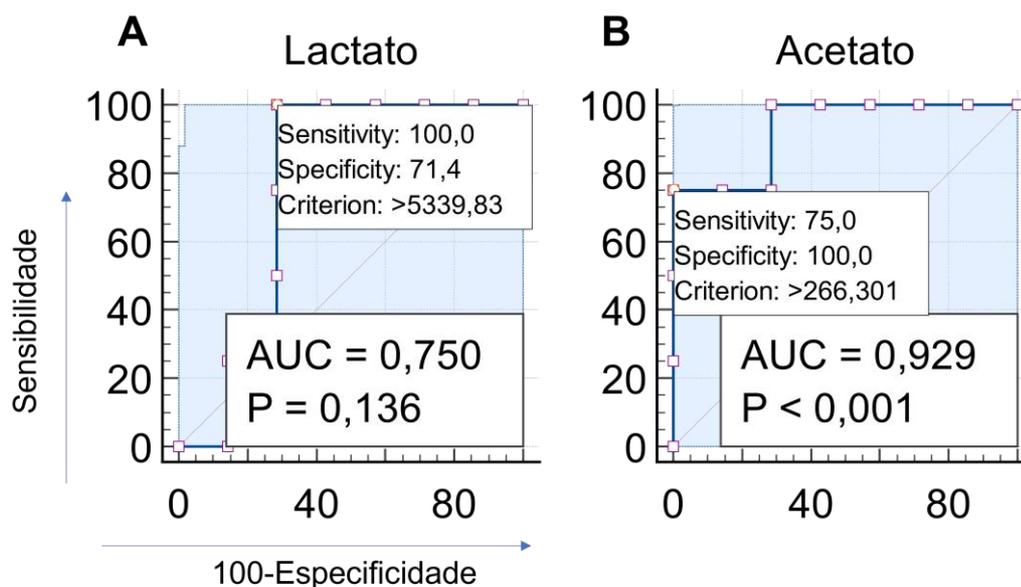


Figura 18. Curvas ROC dos metabólitos diferencialmente abundantes entre os pacientes com infecção periprotética causadas ou não por *Staphylococcus aureus*. A área sobre a curva ROC foi determinada para os seguintes metabólitos: (A) lactato, (B) acetato.

A avaliação da performance diagnóstica de ambos os marcadores, de forma isolada ou combinada, ou seja, lactato ou acetato aumentados, revelou que o acetato apresentou significativa sensibilidade e especificidade para discriminar as infecções causada por *S. aureus* (**Tabela 11**).

Tabela 11. Performance diagnóstica do acetato e do lactato para identificação das infecções causadas por *Staphylococcus aureus*.

Metabólito	AUC ROC [IC95]	Cutoff	Índice de Youden	Sensib.	Especif.
Lactato	0,75 [0,412 – 0,95]	> 5339	0,71	100	71
Acetato	0,929 [0,612 – 0,99]	> 266	0,75	75	100
Lactato ou Acetato	0,714 [0,378 – 0,933]	-	0,42	100	42

No último século, o rápido crescimento do conhecimento sobre metabolismo, arquitetura das vias metabólicas e seus efeitos na função celular está abrindo novos caminhos na compreensão dos processos fisiológicos e patológicos. Em doenças infecciosas, novas evidências mostraram que o patógeno e as células hospedeiras se envolvem na modulação bidirecional de seu respectivo metabolismo, regulando, assim, a função celular, o que determina a progressão e os resultados da doença (82,181,182). Aqui realizamos uma análise abrangente dos metabólitos no líquido sinovial de pacientes com IAP e mostramos que o microambiente periprotético infectado tem um perfil metabólico distinto caracterizado por níveis aumentados de lactato, acetato e 3-hidroxiacetato, e níveis reduzidos de glicose e creatina. Além disso, nossos resultados revelam que o líquido sinovial de pacientes com IAP infectados por *S. aureus* apresenta maiores quantidades de lactato em comparação com o líquido sinovial de pacientes infectados com outros patógenos. Este estudo difere dos anteriores por ser o primeiro que avalia exclusivamente pacientes com próteses de joelho tanto no grupo IAP quanto no grupo controle.

Estudos anteriores já analisaram os níveis de metabólitos isolados no líquido sinovial infectado. Níveis reduzidos de glicose foram relatados no líquido sinovial de pacientes com artrite séptica e IAP (183). Essa redução nos níveis de glicose tem sido atribuída ao metabolismo bacteriano que acarreta redução na concentração de glicose no líquido sinovial infectado (184). O lactato, também, foi avaliado e estudos demonstraram que o enantiômero D-lactato, um metabólito específico do patógeno, está aumentado no soro e no líquido sinovial

de pacientes com IAP, evidenciando que sua detecção em fluidos corporais pode ser útil para o diagnóstico dessa infecção (185,186). No entanto, uma análise abrangente da flutuação de metabólitos no líquido sinovial de pacientes com IAP pode revelar novos aspectos de processos celulares e adaptações metabólicas dentro do microambiente infectado, que não apenas podem ajudar na descoberta de novos biomarcadores potenciais, mas podem fornecer as bases para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras. Evidências recentes mostraram que um passo crítico na orquestração das células imunes é a reprogramação do seu metabolismo celular (80), o que significa que vias do metabolismo energético celular são alteradas durante a ativação e função das células imunes e que intermediários e produtos metabólicos dessas vias modulam a função das células imunes (182). Por outro lado, os patógenos também regulam seu metabolismo durante o curso da infecção e tal alteração impacta diretamente em sua virulência (82,83,187).

A presença de neutrófilos é um marco na IAP e vários aspectos relacionados à sua ativação e função são, frequentemente, utilizados como biomarcador para o diagnóstico da IAP (8,188). Os neutrófilos eliminam e destroem microrganismos através da fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), liberação de grânulos citotóxicos e 'NETose', em que os neutrófilos liberam seu DNA mitocondrial em estruturas semelhantes a redes para facilitar o aprisionamento bacteriano (189). Após a detecção de patógenos, essas células utilizam, principalmente, glicose e glicólise para alimentar sua explosão respiratória, que se refere à rápida geração de ROS através da conversão catalítica de O₂ molecular em espécies reativas de oxigênio (190). Os neutrófilos ativados exibem uma expressão de superfície aumentada de

transportadores de glicose que é acompanhada por um aumento da captação de glicose sendo convertida em piruvato pela via glicolítica (191). Sob condições de hipóxia, quando a demanda celular de oxigênio excede a oferta, o piruvato é oxidado a lactato e NAD⁺ através da ativação do fator induzível de hipóxia (HIF) nas células hospedeiras (192). Embora o estabelecimento de um ambiente hipóxico ainda não tenha sido abordado especificamente na IAP, estudos anteriores mostraram que em condições inflamatórias como artrite reumatoide ou osteoartrite, os níveis de pO₂ do líquido sinovial são reduzidos (193,194). A hipóxia no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide foi caracterizada por pH sinovial diminuído e níveis elevados de lactato, 3-hidroxiutarato e acetato (195,196). Notavelmente, o estabelecimento de um ambiente hipóxico é uma característica comum durante a inflamação associada à infecção bacteriana (197), e um estudo anterior mostrou que os neutrófilos que se acumulam no local da infecção do biofilme consomem grandes quantidades de oxigênio, criando, assim, um ambiente anaeróbico (198,199).

Além da hipóxia, foi demonstrado que os neutrófilos ativados não oxidam totalmente a glicose mesmo em condições de normoxia, ao contrário, o piruvato é, preferencialmente, oxidado a lactato pela ativação do metabolismo de Warburg, que é caracterizado por um aumento na taxa de captação de glicose, com produção preferencial de lactato, visando sintetizar NADPH para suportar sua explosão respiratória (80,200). O envolvimento do metabolismo de Warburg pode fornecer uma explicação plausível para o aumento da quantidade de acetato no líquido sinovial de pacientes com IAP. Este metabólito é um ácido graxo de cadeia curta que é gerado, principalmente, pela fermentação bacteriana no intestino grosso, apresentando propriedades imunomoduladoras. No entanto,

recentemente foi demonstrado que em condições de metabolismo celular hiperativo, como no efeito Warburg, o acetato pode ser gerado a partir do piruvato através de uma descarboxilação do piruvato mediada por ROS, proporcionando um aumento local desse metabólito (201,202).

Considerando o exposto, os níveis reduzidos de glicose associados ao aumento dos níveis de lactato e acetato observados em nosso estudo podem sugerir tanto o estabelecimento de um ambiente hipóxico quanto o envolvimento do metabolismo de Warburg pelos neutrófilos presentes no líquido sinovial. Mais estudos são necessários para abordar especificamente quais processos estão ocorrendo no microambiente infectado periprotético.

Vários estudos identificaram heterogeneidade funcional intrínseca no conjunto de neutrófilos humanos em condições fisiológicas e patológicas (203,204). Assim, diferentes subconjuntos de neutrófilos exibem programação metabólica distinta (205). Rice *et al.* mostraram que, com suprimento limitado de glicose, neutrófilos imaturos podem desencadear uma adaptação metabólica através do envolvimento no metabolismo mitocondrial oxidativo que promove a oxidação de ácidos graxos para apoiar a produção de ROS dependente de NADPH oxidase (206). Esse conjunto de neutrófilos imaturos compartilha várias características fenotípicas com células supressoras derivadas de mieloides (MDSC), que demonstraram estar aumentadas na IAP (206,207) e uma distinção clara entre ambas as células é metodologicamente difícil (204,208). Portanto, não se pode excluir que as MDSCs no microambiente infectado periprotético envolvam essa via metabólica, o que resulta na produção de 3-hidroxiacetato, fornecendo, assim, outra fonte potencial para esse metabólito, que encontramos aumentado no líquido sinovial de pacientes com IAP.

Do ponto de vista do patógeno, durante a infecção, vários aspectos da resposta imune limitam a respiração bacteriana (por exemplo, consumo excessivo de oxigênio pelas células imunes inatas, quelação de ferro, produção de óxido nítrico) (209,210). Além disso, foi demonstrado que uma variedade de micróbios entra na glicólise, uma via energeticamente menos eficiente, em um mecanismo conhecido como metabolismo de *overflow*, que é equivalente ao efeito Warburg (211). Por meio desse processo, substratos, como a glicose, não são totalmente oxidados pela via respiratória e, como resultado, metabólitos como acetato, lactato e metanol são excretados. Para ter sucesso nesse cenário metabólico de competição por glicose, foi demonstrado que patógenos como *S. aureus*, apresentam maior capacidade de captação de carboidratos, com consumo preferencial de glicose como adaptação metabólica que permite uma absorção mais eficiente de carboidratos (210).

Nas bactérias, acredita-se que o metabolismo de *overflow* seja um mecanismo que facilita a biossíntese de moléculas necessárias para a invasão e proliferação (82). Além disso, esse mecanismo tem sido associado ao rápido crescimento do patógeno, e tem sido proposto que a produção de enzimas necessárias para a respiração é, metabolicamente mais dispendiosa do que aquelas necessárias para a oxidação parcial da glicose, o que seria energeticamente ineficiente em suportar o crescimento rápido em comparação com a oxidação incompleta (211). Estudos anteriores com *E. coli* mostraram que a via do metabolismo de *overflow* está associada ao aumento da produção de acetato, apontando, também, essa via como uma fonte potencial de aumento de acetato no líquido sinovial de pacientes com IAP (212).

Um achado importante do nosso estudo foi a identificação de dois perfis metabólicos distintos em pacientes com IAP que apresentavam níveis distintos de lactato e poderiam ser discriminados com base na identificação de *S. aureus* como patógeno causador. Um estudo anterior de Palama *et al.* avaliou o perfil metabólico de 576 amostras de 6 espécies bacterianas e demonstrou que estratégias metabômicas baseadas em RNM permitiram a discriminação entre as espécies bacterianas avaliadas (170). Curiosamente, este estudo mostrou que as culturas de *S. aureus* apresentaram os maiores níveis de lactato e acetato entre as espécies bacterianas avaliadas. Portanto, nosso estudo corrobora esse achado, pois também identificamos um aumento da abundância de lactato no líquido sinovial de pacientes infectados por *S. aureus*. No entanto, devido ao pequeno número de pacientes em nossa coorte, novos estudos são necessários para confirmar esse achado. Além disso, novos estudos com líquido sinovial de pacientes com IAP causada por espécies bacterianas distintas podem resultar na identificação de metabólitos específicos que podem auxiliar na identificação de patógenos causadores de forma independente de cultura microbiológica. A **Figura 19**, apresenta um esquema da relação entre as alterações encontradas neste estudo, com as possíveis vias metabólicas envolvidas em tais alterações tanto em patógenos quanto nas células do sistema imune.

A compreensão da adaptação metabólica induzida em bactérias durante a infecção é de grande importância para o tratamento da IAP, pois vários estudos têm destacado a relação entre o metabolismo bacteriano e a eficácia antibiótica. Postula-se que i) o tratamento com antibióticos pode alterar o estado metabólico das bactérias; ii) o estado metabólico das bactérias influencia sua suscetibilidade aos antibióticos, e iii) a eficácia do antibiótico pode ser modulada alterando o

estado metabólico das bactérias (213,214). O tratamento da infecção articular periprotética permanece um desafio principalmente devido à formação de biofilme bacteriano e a falha do tratamento pode ocorrer em até 20% dos pacientes (215). No presente estudo não foram abordadas as diferenças metabólicas entre bactérias encontradas no estado planctônico e de biofilme, porém, nossos resultados podem abrir caminho para uma compreensão mais profunda da modulação das vias metabólicas em ambos os estados, possibilitando o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que resultem em melhores desfechos para pacientes com IAP.

Dois estudos na literatura buscaram diferenciar o líquido sinovial com e sem infecções articulares. Importante notar que estes estudos não avaliaram exclusivamente paciente com IAP, particularmente no grupo controle, o que representa uma importante limitação já que a presença do implante, por si só pode resultar em alterações no microambiente articular (169,177). Akhbari *et al.* avaliaram o LS de pacientes com infecção articular e encontraram 16 metabólitos diferencialmente abundantes entre os grupos, dentre eles a glicose e a creatinina, também encontradas alteradas em nosso estudo (169). A população do estudo era composta por pacientes com infecções de joelho e cotovelo, assim como pacientes com próteses de quadril e joelho. De forma interessante, os outros metabólitos encontrados como alterados no estudo de Akhbari *et al.* participam das mesmas vias ou apresentam atividade similar aos metabólitos encontrados neste estudo, sugerindo que uma mesma via metabólica está sendo ativada, ou a ativação de vias redundantes, resultando em um mesmo produto final.

Outro estudo importante é o de Anderson *et al.* que avaliou o LS de cavalos com doenças articulares de origem infecciosa ou não (177), identificando 55 metabólitos no líquido sinovial, com 13 deles apresentando diferenças entre as condições sépticas e assépticas. Importante salientar que neste estudo, apesar dos autores avaliarem especificamente o LS, os pacientes do grupo infecção apresentavam diagnóstico de sepse, e nenhum caso apresentava implante ortopédico. Apesar das limitações, o autor encontra uma assinatura metabólica específica da infecção, caracterizada por alterações em vários metabólitos, dentre eles o acetato, a glicose, a creatina fosfato e creatinina, que também foram encontradas alteradas em nossas análises (177).

De uma forma geral, os testes diagnósticos disponíveis, atualmente, para diagnóstico da IAP avaliam dois aspectos principais da infecção: a presença de bactérias e a resposta imunológica deflagrada para combater o patógeno. Interessante ressaltar que todos os marcadores do consenso, sejam eles sorológicos ou do LS, identificam moléculas originárias do hospedeiro. Os marcadores do LS, particularmente avaliam, geralmente os neutrófilos ou moléculas originadas destas células. O único teste que avalia aspectos relacionados ao patógeno é a cultura microbiológica que, até o presente momento, é o único teste, amplamente disponível, capaz de identificar o patógeno infectante. Neste cenário, os estudos de metabolômica fornecem evidências sobre o funcionamento dos sistemas biológicos de uma forma bastante abrangente. A vantagem desta metodologia é que ela, além de permitir uma melhor compreensão do microambiente da IAP, considerando tanto o hospedeiro quanto o patógeno, permite a identificação de potenciais biomarcadores que podem auxiliar no diagnóstico desta complicação. A identificação de biomarcadores através de experimentos de metabolômica tem sido bem sucedida em doenças como câncer (216), sepse (217), infecções virais (218,219), entre outras. Em relação às doenças infecciosas esta abordagem pode permitir, além da identificação de biomarcadores diagnóstico, a identificação do agente etiológico (220), severidade (221) e desfecho da infecção (222,223). Um estudo realizado com paciente com infecção causada pelo vírus H1N1 mostrou que a avaliação dos metabólitos permitiu a discriminação entre infecções virais versus bacterianas, a identificação de pacientes com maior risco de necessitar de ventilação mecânica, e o risco de mortalidade em 90 dias (222).

Em nossa análise, apesar do pequeno número de pacientes na amostra, foi possível evidenciar que o lactato, a glicose e a creatina apresentaram uma boa performance diagnóstica, com AUC ROC maior que 0,8, com os três últimos apresentando, ainda, níveis elevados de sensibilidade e especificidade. Estudos anteriores encontraram níveis reduzidos de glicose no LS de pacientes com IAP. Este biomarcador foi avaliado através de teste rápido, utilizando fitas de urinálise e apresentou AUC ROC de 0,943; com sensibilidade e especificidade de 90% e 98%, respectivamente (183). O D-lactato, também, foi avaliado e se mostrou um biomarcador patógeno específico, apresentando sensibilidade variando de 94% a 96% e especificidade variando de 78% a 88% (147,186).

Um importante exemplo de como os estudos de metabolômica podem ser úteis na identificação de novos biomarcadores é a infecção urinária. A partir de estudos de metabolômica previamente realizados (224,225). Gupta *et al.* (224) foram capazes de identificar uma assinatura metabólica baseada na avaliação de acetato, lactato, formato e succinato, capaz de discriminar pacientes com infecção urinária dos indivíduos controle, apresentando AUC ROC de 0,996 [0,992 – 1,001] . Além disso, este mesmo conjunto de marcadores foi capaz de distinguir infecções causadas por bactérias gram-positivas ou negativas, com AUC ROC de 0,975 [0,957 – 0,993], indicando a potencial capacidade de diagnóstico diferencial deste método e a notável capacidade da metabolômica em apontar potenciais novos biomarcadores.

Não encontramos, na literatura, estudos que tenham avaliado, especificamente, os níveis de 3-hidroxiacetato, acetato ou creatina no líquido sinovial de pacientes IAP. Entretanto, como mencionado anteriormente, o acetato, já se mostrou um bom marcador na identificação da infecção urinária.

Dessa forma, acreditamos que a partir dos nossos resultados, novos estudos possam ser desenvolvidos com o objetivo de avaliar os níveis destas moléculas no LS de pacientes com IAP, e avaliar seu potencial com biomarcador desta doença.

Atualmente a microbiologia é o único exame capaz de identificar o patógeno causador da IAP (226). Em nosso estudo, ao compararmos o perfil metabólico do LS de pacientes com infecções causadas por *S. aureus* versus aquelas causadas por outros patógenos, identificamos uma diferença significativa nos níveis de acetato e lactato. De forma interessante, a AUC ROC do acetato para discriminação do *S. aureus* como agente etiológico foi de 0,92, com sensibilidade de 75% e especificidade de 100%, apresentando-se, assim, como um biomarcador com elevado potencial para fornecer uma perspectiva inicial quanto ao agente causador, que auxilie na escolha da estratégia terapêutica a ser adotada até a confirmação pelos ensaios microbiológicos, o que pode demorar até 14 dias. Em nossa amostra, apesar do lactato se encontrar significativamente elevado no LS de pacientes com IAP, ele apresentou limitado potencial em discriminar as infecções causadas por *S. aureus*. No estudo de Karbysheva *et al.*, ao avaliarem os níveis no enantiômero D-lactato no LS de pacientes com IAP, encontraram variações de acordo com o tipo de patógeno isolado na amostra, sendo menor em infecções causadas por patógenos de baixa virulência, como os *Staphylococcus-coagulase* negativa em relação às de alta virulência como as causadas por *Streptococcus sp.* e *S. aureus* (147). Os autores não avaliaram especificamente o potencial diagnóstico do D-lactato em discriminar as infecções de alta virulência ou aquelas causadas por *S. aureus*.

Dessa forma, novos estudos são necessários para confirmar ou refutar o uso deste biomarcador na identificação inicial do agente etiológico.

É importante ressaltar que, apesar de nosso estudo evidenciar novos potenciais biomarcadores do líquido sinovial, novos estudos são necessários para confirmar tais achados através de metodologias quantitativas mais acuradas.

Este estudo apresenta algumas limitações. O número de pacientes incluídos em nossa amostra, apesar de ser o maior em relação a outros estudos que utilizaram esta metodologia no contexto das infecções ósseas e articulares, prejudicou a realização de análises de subgrupos para identificar perfis metabólicos distintos associados a patógenos infectantes específicos. Além disso, como a infecção envolve patógenos microbianos e a imunidade do hospedeiro, e como a maioria dos metabólitos envolvidos nas vias procarióticas e eucarióticas são semelhantes, é difícil distinguir entre a resposta metabólica induzida pelo hospedeiro e a via metabólica do patógeno, portanto, mais estudos abordando, especificamente, as vias celulares e os mecanismos moleculares envolvidos nas adaptações metabólicas aqui propostas são necessários.

7 CONCLUSÃO

- Em nosso estudo, foi possível identificar e anotar 28 metabólitos no líquido sinovial de pacientes com prótese de joelho submetidos à cirurgia de revisão da artroplastia de joelho;
- Nossos resultados evidenciaram um perfil metabólico específico no líquido sinovial de pacientes com IAP, caracterizado pelo aumento de lactato, acetato e 3-hidroxiacetato e níveis reduzidos de glicose e creatina em relação aos pacientes com falha asséptica da IAP. Além disso, pacientes com IAP causada por *S. aureus* apresentam elevados níveis de acetato e lactato no LS.
- O lactato, a glicose e a creatina se apresentam como potenciais biomarcadores para o diagnóstico da IAP, apresentando AUC ROC maior que 0,8, com os três últimos apresentando, ainda, níveis elevados de sensibilidade e especificidade. O acetato demonstrou ser um potencial biomarcador para a discriminação das infecções causadas por *S. aureus*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beyer F, Pape A, Lützner C, Kirschner S, Lützner J. Similar outcomes in computer-assisted and conventional total knee arthroplasty: ten-year results of a prospective randomized study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2021;22(1):707.
2. Cacciola G, Mancino F, De Meo F, Di Matteo V, Sculco PK, Cavaliere P, et al. Mid-term survivorship and clinical outcomes of the medial stabilized systems in primary total knee arthroplasty: A systematic review. *J Orthop.* 2021;24:157–64.
3. 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 Joint Surg Am.* 2007;89(4):780–5.
4. 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.* 2017;25(11):1797–803.
5. 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.* 2010;468(1):45–51.
6. Delanois RE, Mistry JB, Gwam CU, Mohamed NS, Choksi US, Mont MA. Current Epidemiology of Revision Total Knee Arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty.* 2017;32(9):2663–8.
7. Geary MB, Macknet DM, Ransone MP, Odum SD, Springer BD. Why Do Revision Total Knee Arthroplasties Fail? A Single-Center Review of 1632 Revision Total Knees Comparing Historic and Modern Cohorts. *J Arthroplasty.* 2020;35(10):2938–43.
8. Izakovicova P, Borens O, Trampuz A. Periprosthetic joint infection: current concepts and outlook. *EFORT Open Rev.* 2019;4(7):482–94.
9. Kalbian I, Park JW, Goswami K, Lee YK, Parvizi J, Koo KH. Culture-negative periprosthetic joint infection: prevalence, aetiology, evaluation, recommendations, and treatment. *Int Orthop.* 2020;44(7):1255–61.
10. Zhu MF, Kim K, Cavadino A, Coleman B, Munro JT, Young SW. Success Rates of Debridement, Antibiotics, and Implant Retention in 230 Infected Total Knee Arthroplasties: Implications for Classification of Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty.* 2021;36(1):305-

310.e1.

11. Zahar A, Kendoff DO, Klatt TO, Gehrke TA. Can Good Infection Control Be Obtained in One-stage Exchange of the Infected TKA to a Rotating Hinge Design? 10-year Results. *Clin Orthop*. 2016;474(1):81–7.
12. Young SW, Kim K, Zhu M, Munro JT. Success rates of debridement, antibiotics and implant retention (dair) in 230 infected total knee arthroplasties: implications for classification of periprosthetic joint infection. *Orthop Proc*. 2020;102-B(SUPP_9):4–4.
13. Carli AV, Abdelbary H, Ahmadzai N, Cheng W, Shea B, Hutton B, et al. Diagnostic Accuracy of Serum, Synovial, and Tissue Testing for Chronic Periprosthetic Joint Infection After Hip and Knee Replacements: A Systematic Review. *J Bone Jt Surg*. 2019;101(7):635–49.
14. Chen AF, Parvizi J. Emerging Technologies for the Diagnosis of Periprosthetic Infection. *JBJS Rev*. 2014;2(8):e1.
15. Chisari E, Parvizi J. Accuracy of blood-tests and synovial fluid-tests in the diagnosis of periprosthetic joint infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2020;18(11):1135–42.
16. Iorio R, Viglietta E, Mazza D, Petrucca A, Borro M, Iolanda S, et al. Accuracy and Cost-Effectiveness of a Novel Method for Alpha Defensins Measurement in the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infections. *J Arthroplasty*. 2021;36(9):3275–81.
17. Jacovides CL, Parvizi J, Adeli B, Jung KA. Molecular Markers for Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*. 2011;26(6, Supplement):99-103.e1.
18. Wasterlain AS, Goswami K, Ghasemi SA, Parvizi J. Diagnosis of Periprosthetic Infection: Recent Developments. *J Bone Joint Surg Am*. 2020;102(15):1366–75.
19. Chen Y, Kang X, Tao J, Zhang Y, Ying C, Lin W. Reliability of synovial fluid alpha-defensin and leukocyte esterase in diagnosing periprosthetic joint infection (PJI): a systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg*. 2019;14(1):453.
20. Keemu H, Vaura F, Maksimow A, Maksimow M, Jokela A, Hollmén M, et al. Novel Biomarkers for Diagnosing Periprosthetic Joint Infection from Synovial Fluid and Serum. *JB JS Open Access*. 2021;6(2):e20.00067.
21. Staats A, Li D, Sullivan AC, Stoodley P. Biofilm formation in periprosthetic joint infections. *Ann Jt*. 2021;6:43.
22. Shahi A, Parvizi J. The role of biomarkers in the diagnosis of periprosthetic joint infection.

EFORT Open Rev. 2016;1(7):275–8.

23. 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 Relat Res.* 2014;472(11):3254–62.
24. Eckhardt M, Hultquist JF, Kaake RM, Hüttenhain R, Krogan NJ. A systems approach to infectious disease. *Nat Rev Genet.* 2020;21(6):339–54.
25. Tounta V, Liu Y, Cheyne A, Larrouy-Maumus G. Metabolomics in infectious diseases and drug discovery. *Mol Omics.* 2021;17(3):376–93.
26. Sun L, Yang X, Yuan Z, Wang H. Metabolic Reprogramming in Immune Response and Tissue Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(9):1990–2001.
27. Hu C, Xuan Y, Zhang X, Liu Y, Yang S, Yang K. Immune cell metabolism and metabolic reprogramming. *Mol Biol Rep [Internet].* 13 de junho de 2022 [citado 11 de setembro de 2022]; Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07474-2>
28. Hortová-Kohoutková M, Lázníčková P, Frič J. How immune-cell fate and function are determined by metabolic pathway choice. *BioEssays.* 2021;43(2):2000067.
29. Tande AJ, Patel R. Prosthetic Joint Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(2):302–45.
30. Miller R, Higuera CA, Wu J, Klika A, Babic M, Piuze NS. Periprosthetic Joint Infection: A Review of Antibiotic Treatment. *JBJS Rev.* 2020;8(7):e19.00224.
31. Tubb CC, Polkowski GG, Krause B. Diagnosis and Prevention of Periprosthetic Joint Infections. *JAAOS - J Am Acad Orthop Surg.* 2020;28(8):e340.
32. Meehan JP, Danielsen B, Kim SH, Jamali AA, White RH. Younger Age Is Associated with a Higher Risk of Early Periprosthetic Joint Infection and Aseptic Mechanical Failure After Total Knee Arthroplasty: *J Bone Jt Surg-Am Vol.* 2014;96(7):529–35.
33. Kurtz SM, Lau E, Schmier J, Ong KL, Zhao K, Parvizi J. Infection burden for hip and knee arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty.* 2008;23(7):984–91.
34. Kamath AF, Ong KL, Lau E, Chan V, Vail TP, Rubash HE, et al. Quantifying the Burden of Revision Total Joint Arthroplasty for Periprosthetic Infection. *J Arthroplasty.* 2015;30(9):1492–7.
35. Evangelopoulos DS, Ahmad SS, Krismer AM, Albers CE, Hoppe S, Kleer B, et al. Periprosthetic Infection: Major Cause of Early Failure of Primary and Revision Total Knee

Arthroplasty. *J Knee Surg.* 2019;32(10):941–6.

36. Boelch SP, Jakuscheit A, Doerries S, Fraissler L, Hoberg M, Arnholdt J, et al. Periprosthetic infection is the major indication for TKA revision – experiences from a university referral arthroplasty center. *BMC Musculoskelet Disord.* 2018;19(1):395.

37. Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. Economic Burden of Periprosthetic Joint Infection in the United States. *J Arthroplasty.* 2012;27(8, Supplement):61-65.e1.

38. Springer BD, Cahue S, Etkin CD, Lewallen DG, McGrory BJ. Infection burden in total hip and knee arthroplasties: an international registry-based perspective. *Arthroplasty Today.* 2017;3(2):137–40.

39. Boddapati V, Fu MC, Mayman DJ, Su EP, Sculco PK, McLawhorn AS. Revision Total Knee Arthroplasty for Periprosthetic Joint Infection Is Associated With Increased Postoperative Morbidity and Mortality Relative to Noninfectious Revisions. *J Arthroplasty.* 2018;33(2):521–6.

40. Kienzle A, Walter S, von Roth P, Fuchs M, Winkler T, Müller M. High Rates of Aseptic Loosening After Revision Total Knee Arthroplasty for Periprosthetic Joint Infection. *JBJS Open Access [Internet].* 2020;5(3).

41. Chen W, Klemt C, Smith EJ, Tirumala V, Xiong L, Kwon YM. Outcomes and Risk Factors Associated With Failures of Debridement, Antibiotics, and Implant Retention in Patients With Acute Hematogenous Periprosthetic Joint Infection. *JAAOS - J Am Acad Orthop Surg.* 2021;10.5435/JAAOS.

42. Klemt C, Tirumala V, Oganessian R, Xiong L, Kieboom J van den, Kwon YM. Single-Stage Revision of the Infected Total Knee Arthroplasty Is Associated With Improved Functional Outcomes: A Propensity Score–Matched Cohort Study. *J Arthroplasty.* 2021;36(1):298–304.

43. Mozella A de P, da Palma IM, de Souza AF, Gouget GO, de Araújo Barros Cobra HA. Amputation after failure or complication of total knee arthroplasty: prevalence, etiology and functional outcomes. *Rev Bras Ortop.* 2013;48(5):406–11.

44. Cancienne JM, Granadillo VA, Patel KJ, Werner BC, Browne JA. Risk Factors for Repeat Debridement, Spacer Retention, Amputation, Arthrodesis, and Mortality After Removal of an Infected Total Knee Arthroplasty With Spacer Placement. *J Arthroplasty.* 2018;33(2):515–20.

45. Zmistowski B, Karam JA, Durinka JB, Casper DS, Parvizi J. Periprosthetic joint infection increases the risk of one-year mortality. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95(24):2177–84.

46. Choi HR, Bedair H. Mortality following revision total knee arthroplasty: a matched cohort study of septic versus aseptic revisions. *J Arthroplasty*. 2014;29(6):1216–8.
47. Webb JE, Schleck CD, Larson DR, Lewallen DG, Trousdale RT. Mortality of Elderly Patients After Two-Stage Reimplantation for Total Joint Infection: A Case–Control Study. *J Arthroplasty*. 2014;29(11):2206–10.
48. Lum ZC, Natsuhara KM, Shelton TJ, Giordani M, Pereira GC, Meehan JP. Mortality During Total Knee Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*. 2018;33(12):3783–8.
49. Davidson DJ, Spratt D, Liddle AD. Implant materials and prosthetic joint infection: the battle with the biofilm. *EFORT Open Rev*. 2019;4(11):633–9.
50. Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhave A, Mont MA. Periprosthetic joint infection. *The Lancet*. 2016;387(10016):386–94.
51. Del Pozo JL, Patel R. Infection Associated with Prosthetic Joints. *N Engl J Med*. 2009;361(8):787–94.
52. Li C, Renz N, Trampuz A, Ojeda-Thies C. Twenty common errors in the diagnosis and treatment of periprosthetic joint infection. *Int Orthop*. 2020;44(1):3–14.
53. Zimmerli W, Sendi P. Orthopaedic biofilm infections. *APMIS*. 2017;125(4):353–64.
54. Zmistowski B, Fedorka CJ, Sheehan E, Deirmengian G, Austin MS, Parvizi J. Prosthetic joint infection caused by gram-negative organisms. *J Arthroplasty*. 2011;26(6 Suppl):104–8.
55. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med*. 2004;351(16):1645–54.
56. Villa JM, Pannu TS, Theeb I, Buttaro MA, Oñativia JI, Carbo L, et al. International Organism Profile of Periprosthetic Total Hip and Knee Infections. *J Arthroplasty*. 2021;36(1):274–8.
57. Parvizi J, Alijanipour P, Barberi EF, Hickok NJ, Phillips KS, Shapiro IM, et al. Novel Developments in the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Periprosthetic Joint Infections. *JAAOS - J Am Acad Orthop Surg*. 2015;23(suppl):S32.
58. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-Joint Infections [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra040181>. Massachusetts Medical Society; 2009 [citado 29 de agosto de 2021]. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra040181>
59. Tan TL, Kheir MM, Tan DD, Parvizi J. Polymicrobial Periprosthetic Joint Infections:

Outcome of Treatment and Identification of Risk Factors. *J Bone Joint Surg Am.* 2016;98(24):2082–8.

60. Tan TL, Kheir MM, Shohat N, Tan DD, Kheir M, Chen C, et al. Culture-Negative Periprosthetic Joint Infection. *JBJS Open Access* [Internet]. 2018 [citado 3 de novembro de 2020];3(3). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6242327/>

61. Muñoz-Mahamud E, Molinas I, Lozano L, Bosch J, Morata L, Combalia A, et al. Usefulness of Culturing the Periprosthetic Membrane or Neosynovium for the Diagnosis of Infection During Hip and Knee Revision Arthroplasty. *JAAOS - J Am Acad Orthop Surg.* 2018;26(20):e442.

62. Klement MR, Cunningham DJ, Wooster BM, Wellman SS, Bolognesi MP, Green CL, et al. Comparing Standard Versus Extended Culture Duration in Acute Hip and Knee Periprosthetic Joint Infection. *JAAOS - J Am Acad Orthop Surg.* 2019;27(9):e437.

63. Gimza BD, Cassat JE. Mechanisms of Antibiotic Failure During *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis. *Front Immunol.* 2021;12:303.

64. 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.

65. Zoller SD, Hegde V, Burke ZDC, Park HY, Ishmael CR, Blumstein GW, et al. Evading the host response: *Staphylococcus* “hiding” in cortical bone canalicular system causes increased bacterial burden. *Bone Res.* 2020;8(1):43.

66. Del Pozo JL, Patel R. Infection Associated with Prosthetic Joints. *N Engl J Med.* 2009;361(8):787–94.

67. Gries CM, Kielian T. Staphylococcal Biofilms and Immune Polarization During Prosthetic Joint Infection. *J Am Acad Orthop Surg.* 2017;25 Suppl 1:S20–4.

68. Yan CH, Arciola CR, Soriano A, Levin LS, Bauer TW, Parvizi J. Team Approach: The Management of Infection After Total Knee Replacement. *JBJS Rev.* 2018;6(4):e9.

69. Masters EA, Trombetta RP, de Mesy Bentley KL, Boyce BF, Gill AL, Gill SR, et al. Evolving concepts in bone infection: redefining “biofilm”, “acute vs. chronic osteomyelitis”, “the immune proteome” and “local antibiotic therapy”. *Bone Res.* 2019;7(1):20.

70. 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*. 2020;8(9):E358.

71. Kim SG, Kim JG, Jang KM, Han SB, Lim HC, Bae JH. Diagnostic Value of Synovial White Blood Cell Count and Serum C-Reactive Protein for Acute Periprosthetic Joint Infection After Knee Arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2017;32(12):3724–8.

72. Parvizi J, Jacovides C, Antoci V, Ghanem E. Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: The Utility of a Simple Yet Unappreciated Enzyme: *J Bone Jt Surg-Am Vol*. 2011;93(24):2242–8.

73. Zeng YQ, Deng S, Zhu XY, Sun XB, Feng WJ, Zeng JC, et al. Diagnostic Accuracy of the Synovial Fluid α -Defensin Lateral Flow Test in Periprosthetic Joint Infection: A Meta-analysis. *Orthop Surg*. 2021; May;13(3):708-718.

74. Wyatt MC, Beswick AD, Kunutsor SK, Wilson MJ, Whitehouse MR, Blom AW. The Alpha-Defensin Immunoassay and Leukocyte Esterase Colorimetric Strip Test for the Diagnosis of Periprosthetic Infection. *J Bone Joint Surg Am*. 2016;98(12):992–1000.

75. Sokhi UK, Xia Y, Sosa B, Turajane K, Nishtala SN, Pannellini T, et al. Immune Response to Persistent *Staphylococcus Aureus* Periprosthetic Joint Infection in a Mouse Tibial Implant Model. *J Bone Miner Res*. 2022;37(3):577–94.

76. Masters EA, Ricciardi BF, Bentley KL de M, Moriarty TF, Schwarz EM, Muthukrishnan G. Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(7):385–400.

77. Jung J, Zeng H, Horng T. Metabolism as a guiding force for immunity. *Nat Cell Biol*. janeiro de 2019;21(1):85–93.

78. Mirzaei R, Sabokroo N, Ahmadyousefi Y, Motamedi H, Karampoor S. Immunometabolism in biofilm infection: lessons from cancer. *Mol Med*. 2022;28(1):10.

79. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(9):553–65.

80. Ganeshan K, Chawla A. Metabolic Regulation of Immune Responses. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:609–34.

81. Buck MD, Sowell RT, Kaech SM, Pearce EL. Metabolic Instruction of Immunity. *Cell*. 2017;169(4):570–86.

82. Troha K, Ayres JS. Metabolic adaptations to infections at the organismal level. *Trends Immunol*. 2020;41(2):113–25.

83. Fuchs TM, Eisenreich W, Heesemann J, Goebel W. Metabolic adaptation of human pathogenic and related nonpathogenic bacteria to extra- and intracellular habitats. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(2):435–62.
84. Tan CY, Ramirez ZE, Surana NK. A modern world view of host–microbiota–pathogen interactions. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2021;207(7):1710–8.
85. Balato G, Franceschini V, Ascione T, Lamberti A, Balboni F, Baldini A. Diagnostic accuracy of synovial fluid, blood markers, and microbiological testing in chronic knee prosthetic infections. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2018;138(2):165–71.
86. Choe H, Deirmengian CA, Hickok NJ, Morrison TN, Tuan RS. Molecular Diagnostics. *JAAOS - J Am Acad Orthop Surg.* 2015;23(suppl):S26.
87. Fuchs M, Trampuz A, Kirschbaum S, Winkler T, Sass FA. Soluble Pecam-1 as a Biomarker in Periprosthetic Joint Infection. *J Clin Med.* 2021;10(4):612.
88. 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.* 2020;103-B(1):18–25.
89. Nodzo SR, Bauer T, Pottinger PS, Garrigues GE, Bedair H, Deirmengian CA, et al. Conventional Diagnostic Challenges in Periprosthetic Joint Infection. *JAAOS - J Am Acad Orthop Surg.* 2015;23(suppl):S18.
90. Parvizi J, Tan TL, Goswami K, Higuera C, Della Valle C, Chen AF, et al. The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *J Arthroplasty.* 2018;33(5):1309-1314.e2.
91. Parvizi J, Walinchus L, Adeli B. Molecular Diagnostics in Periprosthetic Joint Infection. *Int J Artif Organs.* 2011;34(9):847–55.
92. Villa JM, Pannu TS, Piuze N, Riesgo AM, Higuera CA. Evolution of Diagnostic Definitions for Periprosthetic Joint Infection in Total Hip and Knee Arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2020;35(3):S9–13.
93. Schwarz EM, Parvizi J, Gehrke T, Aiyer A, Battenberg A, Brown SA, et al. 2018 International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection: Research Priorities from the General Assembly Questions. *J Orthop Res.* 2019;37(5):997–1006.
94. Villa JM, Pannu TS, Piuze N, Riesgo AM, Higuera CA. Evolution of Diagnostic Definitions for Periprosthetic Joint Infection in Total Hip and Knee Arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2020;35(3,

Supplement):S9–13.

95. Nodzo SR, Bauer T, Pottinger PS, Garrigues GE, Bedair H, Deirmengian CA, et al. Conventional Diagnostic Challenges in Periprosthetic Joint Infection. *JAAOS - J Am Acad Orthop Surg*. 2015;23(suppl):S18.
96. Ackmann T, Möllenbeck B, Gosheger G, Schwarze J, Schmidt-Braekling T, Schneider KN, et al. Comparing the Diagnostic Value of Serum D-Dimer to CRP and IL-6 in the Diagnosis of Chronic Prosthetic Joint Infection. *J Clin Med [Internet]*. 10 de setembro de 2020 [citado 27 de março de 2021];9(9). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7563505/>
97. Bin G, Xinxin Y, Fan L, Shenghong W, Yayi X. Serum Fibrinogen Test Performs Well for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*. 2020;35(9):2607–12.
98. Chen X, Li H, Zhu S, Wang Y, Qian W. Is D-dimer a reliable biomarker compared to ESR and CRP in the diagnosis of periprosthetic joint infection? *Bone Jt Res*. 2020;9(10):701–8.
99. Zhang Q, Dong J, Zhou D, Liu F. Circulating D-Dimer versus Fibrinogen in the Diagnosis of Peri-Prosthetic Joint Infection: A Meta-Analysis. *Surg Infect*. 2021;22(2):200–10.
100. Xu C, Tan TL, Kuo FC, Goswami K, Wang Q, Parvizi J. Reevaluating Current Cutoffs for Acute Periprosthetic Joint Infection: Current Thresholds Are Insensitive. *J Arthroplasty*. 2019;34(11):2744–8.
101. Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, Cameron A, Schiller K, Parvizi J. Combined Measurement of Synovial Fluid α -Defensin and C-Reactive Protein Levels: Highly Accurate for Diagnosing Periprosthetic Joint Infection. *J Bone Jt Surg*. 2014;96(17):1439–45.
102. Ko LM, Parvizi J. Diagnosis of Periprosthetic Infection: Novel Developments. *Orthop Clin*. 2016;47(1):1–9.
103. 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*. 2014;210(12):779–86.
104. Palan J, Nolan C, Sarantos K, Westerman R, King R, Foguet P. Culture-negative periprosthetic joint infections. *EFORT Open Rev*. 2019;4(10):585–94.
105. Sharma K, Ivy M, Block DR, Abdel MP, Hanssen AD, Beauchamp C, et al. Comparative analysis of 23 synovial fluid biomarkers for hip and knee periprosthetic joint infection detection. *J Orthop Res*. 2020;38(12):2664–74.

106. Kheir MM, Tan TL, Shohat N, Foltz C, Parvizi J. Routine Diagnostic Tests for Periprosthetic Joint Infection Demonstrate a High False-Negative Rate and Are Influenced by the Infecting Organism: *J Bone Jt Surg*. 2018;100(23):2057–65.
107. Uvodich ME, Dugdale EM, Osmon DR, Pagnano MW, Berry DJ, Abdel MP. The effectiveness of laboratory tests to predict early postoperative periprosthetic infection after total knee arthroplasty. *Bone Jt J*. 2021;103-B(6 Supple A):177–84.
108. Pérez-Prieto D, Portillo ME, Puig-Verdié L, Alier A, Martínez S, Sorlí L, et al. C-reactive protein may misdiagnose prosthetic joint infections, particularly chronic and low-grade infections. *Int Orthop*. 2017;41(7):1315–9.
109. Wang Y, Li Y, Qiao L, Sun S. Comparison of a Comprehensive Set of Fibrinolytic Markers With C-Reactive Protein and Erythrocyte Sedimentation Rate for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*. 2020;35(9):2613–8.
110. Ribera T, Monreal L, Armengou L, Ríos J, Prades M. Synovial Fluid D-Dimer Concentration in Foals with Septic Joint Disease. *J Vet Intern Med*. 2011;25(5):1113–7.
111. Lu G, Li T, Ye H, Liu S, Zhang P, Wang W. D-dimer in the diagnosis of periprosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg*. 2020;15(1):265.
112. Fernandez-Sampedro M, Sanlés-González I, García-Ibarbia C, Fañanás-Rodríguez N, Fakkas-Fernández M, Fariñas MC. The poor accuracy of D-dimer for the diagnosis of prosthetic joint infection but its potential usefulness in early postoperative infections following revision arthroplasty for aseptic loosening. *BMC Infect Dis*. 2022;22(1):91.
113. Saleh A, Ramanathan D, Siqueira MBP, Klika AK, Barsoum WK, Rueda CAH. The Diagnostic Utility of Synovial Fluid Markers in Periprosthetic Joint Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAAOS - J Am Acad Orthop Surg*. n 2017;25(11):763–72.
114. Lee YS, Koo KH, Kim HJ, Tian S, Kim TY, Maltenfort MG, et al. Synovial Fluid Biomarkers for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Bone Jt Surg*. 2017;99(24):2077–84.
115. Xu C, Tan TL, Kuo FC, Goswami K, Wang Q, Parvizi J. Reevaluating Current Cutoffs for Acute Periprosthetic Joint Infection: Current Thresholds Are Insensitive. *J Arthroplasty*. 2019;34(11):2744–8.
116. Izakovicova P, Borens O, Trampuz A. Periprosthetic joint infection: current concepts and

outlook. EFORT Open Rev. 2019;4(7):482–94.

117. Shohat N, Bauer T, Buttaro M, Budhiparama N, Cashman J, Valle CJD, 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*. 2019;34(2):S325–7.

118. Stone WZ, Gray CF, Parvataneni HK, Al-Rashid M, Vlasak RG, Horodyski M, et al. Clinical Evaluation of Synovial Alpha Defensin and Synovial C-Reactive Protein in the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: *J Bone Jt Surg*. 2018;100(14):1184–90.

119. Chen Y, Kang X, Tao J, Zhang Y, Ying C, Lin W. Reliability of synovial fluid alpha-defensin and leukocyte esterase in diagnosing periprosthetic joint infection (PJI): a systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg*. 2019;14(1):453.

120. Deirmengian C, Madigan J, Kallur Mallikarjuna S, Conway J, Higuera C, Patel R. Validation of the Alpha Defensin Lateral Flow Test for Periprosthetic Joint Infection. *J Bone Joint Surg Am*. 2020; an 20;103(2):115-122.

121. Han X, Xie K, Jiang X, Wang L, Wu H, Qu X, et al. Synovial fluid α -defensin in the diagnosis of periprosthetic joint infection: the lateral flow test is an effective intraoperative detection method. *J Orthop Surg*. 2019;14(1):274.

122. Kuiper JW, Pander P, Vos SJ. Good accuracy of the alpha-defensin lateral flow test for hip periprosthetic joint infection: A pilot study in a retrospective cohort of 52 patients. *World J Orthop*. 2020;11(1):36–46.

123. Tian B, Cui L, Jiang W. The diagnostic effect of α -defensin, D-dimer, and IL-6 in periprosthetic joint infection: A systematic review and diagnostic meta-analysis. *J Orthop Surg Hong Kong*. 2020;28(3):2309499020971861.

124. Miyamae Y, George J, Klika AK, Barsoum WK, Higuera CA. Diagnostic Accuracy of the Alpha-Defensin Test for Periprosthetic Joint Infection in Patients With Inflammatory Diseases. *J Arthroplasty*. 2019;34(8):1767–71.

125. Sukhonthamarn K, Tan TL, Xu C, Kuo FC, Lee MS, Citak M, et al. Determining Diagnostic Thresholds for Acute Postoperative Periprosthetic Joint Infection. *JBJS*. 2020;102(23):2043–8.

126. Amanatullah DF, Cheng RZ, III JIH, Maloney WJ, Finlay AK, Kappagoda S, et al. The routine use of synovial alpha-defensin is not necessary. *Bone Jt J* [2020 May;102-B(5):593-

599.

127. Huard M, Detrembleur C, Poilvache H, Pastor Y Geels I, Van Cauter M, Driesen R, et al. Alpha Defensin: A Diagnostic Accuracy Depending on the Infection Definition Used. *J Arthroplasty*. 2020;35(5):1355–60.

128. Kleeman-Forsthuber LT, Dennis DA, Brady AC, Pollet AK, Johnson RM, Jennings JM. Alpha-Defensin Is Not Superior to Traditional Diagnostic Methods for Detection of Periprosthetic Joint Infection in Total Hip Arthroplasty and Total Knee Arthroplasty Patients. *J Arthroplasty*. 2021;Jun;36(6):2144-2149.

129. Kleeman-Forsthuber LT, Johnson RM, Brady AC, Pollet AK, Dennis DA, Jennings JM. Alpha-Defensin Offers Limited Utility in Routine Workup of Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*. 2020; May;36(5):1746-1752

130. Shahi A, Alvand A, Ghanem E, Restrepo C, Parvizi J. The Leukocyte Esterase Test for Periprosthetic Joint Infection Is Not Affected by Prior Antibiotic Administration. *J Bone Joint Surg Am*. 2019;101(8):739–44.

131. Li Z, Zhang Q, Shi L, Gao F, Sun W, Li Z. Alpha-Defensin versus Leukocyte Esterase in Periprosthetic Joint Infection: An Updated Meta-Analysis. *BioMed Res Int*. 2020;2020:3704285.

132. Tarabichi M, Shohat N, Goswami K, Alvand A, Silibovsky R, Belden K, et al. Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: The Potential of Next-Generation Sequencing. *J Bone Joint Surg Am*. 2018;100(2):147–54.

133. Osmon DR. Microbiology and Antimicrobial Challenges of Prosthetic Joint Infection. *JAAOS - J Am Acad Orthop Surg*. 2017;25:S17.

134. Indelli PF, Ghirardelli S, Violante B, Amanatullah DF. Next generation sequencing for pathogen detection in periprosthetic joint infections. *EFORT Open Rev*. 2021;6(4):236–44.

135. Dietz MJ, Springer BD, Barnes PD, Falciglia M, Falciglia MM, Friedrich AD, et al. Best practices for centers of excellence in addressing periprosthetic joint infection. *J Am Acad Orthop Surg*. 2015;23 Suppl:S12-17.

136. Imagama T, Nakashima D, Seki K, Seki T, Matsuki Y, Yamazaki K, et al. Comparison of bacterial culture results of preoperative synovial fluid and intraoperative specimens in patients with joint infection. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother*. 2021;27(4):562–7.

137. Jacovides CL, Kreft R, Adeli B, Hozack B, Ehrlich GD, Parvizi J. Successful Identification

of Pathogens by Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Electron Spray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (ESI-TOF-MS) in Culture-Negative Periprosthetic Joint Infection: *J Bone Jt Surg-Am* Vol. 2012;94(24):2247–54.

138. Sousa R, Carvalho A, Santos AC, Abreu MA. Optimal microbiological sampling for the diagnosis of osteoarticular infection. *EFORT Open Rev*. 2021;6(6):390–8.

139. Schulz P, Dlaska CE, Perka C, Trampuz A, Renz N. Preoperative synovial fluid culture poorly predicts the pathogen causing periprosthetic joint infection. *Infection*. 2021;49(3):427–36.

140. Morawietz L, Classen RA, Schröder JH, Dinybil C, Perka C, Skwara A, et al. Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol*. 2006;59(6):591–7.

141. Tsaras G, Maduka-Ezeh A, Inwards CY, Mabry T, Erwin PJ, Murad MH, et al. Utility of intraoperative frozen section histopathology in the diagnosis of periprosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am*. 2012;94(18):1700–11.

142. Sigmund IK, Holinka J, Lang S, Stenicka S, Staats K, Hobusch G, et al. A comparative study of intraoperative frozen section and alpha defensin lateral flow test in the diagnosis of periprosthetic joint infection. *Acta Orthop*. 2019;90(2):105–10.

143. Xiong L, Li S, Dai M. Comparison of D-dimer with CRP and ESR for diagnosis of periprosthetic joint infection. *J Orthop Surg*. 2019;14(1):240.

144. Vicenti G, Bizzoca D, Nappi V, Pesce V, Solarino G, Carrozzo M, et al. Serum biomarkers in the diagnosis of periprosthetic joint infection: consolidated evidence and recent developments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(2 Suppl):43–50.

145. Guo L, Rondina MT. The Era of Thromboinflammation: Platelets Are Dynamic Sensors and Effector Cells During Infectious Diseases. *Front Immunol*. 2019 Sep 13;10:2204.

146. Carender CN, DeMik DE, Otero JE, Noiseux NO, Brown TS, Bedard NA. What is the Clinical Utility of Synovial Alpha Defensin Testing of Antibiotic Spacers Before Reimplantation? *J Arthroplasty*. 2021; Jun;36(6):2150-2157.

147. Karbysheva S, Yermak K, Grigoricheva L, Renz N, Perka C, Trampuz A. Synovial Fluid d-Lactate-A Novel Pathogen-Specific Biomarker for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*. 2020;35(8):2223-2229.e2.

148. Yu BZ, Li R, Fu J, Chai W, Hao LB, Chen JY. Leukocyte esterase test and alpha-defensin

- test have similar accuracy for the diagnosis of periprosthetic joint infection. *Int Orthop*. 2021;
149. Xu H, Xie JW, Yang JL, Huang ZY, Pei FX. Role of D-dimer and Fibrinogen in the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Orthop Surg*. 2021; May;13(3):692-700.
150. Paziuk T, Rondon AJ, Goswami K, Tan TL, Parvizi J. A Novel Adjunct Indicator of Periprosthetic Joint Infection: Platelet Count and Mean Platelet Volume. *J Arthroplasty*. 2020;35(3):836–9.
151. Esteban J, Gómez-Barrena E. An update about molecular biology techniques to detect orthopaedic implant-related infections. *EFORT Open Rev*. 2021;6(2):93–100.
152. Tounta V, Liu Y, Cheyne A, Larrouy-Maumus G. Metabolomics in infectious diseases and drug discovery. *Mol Omics*. 2021;17(3):376–93.
153. Damiani C, Gaglio D, Sacco E, Alberghina L, Vanoni M. Systems metabolomics: from metabolomic snapshots to design principles. *Curr Opin Biotechnol*. 2020;63:190–9.
154. Canuto GAB, Costa JL da, Cruz PLR da, Souza ARL de, Faccio AT, Klassen A, et al. Metabolomics: definitions, state-of-the-art and representative applications. *Quím Nova*. 2018;41(1):75–91.
155. Klassen A, Faccio AT, Canuto GAB, da Cruz PLR, Ribeiro HC, Tavares MFM, et al. Metabolomics: Definitions and Significance in Systems Biology. *Adv Exp Med Biol*. 2017;965:3-17.
156. Baker M. Metabolomics: from small molecules to big ideas. *Nat Methods*. fevereiro de 2011;8(2):117–21.
157. Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics*. 2001;2(3):155–68.
158. Yanes O, Tautenhahn R, Patti GJ, Siuzdak G. Expanding Coverage of the Metabolome for Global Metabolite Profiling *Anal Chem*. 2011 Mar 15;83(6):2152-61.
159. Pacchiarotta T, Deelder AM, Mayboroda OA. Metabolomic investigations of human infections *Bioanalysis*. 2012 May;4(8):919-25.
160. Gowda GAN, Zhang S, Gu H, Asiago V, Shanaiah N, Raftery D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008;8(5):617–33.
161. Clarke EJ, Anderson JR, Peffers MJ. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of

biofluids for osteoarthritis. *Br Med Bull.* 2021;137(1):28–41.

162. Showiheen SAA, Sun AR, Wu X, Crawford R, Xiao Y, Wellard RM, et al. Application of Metabolomics to Osteoarthritis: from Basic Science to the Clinical Approach. *Curr Rheumatol Rep.* 2019;21(6):26.

163. Akhbari P, Jaggard MK, Boulangé CL, Vaghela U, Graça G, Bhattacharya R, et al. Differences between infected and noninfected synovial fluid. *Bone Jt Res.* 2021;10(1):85–95.

164. Carlson AK, Rawle RA, Adams E, Greenwood MC, Bothner B, June RK. Application of Global Metabolomic Profiling of Synovial Fluid for Osteoarthritis Biomarkers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;499(2):182–8.

165. Chetwynd AJ, Dunn WB, Rodriguez-Blanco G. Collection and Preparation of Clinical Samples for Metabolomics. *Adv Exp Med Biol.* 2017;965:19-44.

166. Fernández-García M, Rojo D, Rey-Stolle F, García A, Barbas C. Metabolomic-Based Methods in Diagnosis and Monitoring Infection Progression. *Exp Suppl 2012.* 2018;109:283–315.

167. Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, Eghbalnia HR, Powers R, Raftery D, et al. The future of NMR-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol.* 2017;43:34–40.

168. Anderson JR, Phelan MM, Rubio-Martinez LM, Fitzgerald MM, Jones SW, Clegg PD, et al. Optimization of Synovial Fluid Collection and Processing for NMR Metabolomics and LC-MS/MS Proteomics. *J Proteome Res.* 2020;19(7):2585–97.

169. Akhbari P, Jaggard MK, Boulangé CL, Vaghela U, Graça G, Bhattacharya R, et al. Differences in the composition of hip and knee synovial fluid in osteoarthritis: a nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy study of metabolic profiles. *Osteoarthritis Cartilage.* 2019;27(12):1768–77.

170. L. Palama T, Canard I, P. Rautureau GJ, Mirande C, Chatellier S, Elena-Herrmann B. Identification of bacterial species by untargeted NMR spectroscopy of the exo -metabolome. *Analyst.* 2016;141(15):4558–61.

171. San-Martin BSD, Ferreira VG, Bitencourt MR, Pereira PCG, Carrilho E, Assunção NA de, et al. Metabolomics as a potential tool for the diagnosis of growth hormone deficiency (GHD): a review. *Arch Endocrinol Metab.* 2020;64:654–63.

172. Rattigan KM, Pountain AW, Regnault C, Achcar F, Vincent IM, Goodyear CS, et al. Metabolomic profiling of macrophages determines the discrete metabolomic signature and

metabolomic interactome triggered by polarising immune stimuli. PLOS ONE. 2018;13(3):e0194126.

173. To KKW, Lee K chung, Wong SSY, Lo K ching, Lui Y ming, Jahan AS, et al. Lipid mediators of inflammation as novel plasma biomarkers to identify patients with bacteremia. J Infect. 2015;70(5):433–44.

174. Neugebauer S, Giamarellos-bourboulis EJ, Pelekanou A, Marioli A, Baziaka F, Tsangaris I, et al. Prognostic Tools Based on the Type of Infection. Crit Care Med. 2016;1–14.

175. Mickiewicz B, Duggan GE, Winston BW, Doig C, Kubes P, Vogel HJ. Metabolic profiling of serum samples by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy as a potential diagnostic approach for septic shock. Crit Care Med. 2014;42(5):1140–9.

176. Anderson JR, Smagul A, Simpson D, Clegg PD, Rubio-Martinez LM, Peffers MJ. The synovial fluid proteome differentiates between septic and nonseptic articular pathologies. J Proteomics. 2019;202:103370.

177. Anderson JR, Phelan MM, Clegg PD, Peffers MJ, Rubio-Martinez LM. Synovial Fluid Metabolites Differentiate between Septic and Nonseptic Joint Pathologies. J Proteome Res. 2018;17(8):2735–43.

178. Ewald FC, Society K. The Knee Society Total Knee Arthroplasty Roentgenographic Evaluation and Scoring System. Clin Orthop Relat Res. 1989;248:9–12.

179. Aggarwal VK, Tischler E, Ghanem E, Parvizi J. Leukocyte esterase from synovial fluid aspirate: a technical note. J Arthroplasty. 2013;28(1):193–5.

180. Tsukayama DT, Goldberg VM, Kyle R. Diagnosis and Management of Infection After Total Knee Arthroplasty. JBJS. 2003;85(suppl_1):S75.

181. Park JH, Shim D, Kim KES, Lee W, Shin SJ. Understanding Metabolic Regulation Between Host and Pathogens: New Opportunities for the Development of Improved Therapeutic Strategies Against Mycobacterium tuberculosis Infection. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Mar 16;11:635335.

182. Hosomi K, Kunisawa J. Diversity of energy metabolism in immune responses regulated by micro-organisms and dietary nutrition. Int Immunol. 2020;32(7):447–54.

183. Kolbeck L, Haertlé M, Graulich T, Ettinger M, Suero EM, Krettek C, et al. Leukocyte Esterase and Glucose Reagent Test Can Rule in and Rule out Septic Arthritis. In Vivo.

2021;35(3):1625–32.

184. Omar M, Reichling M, Liidakis E, Ettinger M, Guenther D, Decker S, et al. Rapid exclusion of bacterial arthritis using a glucometer. *Clin Rheumatol*. 2017;36(3):591–8.
185. Karbysheva S, Yermak K, Grigoricheva L, Renz N, Perka C, Trampuz A. Synovial Fluid d-Lactate—A Novel Pathogen-Specific Biomarker for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*. 2020;35(8):2223-2229.e2.
186. Marcos MA, Vila J, Gratacos J, Brancos MA, Jimenez de Anta MT. Determination of D-lactate concentration for rapid diagnosis of bacterial infections of body fluids. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1991;10(11):966–9.
187. Leonard A, Möhlis K, Schlüter R, Taylor E, Lalk M, Methling K. Exploring metabolic adaptation of *Streptococcus pneumoniae* to antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)*. 2020;73(7):441–54.
188. Lee J, Park H, Bae J, Hyun H, Kim S. Current Diagnostic Methods for Periprosthetic Joint Infection. *Biomed Sci Lett*. 2022;28(1):1–8.
189. Silvestre-Roig C, Fridlender ZG, Glogauer M, Scapini P. Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends Immunol*. 2019;40(7):565–83.
190. Nguyen GT, Green ER, Meccas J. Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* 2017 Aug 25;7:373.
191. Maratou E, Dimitriadis G, Kollias A, Boutati E, Lambadiari V, Mitrou P, et al. Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. *Eur J Clin Invest*. 2007;37(4):282–90.
192. Wheaton WW, Chandel NS. Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2011;300(3):C385–93.
193. Stevens CR, Williams RB, Farrell AJ, Blake DR. Hypoxia and inflammatory synovitis: observations and speculation. *Ann Rheum Dis*. 1991;50(2):124–32.
194. Richman AI, Su EY, Ho G. Reciprocal relationship of synovial fluid volume and oxygen tension. *Arthritis Rheum*. 1981;24(5):701–5.
195. Bodamyali T, Stevens C, Billingham M, Ohta S, Blake D. Influence of hypoxia in inflammatory synovitis. *Ann Rheum Dis*. 1998;57(12):703–10.
196. Pucino V, Certo M, Varricchi G, Marone G, Ursini F, Rossi FW, et al. Metabolic Checkpoints in Rheumatoid Arthritis. *Front Physiol*. 2020;11:347.

197. Hayek I, Schatz V, Bogdan C, Jantsch J, Lührmann A. Mechanisms controlling bacterial infection in myeloid cells under hypoxic conditions. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(5):1887–907.
198. Ciofu O, Rojo-Molinero E, Macià MD, Oliver A. Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS.* 2017;125(4):304–19.
199. Kolpen M, Hansen CR, Bjarnsholt T, Moser C, Christensen LD, Gennip M van, et al. Polymorphonuclear leucocytes consume oxygen in sputum from chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Thorax.* 2010;65(1):57–62.
200. Santos GC, Saldanha-Gama R, de Brito NM, Renovato-Martins M, Barja-Fidalgo C. Metabolomics in cancer and cancer-associated inflammatory cells. *J Cancer Metastasis Treat.* 2021;7:1.
201. Liu X, Cooper DE, Cluntun AA, Warmoes MO, Zhao S, Reid MA, et al. Acetate Production from Glucose and Coupling to Mitochondrial Metabolism in Mammals. *Cell.* 2018;175(2):502-513.e13.
202. Bose S, Ramesh V, Locasale JW. Acetate Metabolism in Physiology, Cancer, and Beyond. *Trends Cell Biol.* 2019;29(9):695–703.
203. Filep JG, Ariel A. Neutrophil heterogeneity and fate in inflamed tissues: implications for the resolution of inflammation. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2020;319(3):C510–32.
204. Deniset JF, Kubes P. Neutrophil heterogeneity: Bona fide subsets or polarization states? *J Leukoc Biol.* 2018;103(5):829–38.
205. Rogers T, DeBerardinis RJ. Metabolic Plasticity of Neutrophils: Relevance to Pathogen Responses and Cancer. *Trends Cancer.* 2021;7(8):700–13.
206. Rice CM, Davies LC, Subleski JJ, Maio N, Gonzalez-Cotto M, Andrews C, et al. Tumour-elicited neutrophils engage mitochondrial metabolism to circumvent nutrient limitations and maintain immune suppression. *Nat Commun.* 2018;9(1):5099.
207. Heim CE, Vidlak D, Odvody J, Hartman CW, Garvin KL, Kielian T. Human prosthetic joint infections are associated with myeloid-derived suppressor cells (MDSCs): Implications for infection persistence. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 2018;36(6):1605–13.
208. Zhou J, Nefedova Y, Lei A, Gabrilovich D. Neutrophils and PMN-MDSCs: their biological role and interaction with stromal cells. *Semin Immunol.* 2018;35:19–28.
209. Friedman DB, Stauff DL, Pishchany G, Whitwell CW, Torres VJ, Skaar EP.

Staphylococcus aureus Redirects Central Metabolism to Increase Iron Availability. *PLOS Pathog.* 2006;2(8):e87.

210. Vitko NP, Spahich NA, Richardson AR. Glycolytic Dependency of High-Level Nitric Oxide Resistance and Virulence in *Staphylococcus aureus*. *mBio.* 2015;6(2):e00045-15.

211. Szenk M, Dill KA, de Graff AMR. Why Do Fast-Growing Bacteria Enter Overflow Metabolism? Testing the Membrane Real Estate Hypothesis. *Cell Syst.* 2017;5(2):95–104.

212. Millard P, Enjalbert B, Uttenweiler-Joseph S, Portais JC, Létisse F. Control and regulation of acetate overflow in *Escherichia coli*. Doebeli M, Barkai N, organizadores. *eLife.* 2021;10:e63661.

213. Stokes JM, Lopatkin AJ, Lobritz MA, Collins JJ. Bacterial Metabolism and Antibiotic Efficacy. *Cell Metab.* 2019;30(2):251–9.

214. Cabral DJ, Penumutthu S, Reinhart EM, Zhang C, Korry BJ, Wurster JI, et al. Microbial Metabolism Modulates Antibiotic Susceptibility within the Murine Gut Microbiome. *Cell Metab.* 2019;30(4):800-823.e7.

215. Peel TN, de Steiger R. How to manage treatment failure in prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(11):1473–80.

216. Qi S ang, Wu Q, Chen Z, Zhang W, Zhou Y, Mao K, et al. High-resolution metabolomic biomarkers for lung cancer diagnosis and prognosis. *Sci Rep.* 2021;11(1):11805.

217. Lee J, Banerjee D. Metabolomics and the Microbiome as Biomarkers in Sepsis. *Crit Care Clin.* 2020;36(1):105–13.

218. Araújo R, Bento LFN, Fonseca TAH, Von Rekowski CP, da Cunha BR, Calado CRC. Infection Biomarkers Based on Metabolomics. *Metabolites.* 2022;12(2):92.

219. McCreath G, Whitfield PD, Roe AJ, Watson MJ, Sim MAB. A Metabolomics approach for the diagnosis Of SecondAry InfeCtions in COVID-19 (MOSAIC): a study protocol. *BMC Infect Dis.* 2021;21(1):1204.

220. Slupsky CM, Rankin KN, Fu H, Chang D, Rowe BH, Charles PGP, et al. Pneumococcal pneumonia: potential for diagnosis through a urinary metabolic profile. *J Proteome Res.* 2009;8(12):5550–8.

221. Adamko DJ, Saude E, Bear M, Regush S, Robinson JL. Urine metabolomic profiling of children with respiratory tract infections in the emergency department: a pilot study. *BMC Infect*

Dis. 2016;16(1):439.

222. Banoei MM, Vogel HJ, Weljie AM, Yende S, Angus DC, Winston BW. Plasma lipid profiling for the prognosis of 90-day mortality, in-hospital mortality, ICU admission, and severity in bacterial community-acquired pneumonia (CAP). *Crit Care*. 2020;24:461.

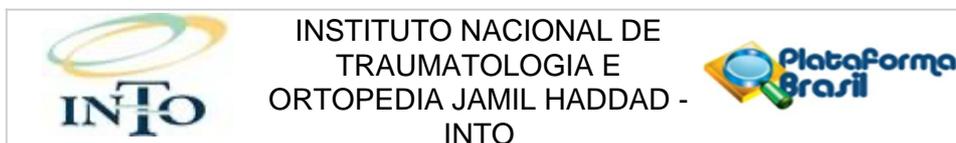
223. Araújo R, Bento LFN, Fonseca TAH, Von Rekowski CP, da Cunha BR, Calado CRC. Infection Biomarkers Based on Metabolomics. *Metabolites*. 2022;12(2):92.

224. Gupta A, Dwivedi M, Mahdi AA, Khetrapal CL, Bhandari M. Broad Identification of Bacterial Type in Urinary Tract Infection Using ¹H NMR Spectroscopy. *J Proteome Res*. 2012;11(3):1844–54.

225. Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Hughes A, Morrisson J, Lindberg H, et al. Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a ¹H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *J Pharm Biomed Anal*. 2004;36(4):841–9.

226. Tai DBG, Patel R, Abdel MP, Berbari EF, Tande AJ. Microbiology of hip and knee periprosthetic joint infections: a database study. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2022;28(2):255–9.

ANEXO A. LICENÇA DA COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP/INTO)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com infecção periprotética pós artroplastia de joelho

Pesquisador: Ana Carolina Leal de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 20309419.0.0000.5273

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.687.595

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa vinculado ao CAE Joelho, visando avaliar o perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com infecção periprotética. Atualmente, observa-se, em todo o mundo, significativo aumento do número de Artroplastia total do Joelho (ATJ). Apesar de todos os avanços técnicos e melhora dos resultados clínicos com as modernas ATJ, a incidência de complicações não pode ser desprezada e, em algumas séries, comprometem até 22% dos pacientes. A incidência de infecção profunda periprotética (IPP) do joelho varia entre 1,1% a 12,4%, representando, a principal causa de falha dos implantes com necessidade de revisão nos primeiros 5 anos após a cirurgia primária. A IPP é uma complicação cirúrgica complexa e devastadora por diversos aspectos, sobretudo, pela dificuldade de diagnóstico. A identificação de biomarcadores de infecção precoce, permitiriam o diagnóstico e intervenções ainda nas etapas iniciais da doença com a identificação da espécie infectante e sua sensibilidade a antibiótico, entre outros. Neste cenário, os testes de diagnóstico molecular, como a metabólômica, isto é, análise qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes no líquido sinovial apresentam-se como alternativas promissoras. No campo da ortopedia, ainda são escassos os estudos de metabólômica associados as infecções periprotéticas. Será realizado um estudo prospectivo em que serão incluídos os pacientes submetidos à cirurgia

Endereço: Avenida Brasil, n° 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



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -
INTO



Continuação do Parecer: 3.687.595

de revisão da artroplastia de joelho, atendidos no Centro de atenção especializada do joelho do INTO. Os pacientes serão avaliados quanto a presença dos sinais indicativos de infecção periprotética preconizado pela sociedade internacional de infecção musculoesquelética. Uma amostra de líquido sinovial será coletada e utilizada para as análises de metabolômica, para determinação do perfil metabólico associado a infecção e associado aos diferentes patógenos infectantes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar o perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com falha séptica da artroplastia total primária de joelho submetidos a cirurgia de revisão da artroplastia

Objetivo Secundário:

- Descrever as características clínicas dos pacientes submetidos à cirurgia de revisão, com vistas a preencher os critérios diagnósticos preconizados pela Sociedade de Infecção Musculoesquelética.
- Identificar os principais microrganismos causadores da infecção periprotética pós artroplastia de joelho.
- Determinar o perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com falha da artroplastia de joelho que serão submetidos a cirurgia de revisão.
- Avaliar o perfil metabólico dos pacientes com e sem infecção periprotética, buscando determinar uma assinatura metabólica associado à infecção.
- Analisar o perfil metabólico de pacientes com infecção periprotética categorizados em relação ao microrganismo infectante, buscando determinar a assinatura metabólica associada aos diferentes agentes etiológicos causadoras de infecção periprotética.
- Avaliar o valor diagnóstico da análise do perfil metabólico do líquido sinovial no diagnóstico da infecção periprotética
- Avaliar o valor diagnóstico da análise do perfil metabólico do líquido sinovial na identificação agente etiológico e sensibilidade a antibióticos dos microrganismos causadores da infecção periprotética.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Endereço: Avenida Brasil, n° 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



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -
INTO



Continuação do Parecer: 3.687.595

Não há riscos associados à participação no estudo segundo os pesquisadores, porém sabemos que não há pesquisa isenta de riscos. Entretanto, como o estudo se baseará em material já utilizado para exames complementares na rotina do CAE, não haverá riscos adicionais com o procedimento.

Benefícios:

Auxiliar na compreensão das alterações metabólicas induzidas pela infecção periprotética, com o objetivo de identificar novos marcadores úteis no diagnóstico desta doença. Não haverá benefícios diretos para os participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante e inovadora. Apresenta potencial para auxílio no diagnóstico de doença de grande morbidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados e estão adequados.

Recomendações:

Os autores responderam às recomendações do parecer anterior informando que: "Para realização dos ensaios de metabólômica, será utilizada a facility de ressonância magnética nuclear do Laboratório Nacional de Biociências (LNC), com sede em Campinas/São Paulo. O LNC é vinculado ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação. O laboratório aceita a submissão de projetos ao longo do ano, em fluxo contínuo, oferecendo oportunidade a usuários externos para que executem seus projetos usando seus equipamentos e expertise. Dessa forma, após aprovação pelo CEP, o projeto será apresentado ao LNC, para que seja autorizado o uso do laboratório de ressonância para nossas análises, assim como para agendamento do período de análise. Além disso, há um time de especialistas que auxiliam desde a coleta e preparo do material até a análise dos resultados. Uma vez que o projeto seja aprovado, não há custos inerentes à análise. Os custos serão relacionados ao processamento da amostra. "

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada a acrescentar.

Considerações Finais a critério do CEP:

Senhor pesquisador, de acordo com o constante da Resolução CNS nº 466 de 2012, faz-se necessário apresentar ao CEP/INTO, através da Plataforma Brasil, a cada 06 (seis) meses o relatório de acompanhamento de sua pesquisa. Além disso, após a conclusão da pesquisa, deverá ser submetido na Plataforma Brasil, através da Notificação, o Relatório Final e a pesquisa concluída para apreciação do CEP/INTO.

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



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -
INTO



Continuação do Parecer: 3.687.595

Informamos que qualquer alteração realizada no protocolo de pesquisa aprovado deverá ser submetida à apreciação do CEP/INTO através do envio de uma emenda utilizando a Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1417541.pdf	21/10/2019 12:33:14		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	resposta_cep.docx	21/10/2019 12:33:02	Ana Carolina Leal de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_metabolomica.docx	05/09/2019 13:55:19	Ana Carolina Leal de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	05/09/2019 13:54:20	Ana Carolina Leal de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMOS_PESQUISADOR.pdf	20/08/2019 10:52:15	Ana Carolina Leal de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_metabolomica.docx	20/08/2019 10:32:45	Ana Carolina Leal de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 06 de Novembro de 2019

Assinado por:
Marisa Peter Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Brasil, n° 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 E 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 "Estudo do perfil metabólico do líquido sinovial de pacientes com 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 estudar a composição metabólica do líquido que banha a articulação do seu joelho, para encontrarmos novos marcadores para o diagnóstico de 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 seja coletada uma amostra do líquido que banha a sua articulação.

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. 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: Alan de Paula Mozella

Contato com o pesquisador responsável:

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

Telefone: 21345000

**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

APÊNDICE A – PRODUTOS BIBLIOGRÁFICOS



Synovial Fluid NMR-based Metabolomics in Septic and Aseptic Revision of Total Knee Arthroplasty: Implications on Diagnosis and Treatment

Journal:	<i>Journal of Orthopaedic Research</i>
Manuscript ID	JOR-22-0583
Wiley - Manuscript type:	Research Article (Non-Member)
Date Submitted by the Author:	26-Oct-2022
Complete List of Authors:	Mozella, Alan; Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Knee Surgery Cobra, Hugo; Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Center for Surgery of Knee Palma, Idemar; Rede D'Or Guimarães, João; Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Teaching and Research Division Salim, Rodrigo; Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Department of Orthopaedics and Anaesthesiology Costa, Gilson; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Department of Genetics Leal, Ana; Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Teaching and Research Division
Keywords:	Arthroplasty - Knee, Biomarkers, Infection
Areas of Expertise:	metabolomics, periprosthetic joint infection, knee arthroplasty

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 **TITLE PAGE**

2

3 **Title:** Synovial Fluid NMR-based Metabolomics in Septic and Aseptic Revision of
4 Total Knee Arthroplasty: Implications on Diagnosis and Treatment

5 **Authors**6 Alan de Paula Mozella ^a7 Hugo Alexandre de Araujo Barros Cobra ^a8 Idemar Monteiro da Palma ^{b,c}9 Rodrigo Salim ^d10 João Antonio Matheus Guimarães ^e11 Gilson Costa ^f12 Ana Carolina Leal ^e

13 ^a Center for Surgery of Knee, National Institute of Traumatology and Orthopaedics, Rio
14 de Janeiro, Brazil.

15 ^b Rios D'or Hospital, Rio de Janeiro, Brazil.16 ^c Montese Medical Center, Rio de Janeiro, Brazil.

17 ^d Department of Orthopaedics and Anaesthesiology, Ribeirão Preto Medical School,
18 University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

19 ^e Teaching and Research Division, National Institute of Traumatology and
20 Orthopaedics, Rio de Janeiro, Brazil.

21 ^f Department of Genetics, IBRAG, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,
22 Brazil.

- 23 Alan Mozella - apmozella@terra.com.br / ORCID: 0000-0001-5855-5808
- 24 Hugo Cobra - cobra.hugo@gmail.com / ORCID: 0000-0002-7315-0961
- 25 Idemar Palma – idmonpa@gmail.com / ORCID: 0000-0003-4193-2376
- 26 João Antonio Matheus Guimarães - jmatheusguimaraes@gmail.com / ORCID:
- 27 Rodrigo Salim - rodsalim@gmail.com / ORCID: 0000-0003-3978-4888
- 28 Gilson Costa - gcostadossantos.uerj@gmail.com / ORCID: 0000-0002-2038-2267
- 29 Ana Carolina Leal – leal.carol@gmail.com / ORCID: 0000-0002-2556-3446
- 30 **Corresponding authors**
- 31 Alan de Paula Mozella
- 32 Rua Jerônimo de Lemos, 70/1103 – Vila Isabel, Rio de Janeiro, Brasil. CEP:20560-090
- 33 apmozella@terra.com.br
- 34 Gilson Costa
- 35 Avenida Marechal Rondon, 381 Policlínica Piquet Carneiro/ Pavilhão José Roberto
- 36 Feresin Moraes -São Francisco, Rio de Janeiro, Brasil.
- 37 CEP: 20950-003
- 38 gcostadossantos.uerj@gmail.com
- 39 **Running Title:** PJI synovial fluid metabolic profile
- 40 **Authors Contribution**
- 41 Alan Mozella – Design, Data acquisition, Analysis and interpretation of data.

- 42 Hugo Cobra - Design, Analysis and interpretation of data.
- 43 Idemar Palma – Analysis and interpretation of data.
- 44 João Antonio Matheus Guimarães - Analysis and interpretation of data.
- 45 Rodrigo Salim - Analysis and interpretation of data.
- 46 Gilson Costa - Data acquisition, Analysis and interpretation of data.
- 47 Ana Carolina Leal – Design, Data acquisition, Analysis and interpretation of data.
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

61 Abstract

62 Periprosthetic joint infection (PJI) is one of the most challenging complications
63 following total knee arthroplasty. Despite its importance, there is a paucity of reports in
64 the literature regarding its pathogenesis. Recently, cellular metabolic reprogramming
65 has been shown to play an important role in the progression and outcome of infectious
66 diseases. Therefore, the aim of this study was to evaluate the metabolites composition of
67 the synovial fluid from patients with PJI or aseptic failure of total knee arthroplasties.
68 The synovial fluids from 21 patients scheduled for revision total knee arthroplasty (11
69 with the diagnosis of PJI and 10 with aseptic failures) were analyzed using 1D ¹H NMR
70 spectroscopy. Univariate and multivariate statistical analyses were used to identify
71 metabolites that were differentially abundant between those groups. A total of 28
72 metabolites were identified and five of them found to be differentially abundant
73 between infected and non-infected synovial fluids. Lactate, acetate and 3-
74 hydroxybutyrate were found to be in a higher concentration, and glucose and creatine
75 were found reduced in the synovial fluid from PJI patients. Synovial fluid from patients
76 with PJI exhibit a distinct metabolic profile, possibly reflecting metabolic adaptation
77 that occurs in the infected periprosthetic microenvironment. Further research and
78 studies are warranted to gain a broader insight into the metabolic pathways engaged by
79 both pathogen and immune cells in the context of a PJI.

80 **Keywords:** metabolomics; periprosthetic joint infection; synovial fluid; total knee
81 arthroplasty.

82

83 Introduction

84 Periprosthetic joint infection (PJI) is a challenging complication after total knee
85 arthroplasty. Although its incidence remains stable, the high demand for knee
86 arthroplasty leads to an increase in the absolute number of PJIs [1]. Nowadays, PJI is
87 referred to as the leading cause of knee arthroplasty revision surgery, and is associated
88 with morbidity and mortality, resulting in a significant degree of physical impairment
89 and increased healthcare costs [2].

90 In PJI microenvironment, a complex interaction between the infecting pathogen
91 and components of the host immune system takes place, resulting in cellular and
92 molecular changes that reflect the state of infection and may be used for PJI diagnosis
93 as well as for monitoring treatment response [3,4]. However, despite its importance and
94 the growing body of knowledge focusing on its treatment, microbiological profile and
95 diagnosis, there is a paucity of information about its pathogenesis.

96 Most data on the pathophysiology of PJIs derive from reductionist approaches
97 that seek to investigate the role of a single isolated component in a larger biological
98 system [5]. However, infectious diseases are particularly complex as they involve the
99 consideration of two main components, the host and the pathogen, thus requiring a
100 thorough understanding of the connection between the parties to have a comprehensive
101 knowledge of them [6].

102 Metabolomics, which refers to the determination and quantification of
103 metabolites within a biological system, is a high-throughput methodology that can aid in
104 the discovery of disease mechanisms and biomarkers [7]. Such an approach may reveal
105 several aspects of the intricate connection among pathogen, host immune response and
106 energy metabolism. Metabolomics is a central omics in the flux of information since
107 metabolites pools reflect the instantaneous status of a biological system in conditions

108 either with health or with disease [8]. However, this has not been explored in relation to
109 PJI. Therefore, the aim of this study is to use NMR spectroscopy to compare the
110 metabolic profile of synovial fluids from patients with PJI with those from aseptic
111 failures.

112 **Methods**

113 This study was conducted in a tertiary healthcare center specialized in high-
114 complexity orthopedic surgery and was approved by the Human Ethics Committee of
115 the [REDACTED]
116 [REDACTED]. All patients provided an informed consent for the purpose of this study.
117 Synovial fluid was collected from patients undergoing knee arthroplasty revision
118 surgery. Exclusion criteria included systemic inflammatory disease, insufficient
119 synovial fluid volume, single positive microbiological culture and lack of appropriate
120 clinical and laboratorial data to confirm or exclude a PJI.

121 All participants were evaluated according to the International Consensus
122 Meeting on Musculoskeletal Infection 2013 (ICM) criteria [9]. Synovial fluid was
123 obtained during the revision procedure, prior to the arthrotomy. Three to five milliliters
124 were drawn into vials for aerobic and anaerobic cultures (Becton, Dickinson and
125 Company, New Jersey, USA). Culture dishes were held for 14 days and discarded after
126 turning into positive results according to a laboratory protocol. In addition to that, five
127 to seven periprosthetic tissue samples were also harvested and sent for microbiological
128 analyses. Histopathological analyses were also performed on periprosthetic membranes.

129 The cohort of participants for the study was divided into two groups. The
130 infection group was composed of patients with two or more positive cultures of
131 periprosthetic tissue with growth of the same pathogen. Patients in the non-infection

132 group displayed 3 or more of the minor criteria, except for the single positive culture,
133 that was an exclusion criteria. The study population consisted of 21 patients: 11 with PJI
134 and 10 with aseptic failure. Patient demographics is summarized **table 1**. Infected and
135 non-infected groups did not differ regarding age, BMI and comorbidities. The identified
136 pathogens and their respective frequencies are displayed in **table 2**. Two patients had
137 polymicrobial infections (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*; and *S.*
138 *aureus*, *Klebsiella aerogenes* and *S. epidermidis*). Within the infected cohort, 4 acute
139 and 7 chronic PJIs were identified. No patients in the infected group presented with
140 fistula.

141 Synovial fluid was collected prior to the arthrotomy. An aliquot of the collected
142 synovial fluid was transferred to Ethylene Diamine Tetra Acetic acid containing tubes
143 (Becton Dickinson, New Jersey, USA), centrifuged at 4800 x g for 10 minutes, and the
144 cell-free supernatant was aliquoted in sterile tubes and stored at -80° C until further
145 analysis. The samples were kept frozen for a maximum of 6 months until the
146 preparation and performance of the analysis by Proton NMR spectroscopy.

147 The sample preparation was done as described previously [10]. Briefly, a sample
148 of synovial fluid was thawed at room temperature and immediately centrifuged at 6000
149 x g for 40 minutes at 4°C for additional removal of debris and protein aggregates. Then,
150 500 microliters of the supernatant were mixed with 1mL of sodium phosphate buffer
151 solution (50mM) with pH 7.4, containing 100% deuterated water (Cambridge Isotope
152 Laboratories, Inc., Massachusetts, USA). In order to obtain a macromolecule-depleted
153 fluid, this solution was filtered through an Amicom filter (3-kDa cutoff) (Merck,
154 Darmstadt, Germany), according to the manufacturer's instructions, and then
155 centrifuged at 3000 x g, for 40 minutes at 4° C. The eluted material was collected and
156 600 µL were transferred for 5 mm diameter NMR tubes.

157 One- and two-dimensional ^1H spectra were acquired in a Bruker Avance III HD
158 spectrometer, operating at 500 MHz, in TopSpin 3.2 software (Bruker) and IconNMR
159 4.6.7 software. One-dimensional ^1H spectra were acquired with excitation sculpting for
160 water suppression (ZGESGP pulse sequence), 1k scans, 64K TD in the acquisition time
161 of 3.27 s, relaxation delay of 1.74 s and sweep width 20 ppm at 25°C. For assignments
162 the two-dimensional ^1H - ^1H total correlation spectroscopy (TOCSY) spectrum was
163 acquired. The assignments were carried out through the HMDB 5.0, BMRB databases
164 [11,12], and COLMAR-TOCSY platform [13], with ^1H chemical shift cutoff (ppm) of
165 0.03 ppm, matching ratio cutoff of 0.6, direct matching method for aqueous database,
166 as shown by the supplementary table 1

167 After acquisition, spectra were processed in different steps on MestReNova
168 version 14.2.1-276840.02 ppm binning by average sum method phase and baseline
169 correction and spectra calibration. In order to eliminate artifacts compounds we
170 removed the buckets referring to, water, regions with negative signs, regions referring to
171 EDTA, glycerol and ethanol (present in filter and in asepsis, respectively). Finally,
172 binning table was normalized by the sum of intensities.

173 MetaboAnalyst 5.0 was used for multivariate statistical analyses [12]. We used
174 the unsupervised principal component analysis (PCA) to create a statistical
175 classificatory model. Multiple T-test was used for univariate analysis, and a $p < 0.05$
176 was considered statistically significant following correction for multiple testing using
177 the Benjamini-Hochberg false discovery rate method.

178 **Results**

179 A representative ^1H NMR spectrum of infected and non-infected synovial fluid
180 is detailed in **Figure 1**. Twenty-eight metabolites were identified and are listed in **table**
181 **3**. The unsupervised principal component analysis score plot showed a partial
182 distinction between infected and non-infected groups. The first two principal
183 components of this model explain 74,4% of the variance between groups, with lactate
184 being the major discriminating metabolite. Notably it was possible to identify two
185 distinct metabolic patterns within the infected group with one of them clearly
186 overlapping the non-infected group (**Figure 2A**).

187 Analysis of the PCA loading plot indicated that PJI samples tend to have a
188 higher amount of lactate, and that in the non-infected ones a greater concentration of
189 glucose can be found (**Figure 2B**).

190 Multiple T test was performed to identify metabolites that were differently
191 abundant between the groups. The five metabolites that showed different concentrations
192 between both groups were: lactate, acetate and 3-hydroxybutirate, that were elevated in
193 infected synovial fluid, and glucose and creatine, that were found in higher
194 concentration in non-infected group. When we considered the false discovery rate, a
195 correction for multiple T tests, lactate and glucose still showed significantly different
196 between both groups (**Table 4**).

197 Once we identified two distinct profiles among patients with PJI, we specifically
198 analyzed these patients to disclose the possible causes of such variation. When infected
199 samples were categorized according to a timeline (acute or chronic), we could not
200 obtain a clear separation between groups (Supplementary Figure 1). However, when a
201 set of samples were categorized considering the identification of *S. aureus* as the (or one
202 of the) causative pathogens, we observed a clear separation between both groups.

203 Loading plot analyses revealed that synovial fluid from *S. aureus* infected patients tend
204 to have higher amounts of lactate and acetate (**Figure 3**).

205 **Discussion**

206 In the last century, the rapid growth of knowledge about metabolism,
207 architecture of metabolic pathways, and their effects on cellular function is opening new
208 avenues in the understanding of physiological and pathological processes. In infectious
209 diseases, new evidence has shown that pathogen and host cells engage in bidirectional
210 modulation of their respective metabolism, thus regulating cellular function, which
211 dictates disease evolution and outcomes [14–16]. Here we have performed a
212 comprehensive analysis of the metabolites in the synovial fluid of patients with PJI and
213 showed that the infected periprosthetic microenvironment has a distinct metabolic
214 profile characterized by increased levels of lactate, acetate and 3-hydroxybutyrate and
215 reduced levels of glucose and creatine. Besides, our results reveal that synovial fluid
216 from PJIs caused by *S. aureus* display increased amounts of lactate compared to
217 synovial fluid from infections by other pathogens. This study differs from previous ones
218 as it is the first that evaluates exclusively patients with knee prostheses in both the PJI
219 and the control groups[17].

220 A comprehensive analysis on the fluctuation of metabolites in the synovial fluid
221 of patients with PJI can reveal novel aspects of cellular processes and metabolic
222 adaptations within the infected microenvironment that might help not only in the
223 discovery of new potential biomarkers but could provide further insights for
224 understanding the pathogenesis of PJI, enabling the development of innovative
225 therapeutic strategies [18].

226 Recent evidence has shown that a critical step in the orchestration of immune
227 cells is the reprogramming of their cellular metabolism [19,20], which means that
228 cellular energy metabolism pathways are altered during the activation and function of
229 immune cells and that intermediates and metabolic by-products of these pathways
230 modulate immune cell function [21]. On the other hand, pathogens also regulate their
231 metabolism during the course of the infection and such an alteration directly impacts
232 their virulence [16].

233 The presence of neutrophils is the hallmark in PJIs. Upon pathogen sensing,
234 those cells primarily utilize glucose and glycolysis to fuel their respiratory burst, that
235 refers to the rapid generation of the reactive oxygen species (ROS) through the catalytic
236 conversion of molecular O₂ to ROS [22]. Activated neutrophils display an increased
237 surface expression of glucose transporters which is accompanied by an increased uptake
238 of glucose that is converted into pyruvate through the glycolytic pathway [23]. Under
239 hypoxic conditions, when cellular oxygen demand exceeds supply, pyruvate is oxidized
240 to lactate and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) [24]. Although the
241 establishment of a hypoxic environment has not yet been specifically addressed in PJI,
242 previous studies have shown that in inflammatory conditions like rheumatoid arthritis or
243 osteoarthritis, synovial fluid pO₂ levels are reduced [25,26]. Hypoxia in the synovial
244 fluid of rheumatoid arthritis affected patients was characterized by a low synovial pH
245 and increased lactate, 3-D-hydroxybutarate and acetate levels [27,28]. Remarkably, the
246 establishment of a hypoxic environment is a common feature during inflammation
247 associated with bacterial infection [29], and a previous study has shown that neutrophils
248 at the site of biofilm infection consume high amounts of oxygen, thus creating an
249 anaerobic environment [30,31].

250 In addition to hypoxia, it has been shown that activated neutrophils do not fully
251 oxidize glucose even under normoxic conditions, on the contrary, pyruvate is
252 preferentially oxidized to lactate through the engagement of Warburg metabolism,
253 which is characterized by an increase in the rate of glucose uptake and preferential
254 production of lactate to synthesize nicotine adenine dinucleotide phosphate (NADPH)
255 to support its respiratory burst [19,32,33].

256 Considering the above, the reduced levels of glucose coupled with increased
257 levels of lactate observed in our study may suggest both the establishment of a hypoxic
258 environment or the engagement of Warburg metabolism by synovial fluid infiltrating
259 neutrophil. Further studies are needed to specifically address the processes taking place
260 within periprosthetic infected microenvironment.

261 From a pathogen perspective, during infection, several aspects of host immune
262 response limits bacterial respiration, (e.g., massive oxygen consumption by innate
263 immune cells, iron chelation, nitric oxide production) [34,35]. Additionally, it has been
264 shown that a variety of microbes enter glycolysis, an energetically less efficient
265 pathway, in a mechanism known as overflow metabolism, that is the equivalent to the
266 Warburg effect [36]. Through this process, substrates like glucose, are not fully
267 oxidized through the respiratory pathway, and as a result metabolites like acetate, lactate
268 and methanol are excreted. To succeed in this metabolic scenario of competition for
269 glucose, it has been shown that pathogens like *S. aureus*, one of the most prevalent
270 pathogens in PJIs, display increased capacity for carbohydrate import, with a
271 preferential absorption of glucose as a metabolic adaptation that allows a more efficient
272 uptake of carbohydrates [37].

273 In bacteria, overflow metabolism is thought to be a mechanism to facilitate the
274 biosynthesis of molecules required for invasion and growth [16]. This mechanism has
275 been associated with a fast pathogen growth and it has been proposed that the synthesis
276 of the enzymes required for respiration is more costly than for those required for partial
277 oxidation of glucose, what would be energetically inefficient in supporting fast growth
278 in comparison to the incomplete oxidative metabolism [36]. Previous studies with *E.*
279 *coli* have shown that the overflow metabolism pathway is associated with increased
280 production of acetate, also pointing out this pathway as a potential source of increased
281 acetate within synovial fluid from PJI patients [38]. An integrative view of the potential
282 metabolic adaptations occurring within PJI microenvironment is shown in **figure 4**.

283 An important finding of our study was the identification of two distinct
284 metabolic profiles within patients with PJI that showed distinct levels of lactate and
285 could be discriminated based on the identification of *S. aureus* as the causative
286 pathogen. A previous study from Palama et al (2016) has evaluated the metabolome of
287 different bacterial species and showed that they displayed distinct metabolic profile,
288 with *S. aureus* cultures displaying higher contents of lactate and acetate [39]. Therefore,
289 our study corroborates this finding as we have also identified an increased abundance of
290 lactate in the synovial fluid from *S. aureus* infected patients. However, due to the small
291 number of patients in our cohort, novel studies are needed to confirm this finding.
292 Besides, novel studies with synovial fluid from patients with PJI caused by distinct
293 bacterial species may result in the identification of specific metabolites that can aid in
294 the identification of the causative pathogens in a microbiological culture independent
295 fashion.

296 PJI treatment remains a challenge mainly due to the formation of bacterial
297 biofilm and failure may occur in up to 20% of the patients [40]. The comprehension of

298 the metabolic adaptation induced in bacteria during infection is of major importance for
299 PJI treatment as several studies have highlighted that: i) antibiotics can alter the
300 metabolic state of bacteria; ii) the bacteria metabolic state influences their susceptibility
301 to antibiotics, and iii) antibiotic efficacy can be modulated by altering the bacteria
302 metabolic state [41,42]. The present study did not address the metabolic differences
303 between planktonic and biofilm bacteria; however, our results may pave the way to a
304 deeper understanding on the modulation of the metabolic pathways in both bacterial
305 states, enabling the development of therapeutic strategies that result in better outcomes
306 for patients with a PJI.

307 This study was limited by the small sample size that impaired the performance
308 of subgroup analyses to identify distinct metabolic profiles associated with a specific
309 pathogen. Besides, most of the metabolites involved in prokaryotic and eukaryotic
310 pathways are similar, a distinction between host-induced metabolic response and
311 pathogen metabolic pathway is difficult to be achieved, further studies addressing
312 specifically the cellular and molecular mechanisms involved in the metabolic
313 adaptations proposed here are warranted.

314 Taken together our results show that the synovial fluid from patients with PJI
315 display a distinct metabolic profile, suggesting the establishment of metabolic
316 adaptations in host cells and bacteria within periprosthetic infected microenvironment.

317 **Acknowledgments**

318 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
319 Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

320 **References**

- 321 [1] Koh CK, Zeng I, Ravi S, Zhu M, Vince KG, Young SW. Periprosthetic Joint
322 Infection Is the Main Cause of Failure for Modern Knee Arthroplasty: An
323 Analysis of 11,134 Knees. *Clin Orthop Relat Res* 2017;475:2194–201.
324 <https://doi.org/10.1007/s11999-017-5396-4>.
- 325 [2] Bozic KJ, Kamath AF, Ong K, Lau E, Kurtz S, Chan V, et al. Comparative
326 Epidemiology of Revision Arthroplasty: Failed THA Poses Greater Clinical and
327 Economic Burdens Than Failed TKA. *Clin Orthop Relat Res* 2015;473:2131–8.
328 <https://doi.org/10.1007/s11999-014-4078-8>.
- 329 [3] Staats A, Li D, Sullivan AC, Stoodley P. Biofilm formation in periprosthetic joint
330 infections. *Ann Jt* 2021;6. <https://doi.org/10.21037/AOJ-20-85>.
- 331 [4] Izakovicova P, Borens O, Trampuz A. Periprosthetic joint infection: current
332 concepts and outlook. *EFORT Open Rev* 2019;4:482–94.
333 <https://doi.org/10.1302/2058-5241.4.180092>.
- 334 [5] Shahi AS, Parvizi J. The role of biomarkers in the diagnosis of periprosthetic
335 joint infection. *EFORT Open Rev* 2016;1:275–8. <https://doi.org/10.1302/2058-5241.1.160019>.
- 337 [6] Eckhardt M, Hultquist JF, Kaake RM, Hüttenhain R, Krogan NJ. A systems
338 approach to infectious disease. *Nat Rev Genet* 2020;21:339–54.
339 <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0212-5>.
- 340 [7] Schelli K, Zhong F, Zhu J. Comparative metabolomics revealing *Staphylococcus*
341 *aureus* metabolic response to different antibiotics 2017;10:1764–74.
342 <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12839>.
- 343 [8] Tounta V, Liu Y, Cheyne A, Larrouy-Maumus G. Metabolomics in infectious
344 diseases and drug discovery. *Mol Omics* 2021;17:376–93.
345 <https://doi.org/10.1039/d1mo00017a>.
- 346 [9] Parvizi J, Gehrke T, Chen AF. Proceedings of the International Consensus on
347 Periprosthetic Joint Infection. *Bone Joint J* 2013;95-B:1450–2.
348 <https://doi.org/10.1302/0301-620X.95B11.33135>.
- 349 [10] de Sousa EB, de Farias GC, dos Santos Junior GC, Almeida FC, Duarte ML,
350 Neto VM, et al. Normal and osteoarthritic synovial fluid present different
351 metabolomic profile. *Osteoarthritis Cartilage* 2017;25:S384.
352 <https://doi.org/10.1016/j.joca.2017.02.657>.
- 353 [11] Ulrich EL, Akutsu H, Doreleijers JF, Harano Y, Ioannidis YE, Lin J, et al.
354 BioMagResBank. *Nucleic Acids Res* 2008;36:D402–8.
355 <https://doi.org/10.1093/nar/gkm957>.
- 356 [12] Pang Z, Chong J, Zhou G, de Lima Morais DA, Chang L, Barrette M, et al.
357 *MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional*

- 358 insights. *Nucleic Acids Res* 2021;49:W388–96.
359 <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB382>.
- 360 [13] Robinette SL, Zhang F, Brüscheweiler-Li L, Brüscheweiler R. Web Server Based
361 Complex Mixture Analysis by NMR. *Anal Chem* 2008;80:3606–11.
362 <https://doi.org/10.1021/AC702530T>.
- 363 [14] Park JH, Shim D, Kim KES, Lee W, Shin SJ. Understanding Metabolic
364 Regulation Between Host and Pathogens: New Opportunities for the
365 Development of Improved Therapeutic Strategies Against Mycobacterium
366 tuberculosis Infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11.
367 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.635335>.
- 368 [15] Hosomi K, Kunisawa J. Diversity of energy metabolism in immune responses
369 regulated by micro-organisms and dietary nutrition n.d.
370 <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa020>.
- 371 [16] Troha K, Ayres JS. Metabolic Adaptations to Infections at the Organismal Level.
372 *Trends Immunol* 2020;41:113–25. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.12.001>.
- 373 [17] Akhbari P, Jaggard MK, Boulangé CL, Vaghela U, Graça G, Bhattacharya R, et
374 al. Differences between infected and noninfected synovial fluid. *Bone Joint Res*
375 2021;10:85–95. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.101.BJR-2020-0285.R1/ASSET/IMAGES/LARGE/BJR-2020-0285.R1-GALLEYFIG4.JPEG>.
- 377 [18] Bjarnsholt T, Whiteley M, Rumbaugh KP, Stewart PS, Jensen P, Frimodt-Møller
378 N. The importance of understanding the infectious microenvironment. *Lancet Infect Dis* 2022;22:e88–92. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00122-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00122-5).
- 380 [19] Ganeshan K, Chawla A. Metabolic regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2014;32:609–34. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120236>.
- 383 [20] Makowski L, Chaib M, Rathmell JC. Immunometabolism: From basic
384 mechanisms to translation. *Immunol Rev* 2020;295:5–14.
385 <https://doi.org/10.1111/IMR.12858>.
- 386 [21] Hosomi K, Kunisawa J. Diversity of energy metabolism in immune responses
387 regulated by micro-organisms and dietary nutrition. *Int Immunol* 2020;32:447–
388 54. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa020>.
- 389 [22] Lawrenz MB, Derek Pechous R, Allen L-AH, Bourret T, Mecsas J, Nguyen GT,
390 et al. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation
391 and Bacterial Resistance Activation and Inhibition of NADPH Oxidase. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | WwwFrontiersinOrg 2017;1:373.
392 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373>.
393

- 394 [23] Maratou E, Dimitriadis G, Kollias A, Boutati E, Lambadiari V, Mitrou P, et al.
395 Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated
396 white blood cells. *Eur J Clin Invest* 2007;37:282–90.
397 <https://doi.org/10.1111/J.1365-2362.2007.01786.X>.
- 398 [24] Wheaton WW, Chandel NS. Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism.
399 *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;300:385–93.
400 <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00485.2010.-Adap>.
- 401 [25] Richman AI, Su EY, Ho G. Reciprocal relationship of synovial fluid volume and
402 oxygen tension. *Arthritis Rheum* 1981;24:701–5.
403 <https://doi.org/10.1002/ART.1780240512>.
- 404 [26] Stevens CR, Williams RB, Farrell AJ, Blake DR. Hypoxia and inflammatory
405 synovitis: Observations and speculation. *Ann Rheum Dis* 1991;50:124–32.
406 <https://doi.org/10.1136/ard.50.2.124>.
- 407 [27] Bodamyali T, Stevens CR, Billingham MEJ, Ohta S, Blake DR. Influence of
408 hypoxia in inflammatory synovitis. *Ann Rheum Dis* 1998;57:703–10.
409 <https://doi.org/10.1136/ARD.57.12.703>.
- 410 [28] Kuo C-H, Ruscitti P, Perucha E, Pucino V, Certo M, Varricchi G, et al.
411 Metabolic Checkpoints in Rheumatoid Arthritis 2020.
412 <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00347>.
- 413 [29] Hayek I, Schatz V, Bogdan · Christian, Jantsch J, Lührmann · Anja. Mechanisms
414 controlling bacterial infection in myeloid cells under hypoxic conditions
415 2021;78:1887–907. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03684-8>.
- 416 [30] Ciofu O, Rojo-molinero E, D Maci A MI, Oliver A. Antibiotic treatment of
417 biofilm infections 2017. <https://doi.org/10.1111/apm.12673>.
- 418 [31] Kolpen M, Hansen CR, Bjarnsholt T, Moser C, Christensen LD, van Gennip M,
419 et al. Polymorphonuclear leucocytes consume oxygen in sputum from chronic
420 *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Thorax* 2010;65:57–62.
421 <https://doi.org/10.1136/THX.2009.114512>.
- 422 [32] dos Santos GC, Saldanha-Gama R, de Brito NM, Renovato-Martins M, Barja-
423 Fidalgo C. Metabolomics in cancer and cancer-associated inflammatory cells. *J*
424 *Cancer Metastasis Treat* 2021;7. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2020.86>.
- 425 [33] Ohms M, Ferreira C, Busch H, Wohlers I, Guerra de Souza AC, Silvestre R, et al.
426 Enhanced Glycolysis Is Required for Antileishmanial Functions of Neutrophils
427 Upon Infection With *Leishmania donovani*. *Front Immunol* 2021;12:418.
428 <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.632512/BIBTEX>.

- 429 [34] Friedman DB, Stauff DL, Pishchany G, Whitwell CW, Torres VJ, Skaar EP.
430 *Staphylococcus aureus* Redirects Central Metabolism to Increase Iron
431 Availability n.d. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020087>.
- 432 [35] Vitko NP, Spahich NA, Richardson AR. Glycolytic dependency of high-level
433 nitric oxide resistance and virulence in *staphylococcus aureus*. *MBio* 2015;6.
434 [https://doi.org/10.1128/MBIO.00045-](https://doi.org/10.1128/MBIO.00045-15/SUPPL_FILE/MBO002152259ST1.DOCX)
435 [15/SUPPL_FILE/MBO002152259ST1.DOCX](https://doi.org/10.1128/MBIO.00045-15/SUPPL_FILE/MBO002152259ST1.DOCX).
- 436 [36] Szenk M, Dill KA, de Graff AMR. Why Do Fast-Growing Bacteria Enter
437 Overflow Metabolism? Testing the Membrane Real Estate Hypothesis. *Cell Syst*
438 2017;5:95–104. <https://doi.org/10.1016/J.CELS.2017.06.005>.
- 439 [37] Vitko NP, Grosser MR, Khatri D, Lance TR, Richardson AR. Expanded glucose
440 import capability affords *Staphylococcus aureus* optimized glycolytic flux during
441 infection. *MBio* 2016;7. [https://doi.org/10.1128/MBIO.00296-](https://doi.org/10.1128/MBIO.00296-16/SUPPL_FILE/MBO003162850ST3.DOCX)
442 [16/SUPPL_FILE/MBO003162850ST3.DOCX](https://doi.org/10.1128/MBIO.00296-16/SUPPL_FILE/MBO003162850ST3.DOCX).
- 443 [38] Millard P, Enjalbert B, Uttenweiler-Joseph S, Portais JC, Létisse F. Control and
444 regulation of acetate overflow in *escherichia coli*. *Elife* 2021;10.
445 <https://doi.org/10.7554/ELIFE.63661>.
- 446 [39] Palama TL, Canard I, Rautureau GJP, Mirande C, Chatellier S, Elena-Herrmann
447 B. Identification of bacterial species by untargeted NMR spectroscopy of the
448 exo-metabolome. *Analyst* 2016;141:4558–61.
449 <https://doi.org/10.1039/C6AN00393A>.
- 450 [40] Peel TN, de Steiger R. How to manage treatment failure in prosthetic joint
451 infection. *Clinical Microbiology and Infection* 2020;26:1473–80.
452 <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2020.06.022>.
- 453 [41] Stokes JM, Lopatkin AJ, Lobritz MA, Collins JJ. Bacterial Metabolism and
454 Antibiotic Efficacy. *Cell Metab* 2019;30:251.
455 <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2019.06.009>.
- 456 [42] Cabral DJ, Penumutthu S, Reinhart EM, Zhang C, Korry BJ, Wurster JI, et al.
457 Microbial Metabolism Modulates Antibiotic Susceptibility within the Murine Gut
458 Microbiome. *Cell Metab* 2019;30:800-823.e7.
459 <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2019.08.020>.

460

461 **Tables**462 **Table 1. Patients characteristics**

	Non-infection (n=10)	Infection (n=11)	P
Age (median [IQR]; years)	75 [68 – 78]	71 [66 – 78]	0.587 ^a
Sex (n)			0.182 ^b
Male	2	6	
Female	8	5	
BMI (kg/m ²) (mean ± SD)	31.1 ± 4.9	31.6 ± 6.2	0.833 ^a
Comorbidities			
High pressure	9	9	
Diabetes	2	3	
Coronary disease	1	2	
Kidney disease	1	3	
Hypothyroidism	0	2	-
COPD	1	1	
Vascular insufficiency	1	1	
Hepatitis	0	1	
CRP (mg/l)	0.72 ± 0.72	9.4 ± 11.06	0.03
ESR (mm/hr)	41 ± 31	64 ± 33	0.13
% PMN (%)	26.4 ± 17.7	59.1 ± 37.9	0.03
Leukocyte count (cells/mm ³)	15177 ± 43338	133719 ± 239733	0.01

463 ^a T test; ^b Chi square

464

Table 2. Causative microorganisms

MICROORGANISM	FREQUENCY (N (%))
<i>Staphylococcus aureus</i>	4 (36%)
<i>Staphylococcus cohnii</i>	2 (18%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2 (18%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	2 (18%)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1 (9%)
<i>Staphylococcus hominis</i>	1 (9%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1 (9%)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1 (9%)

465

466

467

468

Table 3. Metabolites annotated in synovial fluid

Identified metabolites
Butanol
Leucine
L_Valine
Ethanol
3_Hydroxybutyrate
L_Threonine
Lactate
Alanine
Acetate
Lysine
Tetrahydrofuran
L_Glutamic_acid
L_Glutamine
3_Hydroxypropionic_acid
L_Carnitine

Citrate
Creatine
L_Phenylalanine
L_Histidine
Ethanolamine
L_Cystine
L_Tyrosine
Diethanolamine
D_Glucose
Betaine
Taurine
Choline
Glycerol

469

470

Table 4. Differently abundant metabolites

Metabolite	¹ H Chemical Shift (ppm)	Non infection	Infection	Status ^a	P value	Q value*
Lactate	1.32	4785	7052	↑	<0.0001	<0.0000
Glucose	3.46-3.50	938	448	↓	<0.00001	0.0002
Creatine	3.92	585.6	310.7	↓	0.007	0.1
Acetate	1.92	235.1	447	↑	0.03	0.445
3- Hydroxybutyrate	1,20	242.2	448	↑	0.045	0.481

471

^a infected cohort related to non-infected

472

473

Figure Legends

474 **Figure 1.** Representative spectra of synovial fluid from aseptic failure (top) and
475 PJI (bottom).

476 **Figure 2.** Principal component analysis (PCA) score plot of synovial fluid from
477 patients with (red) and without (green) periprosthetic joint infection. (B) Loading
478 plot.

479 **Figure 3.** (A) Principal component analysis (PCA) score plot of synovial fluid
480 from patients with periprosthetic joint infection; colors according to infecting
481 pathogen. (B) Loading plot.

482 **Figure 4.** Proposed metabolic adaptations underlying metabolic alterations
483 identified within synovial fluid from patients with periprosthetic joint infection.

484 **Supplementary Figure 1.** A) Principal component analysis (PCA) score plot of
485 synovial fluid from patients with acute (red) and chronic (green) periprosthetic
486 joint infection. (B) Loading plot.

487

488

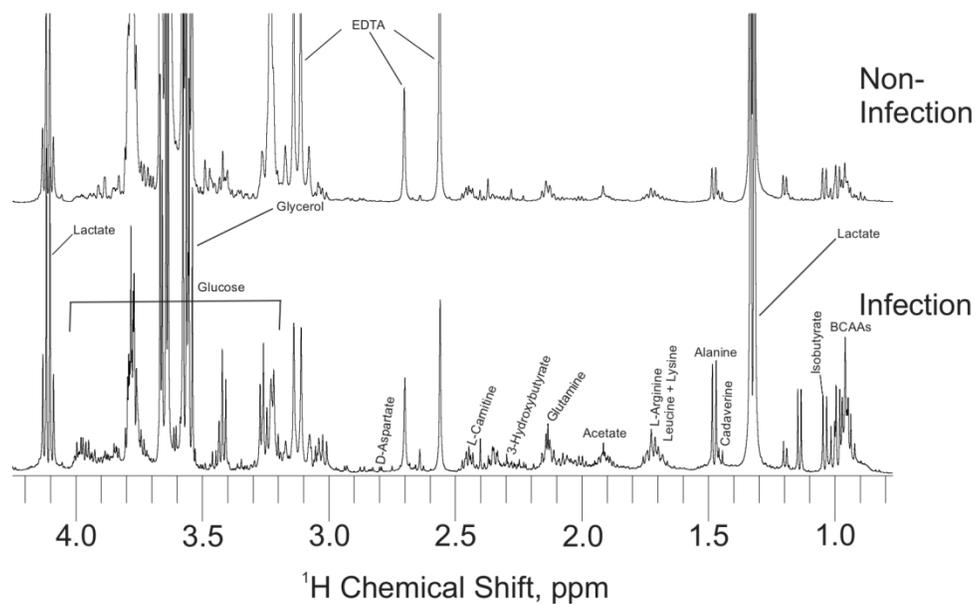


Figure 1. Representative spectra of synovial fluid from aseptic failure (top) and PJI (bottom).

279x215mm (150 x 150 DPI)

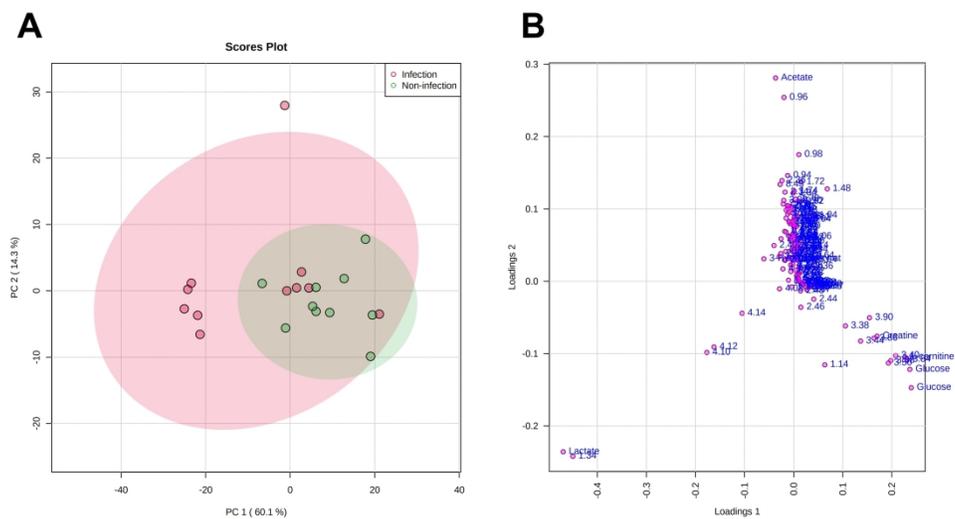


Figure 2. (A) Principal component analysis (PCA) score plot of synovial fluid from patients with (red) and without (green) periprosthetic joint infection. (B) Loading plot.

323x173mm (300 x 300 DPI)

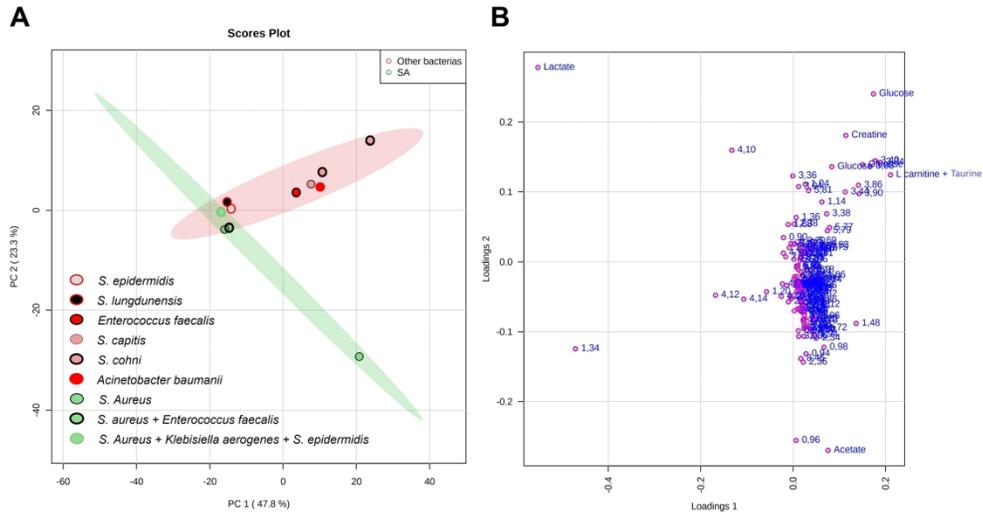


Figure 3. (A) Principal component analysis (PCA) score plot of synovial fluid from patients with periprosthetic joint infection; colors according to infecting pathogen. (B) Loading plot.

408x217mm (300 x 300 DPI)

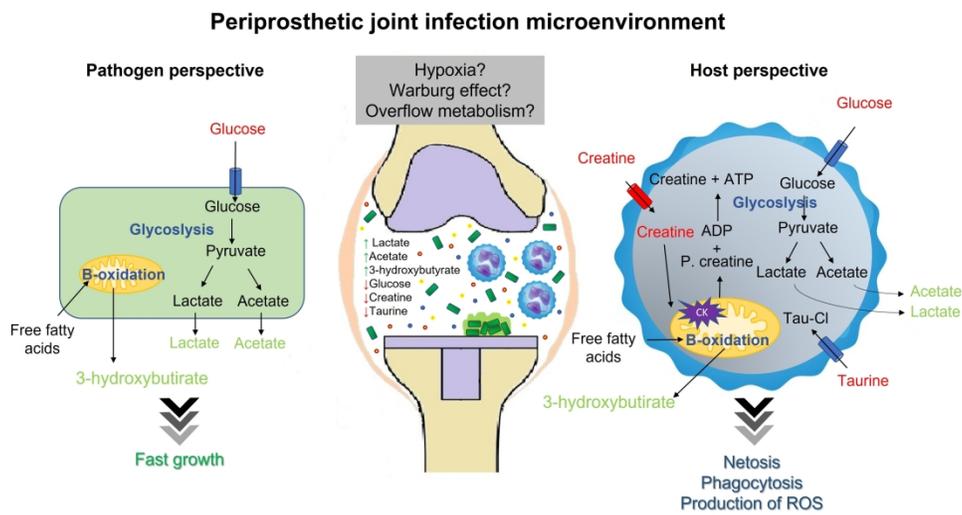


Figure 4. Proposed metabolic adaptations underlying metabolic alterations identified within synovial fluid from patients with periprosthetic joint infection.

368x198mm (300 x 300 DPI)

Causes of Revision of Total Knee Arthroplasties in a Tertiary Hospital in Brazil

Causas de revisão de artroplastias totais do joelho em um hospital terciário no Brasil

Alan de Paula Mozella^{Q1}¹ Hugo Alexandre de Araújo Barros Cobra¹ Sandra Tie Nishibe Minamoto¹
Rodrigo Salim² Ana Carolina Leal³



¹Department of Orthopedics and Traumatology, Knee Surgery Center, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Department of Orthopedics and Anesthesiology, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP-RP), São Paulo, SP, Brazil

³Division of Teaching and Research, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Address for correspondence Alan de Paula Mozella, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, INTO Rio de Janeiro, RJ, Brazil (e-mail: apmozella@terra.com.br).

Rev Bras Ortop 2022;00(0):1–6.

Abstract

Objective To identify the causes of revision of total knee arthroplasty in a referral center in Brazil.

Methods This is a case series, with 80 patients undergoing revision surgery for total knee arthroplasty (RTKA) at a referral center for knee surgery, between August 2019 and November 2021, with a mean age of 69.6 years. Of these patients, 60.23% were female and 39.77% were male. The average body mass index (BMI) was 30.23 kg/m². The causes of TKA failure were defined as: periprosthetic infection according to the 2018 International Consensus Meeting criteria, ligament instability, range of motion limitation, periprosthetic fracture, malalignment, aseptic loosening, pain due to non-replacement of the patellar cartilage, polyethylene wear, fracture of implants, insufficiency of the extensor mechanism.

Results Periprosthetic joint infection (PJI) was the main cause of revision total knee arthroplasty (TKA), corresponding to 47.73% of cases. Aseptic loosening of one or more components represented the second most frequent reason for TKA failure, accounting for 35.23% of revisions. Range of motion limitation represented the third most frequent cause, accounting for 5.68% of surgeries. Instability was the fourth most frequent reason for RTKA, occurring in 4.55% of patients. The other causes of revision were: periprosthetic fracture (3.41%), failure due to rupture of the extensor mechanism (2.27%), and pain attributed to non-replacement of the patellar cartilage (1.14%).

Keywords

- ▶ arthroplasty
- ▶ replacement
- ▶ knee
- ▶ knee joint
- ▶ arthroplasty
- ▶ infections

received
April 19, 2022
accepted
August 17, 2022

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0042-1757304>.
ISSN 0102-3616.

© 2022. Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. All rights reserved.

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

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

Resumo

Conclusions Periprosthetic joint infection was the most frequent cause of TKA revision in our series. Other reasons for TKA failures were, in descending order: aseptic loosening, limited range of motion, and instability.

Objetivo Identificar as causas de revisão de artroplastia total do joelho em um centro de referência no Brasil.

Métodos Trata-se de uma série de casos, com 80 pacientes submetidos à cirurgia de revisão de artroplastia total do joelho (RATJ) em um centro de referência em cirurgia do joelho, no período entre agosto de 2019 e novembro de 2021, com média de idade de 69,6 anos. Desses pacientes, 60,23% eram do sexo feminino e 39,77% do sexo masculino. O índice de massa corporal (IMC) médio foi de 30,23 kg/m². As causas de falha da ATJ foram definidas como: infecção periprotética conforme critérios do 2018 *Internacional Consensus Meeting*, instabilidade ligamentar, limitação de arco de movimento, fratura periprotética, mal alinhamento, soltura asséptica, dor devido à não substituição da cartilagem patelar, desgaste do polietileno, fratura dos implantes, insuficiência do mecanismo extensor.

Resultados A infecção articular periprotética (IAP) foi a principal causa de revisão de artroplastia total do joelho (ATJ), correspondendo a 47,73% dos casos. A soltura asséptica de um ou mais componentes representou o segundo motivo mais frequente para causa de falha de ATJ, acarretando 35,23% das revisões. Limitação do arco de movimento representou a terceira mais frequente causa, sendo responsável por 5,68% das cirurgias. Instabilidade foi a 4ª razão mais frequente para RATJ, ocorrendo em 4,55% dos pacientes. As demais causas de revisão foram: fratura periprotética (3,41%), insuficiência por ruptura do mecanismo extensor (2,27%), dor atribuída à não substituição da cartilagem patelar (1,14%).

Conclusões A infecção articular periprotética foi a causa mais frequente de revisão de ATJ em nossa série. Outras razões de falhas de ATJ foram, em ordem decrescente: soltura asséptica, limitação do arco de movimento e instabilidade.

Palavras-chave

- ▶ articulação do joelho
- ▶ artroplastia do joelho
- ▶ artroplastia
- ▶ infecções

Introduction

Epidemiological data show that between 6 and 12% of total knee arthroplasties (TKA) evolve to failure, requiring revision surgery in the first 10 years.¹ Other recent studies have shown an increase in the number of revision surgeries of TKA (RTKA) performed in recent years.²⁻⁵ There was a 144% increase in the number of RTKA performed in Germany between 2004 and 2014.⁶ It is estimated that, for the year 2050, in the same country, there will be an increase of about 90% in the number of revision surgeries of knee arthroplasties.⁴ In the United States, the increase in the number of such procedures was of 39% between 2006 and 2010.⁷ And future estimates point to a continuous increase in the number of these surgeries by the year 2030.⁸

The etiology for increasing the number of RTKAs is, in fact, multifactorial, being influenced both by factors related to technical issues and evolution of implants and instruments, as well as by factors related to patients.^{9,10} An example of this, the wear of the polyethylene component was a frequent cause of revision in the past; however, changes in the sterilization process of these components culminated in a significant reduction in the number of revisions for this

reason.¹¹⁻¹³ At the same time, the expansion of primary prosthesis indications, especially for younger patients, and the higher incidence of obesity in the world population may, at least partially, also justify potential changes in the failure patterns of modern arthroplasties.^{9,14,15} Meehan et al.¹⁴ demonstrated that the risk of septic failure was 1.81 times higher in patients under 50 years of age when compared to patients older than 65 years. Similarly, among younger patients, the risk of revision for aseptic failure was 4.7 times higher.¹⁴

Knee prosthesis revision surgeries are procedures of high complexity, performed in a limited number of hospitals and, consequently, that require greater expenditure of technical and economic resources.^{16,17} Compliance with technical principles is essential to obtain satisfactory results in this type of surgery.¹⁸ Thus, preoperative planning, failure mode identification and adequate treatment of bone defects are of fundamental importance for obtaining satisfactory and long-lasting clinical results in this type of surgery.^{18,19}

In this context, the identification of the cause of implant failure is significantly important for planning and obtaining satisfactory results.²⁰ Several series have demonstrated

changes in the causes of TKA failure over the years, possibly related to evolutions in implant design, as well as instrumental improvements.^{11,12} Thus, this study aims to identify the causes of RTKA in a reference center in Brazil.

Materials and Methods

This is a series of cases of patients undergoing RTKA at the Center for Specialized Attention in Knee Surgery of Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO) Jamil Haddad, in the period between August and November 2019 (CAAE-20309419.0.0000.5273.). There was no age limit, no restriction on the gender of the participants.

During the study period, 88 arthroplasty revision surgeries were performed. One patient underwent revision of the unicompartmental implant of the knee and was therefore excluded. Seven surgeries were excluded from the analysis because it was the second revision surgery. Thus, after the exclusion criteria, 80 surgeries (80 patients) were analyzed. The mean age of the patients in the procedures was 69.6 years (standard deviation (SD) = 9.85 years; variation = 29–87 years). Of these patients, 60.23% were female and 39.77% were male. The mean body mass index (BMI) was 30.23 kg/m² (SD = 5.92; variation = 18.20–42.46 kg/m²).

Arthroplasty review was defined as reoperation after performing primary TKA in which it was necessary to add or replace one or more prosthetic components. Thus, patients submitted to reoperations, however without the addition or replacement of one or more primary prosthetic components, were excluded from the analysis. Patients submitted to unicompartmental knee implant (UKI) revision surgery were also excluded from the analysis, as well as patients submitted to the second revision surgery.

The following data were collected from medical records: age, gender, and BMI. Laboratory tests with analysis of hem sedimentation velocity (HSV), C-reactive protein (CRP), and D-dimer were performed in all patients on the day before surgery, as well as range of motion measurement using a goniometer by the orthopedist in training in the knee surgery improvement course at the institution. Radiographs of the knee at anteroposterior incidences with bipodal, profile, and axial support in 30 degrees were performed on the day before surgery. During surgery, synovial fluid was collected for the following analyses: total leukocyte count, polymorphonuclear percentage, leukocyte esterase, and culture in a blood culture vial. Six samples of bone tissue were also collected for extended tissue culture for 14 days and 2 periprosthetic membrane samples for histopathological examination.

In the surgical report, the following information were analyzed: surgical access performed, implant system used, Anderson Orthopaedic Research Institute (AORI) classification of bone loss, use of trabeculated metal cones and/or tissue bank grafts for the treatment of defects.

Regarding the surgical access used, the surgery was performed by conventional medial parapatellar access in 70 surgeries (87.5%). Extended access was performed in 10 surgeries (12.5%), with tibia anterior tuberosity (TAT) osteot-

Table 1 Distribution of bone defects

Classification of defects	Tibia n (%)	Femur n (%)
Flawless	15 (20%)	16 (21.3%)
1	20 (26.7%)	15 (20%)
2a	19 (25.3%)	15 (20%)
2b	9 (12%)	8 (10.7%)
3	12 (16%)	21 (28%)

Source: Research data (INTO).

omy in 7 cases (8.75%), quadriceps turnout in two cases (2.5%), and clipping of the thigh reskin (snip) in one patient (1.25%).

Implants with two different systems—Legacy Constrained Condylar Knee (Zimmer Biomet, Warsaw, IN, USA) or Legion Revision Knee (Smith & Nephew plc, London, UK)—were used in 40 surgeries (50%). In 24 surgeries (30%), constrictor implants (Rotating Hinge Knee – Zimmer Biomet) were used. Spacers were implanted in 14 patients (17.5%). In 2 patients (2.5%), only patellar implants were used.

Medical documentation of bone defects was incomplete in five surgeries. Thus, when analyzing 75 patients, the presence of bone defects was identified in 70% of the patients. The distribution and classification of bone failures are shown in ►Table 1. Tantalum metaphysary cones were necessary for the treatment of bone defects in 21 patients (26.25%). Of these, tissue bank grafting was also used in nine surgeries. In all, the homologous graft was used in 13 patients (16.25%).

The cause of RTKA was defined by the surgeon responsible for the procedure based on the following criteria: all patients were submitted to evaluation according to the criteria of the 2018 International Consensus Meeting (ICM 2018).^{21,22} The diagnosis of periprosthetic infection was made when at least one of the major criteria was present, that is, the presence of a fistula communicating with the joint or presence of the same pathogen in two or more cultures of periimplant tissues. The diagnosis of periprosthetic infection using the lower criteria was confirmed when the score of the sum of the criteria was greater than or equal to six when the parameters of the tests recommended by the ICM 2018 were observed. In cases defined with aseptic failures, the surgeon in charge, after analysis of the physical examination, imaging and laboratory examinations defined the reason for failure between the following possible: ligament instability (when presence of dislocation or subluxation of prosthetic components, or when pathological ligament opening greater than 5 mm during physical examination, or ligament laxity greater than 5 mm in varus or varus stress tests during physical examination or ap radiographs of the knee with load), limitation of range of motion (when less than 50 degrees associated with physical disability declared by the patient), periprosthetic fracture, poor alignment, aseptic loosening, pain due to non-replacement of patellar cartilage, polyethylene wear, fracture of implants, or insufficiency of the extensor mechanism.

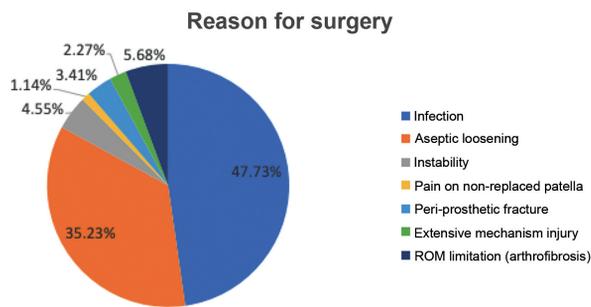


Fig. 1 Distribution of the causes of failure of total knee arthroplasty. Causa da Cirurgia = Reason for surgery, Infecção = Infection, Soltura Asséptica = Aseptic loosening, Instabilidade = Instability, Dor em patela não substituída = Pain on non-replaced patella, Fratura peri-prótética = Peri-prosthetic fracture, Lesão do mecanismo extensor = Extensive mechanism injury, Limitação da ADM (artrofibrose) = ROM limitation (arthrofibrosis)

Results

Periprosthetic joint infection (PJI) was the main cause of RTKA, corresponding to 47.73% of cases. The aseptic loosening of one or more components represented the second most frequent cause of failure, resulting in 35.23% of revisions. Limitation of the range of motion represented the 3rd most frequent cause, accounting for 5.68% of surgeries. Instability was the 4th most frequent cause of failure, occurring in 4.55% of patients. The other causes of revision were: peri-prosthetic fracture (3.41%), insufficiency due to rupture of the extensor mechanism (2.27%), pain attributed to non-replacement of patellar cartilage (1.14%) (► **Figure 1**).

Discussion

The main finding of our study was to identify that the main cause of failure in our series of primary TKAs was periprosthetic infection. Other reasons that led to the need for revision were, in decreasing order, aseptic loosening, limitation of the range of motion, and joint instability. Similarly, several recent studies have demonstrated periprosthetic infection as the most frequent mechanism of failure of primary prostheses, reaching 20 to 37.7% of surgeries.^{2,23-25} In the study by Evangelopoulos et al.,²⁴ periprosthetic infection was the main mechanism of failure with an incidence of 26.3%. However, when analyzing only patients submitted to the second revision surgery, the authors identified that the incidence of periprosthetic infection remained the most frequent reason for TKA failure with approximately 50% of cases. We believe that this high incidence of revisions due to septic failure observed in our study may have been influenced, at least partially, by the fact that the surgeries were performed in the COVID-19 pandemic period. In this scenario, in several months, only emergency surgeries were performed, such as acute periprosthetic infections and, consequently, subsequent increase in the demand for reimplantation after treatment of infection in two times.

Aseptic loosening represented the 2nd most frequent reason for implant failure in our series, occurring in approxi-

mately 35% of cases. Similarly, Bozic et al.⁷ demonstrated that periprosthetic infection and aseptic loosening were the two most frequent reasons for TKA revision. When analyzing more than 60,000 primary surgeries, the authors identified septic failure in 25.1% of patients and aseptic loosening in 16.7% of cases.⁷ Our results are in agreement with those of Koh et al.²⁶ and Evangelopoulos et al.,²⁴ who demonstrated aseptic loosening as the 2nd main cause of review, affecting, respectively, 32.7% and 25% of the failures. Siqueira et al.,¹ when analyzing the arthroplasty registry of five countries, identified aseptic loosening as the first cause of revision, affecting 30% of surgeries. Several other studies have also reported aseptic loosening as the main mechanism of TKA failure with incidence ranging from 24 to 44%.^{10,27,28} We identified that the incidence of aseptic loosening in our series is in accordance with the literature, although it is not the main mode of failure of our implants.

The limitation of the range of motion represented, in our series, the third most common indication for RTKA, with approximately 6% of surgeries. Similarly, in the study by Le et al., arthrofibrosis was the third most frequent indication for review, although the incidence presented corresponds to approximately three times that observed in our study. Pietrzak et al.¹¹ studied only the aseptic causes of revision and identified joint stiffness as the 2nd leading cause of revision with an incidence of 27.5%. Meanwhile, Le²⁹ and Koh et al.²⁶ showed an incidence that only 2.5% of patients required TKA revision due to functional limitation imposed by movement arc restriction. Such differences can be explained, at least partially, by the various definitions of joint stiffness, as well as being influenced by the functional demand and expectations of patients.³⁰⁻³² We should also observe that, in our series, we included only patients submitted to revision of prosthetic components; thus, patients submitted to manipulation under narcosis after TKA or even reoperation with joint release were not analyzed, which could have modified the incidence if we analyzed reoperations after knee prosthesis. In a study conducted in Brazil evaluating short-term complications (up to 1 year), the authors identified that joint stiffness was the most frequent complication affecting 7.5% of patients undergoing primary knee arthroplasty.³³

In our study, component instability represented the 4th cause of RTKA, with approximately 5% of surgeries. Other studies have demonstrated an incidence of instability ranging from 18.7 to 30%, constituting the 2nd or 3rd most frequent reason for TKA review.^{10,28,29} However, in the works of Kasahara et al.²⁷ and Koh et al.,²⁶ instability was identified in 9.3% and 6.5%, respectively. Post-TKA instability is usually indicated as a cause of early failure, that is, in implants with less than 2 years of evolution.^{6,11} Thus, the reduction in the number of elective primary surgeries performed during the study period, due to the restrictions imposed by the COVID-19 pandemic, may justify, at least partially, the limited number of revisions due to post-TKA instability. Another potential explanation can be attributed to the waiting time for this type of surgery in the Brazilian public health service. Thus, any

initial cases of instability can potentially evolve with loosening of the implants, thus hindering the primary diagnosis of component instability.

Despite the importance of our series reporting the distribution of the different causes of RTKA in the national scenario, our study has significant limitations. We believe that restrictions on elective surgeries imposed during part of the COVID-19 pandemic period may influence the incidence of some modes of failure, such as suspension of elective aseptic revisions in certain periods. Another important limitation refers to the retrospective nature of our analysis. Thus, several patients submitted to revision surgery had been operated on primarily in other hospitals. Thus, we had no control over the evolution time from the implantation of the components to the occurrence of failure requiring revision surgery, nor did we perform analyses of the different systems of primary prostheses implanted. Schroer et al.¹⁰ indicate that 35.3% of knee arthroplasties fail in the first 2 years after implantation, being more often related to factors influenced by the surgeon than by the performance of implants. However, we understand that such information is of high relevance for the planning of the Brazilian health system in view of the increase in the number of cases of RTKA, given, the impacts regarding the need for hospital beds, financial resources, and technical training of the teams. Similarly, we believe that the high number of revision surgeries performed due to septic failure observed in our series alerts us to the need to expand the measures to prevent these serious complications.

Therefore, we believe that the adoption of preventive measures of postoperative infection, such as: optimization of preoperative clinical conditions, adoption of risk stratification scores and investigation of patients colonized by *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* may impact on the reduction of the number of RTKA surgeries performed in our hospital.

Conclusions

We identified periprosthetic joint infection as the most frequent cause of RTKA. The other TKA failure mechanisms were, in decreasing order: aseptic loosening, limitation of the range of motion, and instability. Periprosthetic fracture and extensor mechanism insufficiency were less frequent causes of primary prosthesis revision in our series.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Financial Support

There was no financial support from public, commercial, or non-profit sources.

Referências

- Siqueira MBP, Klika AK, Higuera CA, Barsoum WK. Modes of failure of total knee arthroplasty: registries and realities. *J Knee Surg* 2015;28(02):127-138
- Mathis DT, Lohrer L, Amsler F, Hirschmann MT. Reasons for failure in primary total knee arthroplasty - An analysis of prospectively collected registry data. *J Orthop* 2020;23:60-66
- Geary MB, Macknet DM, Ransone MP, Odum SD, Springer BD. Why Do Revision Total Knee Arthroplasties Fail? A Single-Center Review of 1632 Revision Total Knees Comparing Historic and Modern Cohorts. *J Arthroplasty* 2020;35(10):2938-2943
- Rupp M, Walter N, Lau E, Worlicek M, Kurtz SM, Alt V. Recent trends in revision knee arthroplasty in Germany. *Sci Rep* 2021;11(01):15479
- Klug A, Gramlich Y, Rudert M, et al. The projected volume of primary and revision total knee arthroplasty will place an immense burden on future health care systems over the next 30 years. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2021;29(10):3287-3298
- Boelch SP, Jakuscheit A, Doerries S, et al. Periprosthetic infection is the major indication for TKA revision - experiences from a university referral arthroplasty center. *BMC Musculoskelet Disord* 2018;19(01):395
- Bozic KJ, Kurtz SM, Lau E, et al. The epidemiology of revision total knee arthroplasty in the United States. *Clin Orthop Relat Res* 2010;468(01):45-51
- 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 Joint Surg Am* 2007;89(04):780-785
- Kamath AF, Ong KL, Lau E, et al. Quantifying the Burden of Revision Total Joint Arthroplasty for Periprosthetic Infection. *J Arthroplasty* 2015;30(09):1492-1497
- Schroer WC, Berend KR, Lombardi AV, et al. Why are total knees failing today? Etiology of total knee revision in 2010 and 2011. *J Arthroplasty* 2013;28(8, Suppl):116-119
- Pietrzak J, Common H, Migaud H, Pasquier G, Girard J, Putman S. Have the frequency of and reasons for revision total knee arthroplasty changed since 2000? Comparison of two cohorts from the same hospital: 255 cases (2013-2016) and 68 cases (1991-1998). *Orthop Traumatol Surg Res* 2019;105(04):639-645
- Sharkey PF, Lichstein PM, Shen C, Tokarski AT, Parvizi J. Why are total knee arthroplasties failing today—has anything changed after 10 years? *J Arthroplasty* 2014;29(09):1774-1778
- 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 Joint Surg Am* 2015;97(09):715-720
- Meehan JP, Danielsen B, Kim SH, Jamali AA, White RH. Younger age is associated with a higher risk of early periprosthetic joint infection and aseptic mechanical failure after total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2014;96(07):529-535
- Jämsen E, Nevalainen P, Eskelinen A, Huotari K, Kalliovaara J, Moilanen T. Obesity, diabetes, and preoperative hyperglycemia as predictors of periprosthetic joint infection: a single-center analysis of 7181 primary hip and knee replacements for osteoarthritis. *J Bone Joint Surg Am* 2012;94(14):e101
- Morcos MW, Kooner P, Marsh J, Howard J, Lanting B, Vasarhelyi E. The economic impact of periprosthetic infection in total knee arthroplasty. *Can J Surg* 2021;64(02):E144-E148
- Boddapati V, Fu MC, Mayman DJ, Su EP, Sculco PK, McLawhorn AS. Revision Total Knee Arthroplasty for Periprosthetic Joint Infection Is Associated With Increased Postoperative Morbidity and Mortality Relative to Noninfectious Revisions. *J Arthroplasty* 2018;33(02):521-526
- Mozella AP, Cobra HAAB. Bone Defects in Revision Total Knee Arthroplasty. *Rev Bras Ortop* 2021;56(02):138-146
- Sheth NP, Bonadio MB, Demange MK. Bone Loss in Revision Total Knee Arthroplasty: Evaluation and Management. *J Am Acad Orthop Surg* 2017;25(05):348-357
- Pitta M, Esposito CI, Li Z, Lee YY, Wright TM, Padgett DE. Failure After Modern Total Knee Arthroplasty: A Prospective Study of 18,065 Knees. *J Arthroplasty* 2018;33(02):407-414

- 21 Schwarz EM, Parvizi J, Gehrke T, et al. 2018 International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection: Research Priorities from the General Assembly Questions. *J Orthop Res* 2019;37(05):997–1006
- 22 Parvizi J, Tan TL, Goswami K, et al. The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *J Arthroplasty* 2018;33(05):1309–1314.e2
- 23 Delanois RE, Mistry JB, Gwam CU, Mohamed NS, Choksi US, Mont MA. Current Epidemiology of Revision Total Knee Arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty* 2017;32(09):2663–2668
- 24 Evangelopoulos DS, Ahmad SS, Krismer AM, et al. Periprosthetic Infection: Major Cause of Early Failure of Primary and Revision Total Knee Arthroplasty. *J Knee Surg* 2019;32(10):941–946
- 25 Meyer JA, Zhu M, Cavadino A, Coleman B, Munro JT, Young SW. Infection and periprosthetic fracture are the leading causes of failure after aseptic revision total knee arthroplasty. *Arch Orthop Trauma Surg* 2021;141(08):1373–1383
- 26 Koh IJ, Cho WS, Choi NY, Kim TTKleos Korea Research Group. Causes, risk factors, and trends in failures after TKA in Korea over the past 5 years: a multicenter study. *Clin Orthop Relat Res* 2014;472(01):316–326
- 27 Kasahara Y, Majima T, Kimura S, Nishiike O, Uchida J. What are the causes of revision total knee arthroplasty in Japan? *Clin Orthop Relat Res* 2013;471(05):1533–1538
- 28 Mulhall KJ, Ghomrawi HM, Scully S, Callaghan JJ, Saleh KJ. Current etiologies and modes of failure in total knee arthroplasty revision. *Clin Orthop Relat Res* 2006;446(446):45–50
- 29 Le DH, Goodman SB, Maloney WJ, Huddleston JI. Current modes of failure in TKA: infection, instability, and stiffness predominate. *Clin Orthop Relat Res* 2014;472(07):2197–2200
- 30 Rutherford RW, Jennings JM, Levy DL, Parisi TJ, Martin JR, Dennis DA. Revision Total Knee Arthroplasty for Arthrofibrosis. *J Arthroplasty* 2018;33(7S):S177–S181
- 31 Cheuy VA, Foran JRH, Paxton RJ, Bade MJ, Zeni JA, Stevens-Lapsley JE. Arthrofibrosis Associated With Total Knee Arthroplasty. *J Arthroplasty* 2017;32(08):2604–2611
- 32 Thompson R, Novikov D, Cizmic Z, et al. Arthrofibrosis After Total Knee Arthroplasty: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Orthop Clin North Am* 2019;50(03):269–279
- 33 Carvalho LH Junior, Castro CAC, Gonçalves MJB, Rodrigues LCM, Lopes FL, Cunha FVP. Complicações de curto prazo da artroplastia total do joelho: avaliação de 120 casos. *Rev Bras Ortop* 2006;41(05):162–166



THIEME

Author Query Form (RBO/2200113en)

Special Instructions: Author please write responses to queries directly on proofs and then return back.

Q1: AU: Please confirm that given names (red), middle names (black) and surnames (green) have been identified correctly. Author names in bibliographic citations and online will appear as: Mozella AdP, Cobra HAdAB, Minamoto STN, Salim R, Leal AC. Causes of Revision of Total Knee Arthroplasties in a Tertiary Hospital in Brazil. Please confirm if this is correct.



THIEME

Revista Brasileira de Ortopedia

Acurácia dos marcadores sorológicos, do líquido sinovial, cultura microbiológica e exame histopatológico para o diagnóstico de infecção periprotética do joelho

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Acurácia dos marcadores sorológicos, do líquido sinovial, cultura microbiológica e exame histopatológico para o diagnóstico de infecção periprotética do joelho
Short Title:	
Article Type:	Original Study
Section/Category:	Clinical Section
Keywords:	artroplastia total de joelho, complicações pós-operatórias, infecção periprotética, biomarcadores.
Corresponding Author:	Alan de Paula Mozella, Mestre Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia – INTO Rio de Janeiro, RJ BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia – INTO
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Alan de Paula Mozella, Mestre
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Alan de Paula Mozella, Mestre
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	<p>Objetivo: avaliar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos testes sorológicos, dos marcadores do líquido sinovial, da cultura microbiológica de tecidos e do exame histopatológico para o diagnóstico de infecção periprotética do joelho. Material e métodos: Foi realizada análise do marcadores sorológicos (VHS, PCR e D-dímero), do líquido sinovial (contagem de leucócitos e percentual de polimorfonucleares), cultura de tecidos e exame histopatológico da membrana periprotética de todos os pacientes dos pacientes submetidos à revisão de ATJ entre novembro 2019 e dezembro 2021. Resultados: 62 pacientes foram diagnosticados com infecção periprotética do joelho, pelos critérios do International Consensus Meeting 2018 (grupo infecção) e 22 pacientes integraram o grupo não infecção. A sensibilidade e especificidade da VHS foram 83,6% e 45,4%, respectivamente. Os valores de sensibilidade e especificidade da PCR foram de 64,5% e 100% e as do D-dímero foram de 78,9% e 25%, respectivamente. A sensibilidade e especificidade da contagem de leucócitos foi de 75,6% e 100%, e a do percentual de polimorfonucleares foi de 33% e 100%, respectivamente. A sensibilidade e especificidade das culturas de tecidos periprotéticos foi de, respectivamente, 77,4% e 100%. A sensibilidade do exame histopatológico foi de 43,7% e a especificidade de 100%. Conclusões: A contagem total de leucócitos no líquido sinovial e as culturas microbiológicas dos tecidos periprotéticos foram os testes de maior acurácia para o diagnóstico de infecção periprotética em nossa série. O percentual de polimorfonucleares foi o teste de menor acurácia, em nosso estudo, para o diagnóstico de infecção periprotética.</p>
Additional Information:	
Question	Response
Please enter the Word Count of your	3019

Acurácia dos marcadores sorológicos, do líquido sinovial, cultura microbiológica e exame histopatológico para o diagnóstico de infecção periprotética do joelho

Alan de Paula Mozella¹, Hugo Alexandre de Araújo Barros Cobra¹, Sandra Tie Nishibe Minamoto¹, Rodrigo Salim², Ana Carolina Leal³

1. Médico ortopedista e traumatologista do Centro de Cirurgia do Joelho, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

2. Médico ortopedista e traumatologista do Departamento de Ortopedia e Anestesiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP-RP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

3. Pesquisadora da Divisão de Ensino e Pesquisa, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Trabalho desenvolvido no Centro de Cirurgia do Joelho, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Endereço para correspondência:

Alan de Paula Mozella

Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia – INTO

Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: apmozella@terra.com.br

ORCIDs

Alan de Paula Mozella - 0000-0001-5855-5808

Hugo Alexandre de Araújo Barros Cobra - 0000-0002-7315-0961

Sandra Tie Nishibe –0000-0001-8815-2161

Rodrigo Salim - 0000-22 0003-3978-4888

Ana Carolina Leal - 0000-0002-2556-3446

Acurácia dos marcadores sorológicos, do líquido sinovial, cultura microbiológica e exame histopatológico para o diagnóstico de infecção periprotética do joelho

Resumo

Objetivo: avaliar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos testes sorológicos, dos marcadores do líquido sinovial, da cultura microbiológica de tecidos e do exame histopatológico da membrana periprotética para o diagnóstico de infecção periprotética do joelho.

Material e métodos: estudo prospectivo, com pacientes submetidos à cirurgia de revisão de artroplastia total do joelho no período entre novembro de 2019 e dezembro de 2021. Foi realizada análise dos marcadores sorológicos (VHS, PCR e D-dímero), do líquido sinovial (contagem de leucócitos e percentual de polimorfonucleares), cultura de tecidos periprotéticos e exame histopatológico da membrana periprotética de todos os pacientes. **Resultados:** 62 pacientes foram diagnosticados com infecção periprotética do joelho, pelos critérios do *International Consensus Meeting 2018* (grupo infecção) e 22 pacientes integraram o grupo não infecção. A sensibilidade e especificidade da VHS foram de 83,6% e 45,4%, respectivamente. Os valores de sensibilidade e especificidade da PCR foram de 64,5% e 100% e as do D-dímero foram de 78,9% e 25%, respectivamente. A sensibilidade e especificidade da contagem de leucócitos foi de 75,6% e 100%, e a do percentual de polimorfonucleares foi de 33% e 100%, respectivamente. A sensibilidade e especificidade das culturas de tecidos periprotéticos foi de, respectivamente, 77,4% e 100%. A sensibilidade do exame histopatológico foi de 43,7% e a especificidade de 100%. **Conclusões:** A contagem total de leucócitos no líquido sinovial e as culturas microbiológicas dos tecidos periprotéticos foram os testes de maior acurácia para o diagnóstico de infecção periprotética em nossa série. O percentual de polimorfonucleares foi o teste de menor acurácia, em nosso estudo, para o diagnóstico de infecção periprotética.

Palavras chaves: artroplastia total de joelho, complicações pós-operatórias, infecção periprotética, biomarcadores.

Introdução

O diagnóstico acurado da infecção articular periprotética (IAP) é fundamental para a definição do tratamento e, conseqüentemente, para o resultado clínico. Entretanto, não existe, atualmente, um único exame ou biomarcador efetivo para confirmação diagnóstica^{1,2}, sendo o diagnóstico confirmado com base na avaliação de um conjunto de parâmetros laboratoriais e avaliação de espécimes clínicos obtidos durante a cirurgia^{2,3}.

A avaliação de marcadores sorológicos sistêmicos, como proteína C reativa (PCR), a velocidade de hemossedimentação (VHS) e D-dímero são, frequentemente, recomendados como a primeira linha de avaliação diagnóstica em pacientes com suspeita de infecção periprotética. Entretanto, o Consenso Internacional 2018 (ICM 2018) delimitou que resultados negativos desses testes sorológicos não excluem a possibilidade de IAP⁴⁻⁷.

A contagem de leucócitos e percentual de polimorfonucleares no líquido sinovial vem sendo apontada como os mais importantes para o diagnóstico de IAP^{8,9}. Entretanto, esses testes podem ser influenciado por outras causas de inflamação, reduzindo, assim, a acurácia desses parâmetros^{10,11}.

Assim, o objetivo desse estudo é avaliar a acurácia dos marcadores sorológicos, dos parâmetros do líquido sinovial, das culturas microbiológica e do exame histopatológico para o diagnóstico de infecção periprotética do joelho conforme os critérios preconizados pelo ICM 2018.

Material e métodos

Foi realizado um estudo prospectivo, com todos os pacientes

submetidos à cirurgia de revisão de artroplastia total do joelho em um único hospital terciário, no período compreendido entre novembro de 2019 e dezembro de 2021. Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP nº 20309419.0.0000.5273), os voluntários confirmaram a sua participação no estudo após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os critérios de exclusão são demonstrados na **tabela 1**.

Após a aplicação dos critérios de exclusão, permaneceram no estudo 84 pacientes de ambos os gêneros, com idade entre 57 e 87 anos.

No dia anterior à cirurgia, foram coletadas amostras de sangue periférico de todos os pacientes para realização de exames sorológicos, os quais incluía velocidade de hemossedimentação (VHS), Proteína C reativa (PCR) e D-dímero.

Anestesia raquidiana associada a bloqueio de nervo periférico foram realizadas em todos os pacientes. Após exsanguinação do membro e colocação dos campos cirúrgicos, foi realizada a coleta de líquido sinovial (LS) por artrocentese com agulha 20G imediatamente antes da incisão cirúrgica. Nos casos em que não foi possível a coleta de LS nesse momento, uma segunda tentativa foi realizada por visualização direta após realização do acesso cirúrgico.

Alíquotas de 1 a 2 mL de LS foram acondicionadas em tubo de coleta de sangue à vácuo, contendo EDTA para a realização da contagem total de leucócitos e a identificação do percentual de polimorfonucleares. A citometria global e específica do LS foi realizada por método automatizado em aparelho Cell Dyn 3700 SL (Abbott).

Entre 3 a 5 mL de LS foram inoculadas em um tubo de hemocultura para aeróbio, objetivando a realização de cultura microbiológica por 14 dias.

Após a remoção dos componentes protéticos, foram coletadas as seguintes amostras para análise microbiológica: três amostras de tecido ósseo femoral, três amostras de tecido ósseo tibial e um fragmento de membrana periprotética. Para a análise histopatológica foi coletada uma amostra de membrana periprotética do fêmur e uma amostra da membrana periprotética da tíbia. O exame histopatológico foi realizado, sendo considerados positivos para infecção quando identificado 5 ou mais leucócitos em 5 campos de grande aumento (400x), conforme critério ICM 2018.

Os fragmentos ósseos foram acondicionados em tubos estéreis, sendo adicionado 1 mL de soro fisiológico 0,9% e enviadas ao laboratório de microbiologia para a realização de culturas microbiológica por 14 dias.

Para o exame histopatológico, um ou dois fragmentos de membrana periprotética foram coletados e armazenados em frasco contendo formol a 10%.

O grupo com infecção articular periprotética do joelho (grupo infecção) foi constituído por pacientes que apresentaram confirmação do diagnóstico devido a: i) identificação de crescimento do mesmo patógeno em duas ou mais culturas de tecidos periprotéticos, ii) presença de fístula e iii) apresentaram nota igual ou maior que 6, quando avaliados pelo algoritmo proposto pelo Consenso Internacional de 2018.

As análises descritivas para os dados quantitativos foram analisadas e apresentadas na forma médias, acompanhadas dos respectivos desvios padrão (DP), medianas, valores mínimos e máximos. As variáveis categóricas foram expressas através de suas frequências e porcentagens. Para comparar os

parâmetros que apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste t-Student. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste não-paramétrico Mann Whitney. As variáveis categóricas foram analisadas com o teste de Qui Quadrado ou Exato de Fisher quando necessário. Todas as análises foram realizadas no software Med Calc e GraphPad Prism. O valor de p será considerado significativo quando menor que 0,05.

Resultados

Após avaliação dos dados clínicos e exames laboratoriais, 84 pacientes submetidos à cirurgia de RATJ ou investigação de falha de ATJ foram avaliados quanto ao diagnóstico de IAP de acordo com os critérios propostos pelo ICM 2018. Dessa forma, 62 pacientes foram diagnosticados com IAP e compuseram o grupo infecção e 22 integraram o grupo não infecção. As características demográficas de ambos os grupos estão resumidas na **Tabela 2**.

Dentre os pacientes com IAP, 23% apresentaram resultado negativo para a cultura microbiológica. O perfil microbiológico dos pacientes com IAP que apresentaram resultado positivo na cultura microbiológica está representado no **Gráfico 1**. As infecções monomicrobianas representaram 79% dos casos. Em 24% das culturas foram identificados germes gram negativos e o patógeno mais frequentemente identificado foi o *Staphylococcus aureus*, presente em 26% das amostras.

A avaliação do VHS foi realizada em 22 pacientes do grupo não infecção e 55 do grupo infecção. A mediana deste parâmetro foi significativamente maior no grupo infecção, com mediana de 62 mm/h (IIQ: 39– 93), em relação ao grupo

não infecção, que apresentou média de 36 mm/h (IIQ: 18 – 50,25, $p=0,0021$) **(Figura 1A)**.

Identificamos que 54,5% (12/22) dos pacientes do grupo não infecção apresentaram valor de VHS superior ao ponto de corte do critério ICM 2018. No grupo infecção, 16,4% (9/55) dos pacientes apresentaram valor de VHS abaixo do valor de corte. Dessa forma, os valores de sensibilidade e especificidade da VHS foram: 83,6% e 45,4%, respectivamente.

Em relação à quantificação de PCR no plasma, a mediana do grupo infecção foi 2,3 mg/dL (IIQ: 0,6 – 7,5) e do grupo não infecção foi de 0,1 mg/dL (IIQ: 0,1 – 0,12), diferença estatisticamente significativa ($p = 0,03$) **(Figura 1B)**.

Identificamos que nenhum dos pacientes do grupo não infecção apresentou níveis de PCR superiores ao ponto de corte do critério ICM 2018. Já no grupo infecção, 35,4% (22/62) dos pacientes apresentaram níveis abaixo do ponto de corte. Assim, os valores de sensibilidade e especificidade da PCR foram: 64,5% e 100%, respectivamente.

Em relação à quantificação do D-dímero no plasma, a mediana do grupo infecção foi 2,8 mg/dL (IIQ: 0,9 – 5,4) e do grupo não infecção foi de 1,3 mg/dL (IIQ: 0,7 – 1,9), diferença estatisticamente significativa ($p = 0,03$) **(Figura 1C)**.

Identificamos que 75% (12/16) dos pacientes do grupo não infecção apresentaram nível de D-dímero superior ao ponto de corte do critério ICM 2018. Já no grupo infecção, 21% (8/38) dos pacientes apresentaram níveis abaixo do ponto de corte. Os valores de sensibilidade e especificidade do D-dímero foram: 78,9% e 25%, respectivamente.

A quantificação de leucócitos no LS foi realizada em 63 pacientes, sendo 41 do grupo infecção e 22 do grupo não infecção. A mediana do grupo infecção

foi 12275 células/ μ L (IIQ: 2350 - 35050), sendo, significativamente, maior que a mediana do grupo não infecção, que foi de 355 células/ μ L (IIQ: 239 – 776, $p < 0,0001$) (**Figura 2A**).

Utilizando os pontos de corte sugeridos pelo ICM 2018, observamos que nenhum paciente do grupo não infecção apresentou resultado positivo para este teste, enquanto 24% (10/41) dos pacientes do grupo infecção apresentaram níveis abaixo do ponto de corte. Dessa forma, encontramos valores de sensibilidade e especificidade de 75,6% e 100%, respectivamente.

O percentual de PMN foi avaliado em 61 pacientes, sendo 39 do grupo infecção e 22 do grupo não infecção. Para avaliação do percentual de polimorfonucleares no líquido sinovial, foi usado o ponto de corte de 90% para os casos com menos de noventa dias após a cirurgia e de 80% para os casos com mais de noventa dias de pós-cirúrgico, como preconizado pelo ICM 2018.

Identificamos que nenhum paciente do grupo não infecção apresentou percentual de PMN no sinovial superior aos limites do critério, contudo, 66% (26/39) dos pacientes do grupo infecção apresentaram percentual de PMN inferiores ao limite para o diagnóstico de infecção.

A mediana do percentual de PMN no grupo infecção foi 40% (IIQ: 20 – 87) e no grupo não infecção foi de 18% (IIQ: 8,7 – 27), sendo significativamente maior no grupo infecção ($p = 0,0001$) (**Figura 2B**). Os valores de sensibilidade e especificidade foram 33% e 100%, respectivamente.

A sensibilidade e especificidade de duas ou mais culturas de tecidos periprotéticos foi de, respectivamente, 77,4% e 100%.

A sensibilidade do exame histopatológico para o diagnóstico de IAP foi de 43,7% e especificidade de 100%.

A **tabela 3** descreve a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos testes sorológicos, marcadores do líquido sinovial, cultura microbiológica de tecidos e exame histopatológico da membrana periprotética para o diagnóstico de infecção periprotética.

Discussão

A importância desse estudo consiste na identificação da sensibilidade e especificidade de cada um dos testes diagnósticos de infecção periprotética do joelho na população brasileira. O Consenso Internacional de 2018 para diagnóstico de infecção periprotética delimitou a função da VHS, PCR e D-dímero na investigação de IAP. Resultados negativos desses testes sorológicos, entretanto, não excluem a possibilidade do paciente apresentar IAP⁴⁻⁷, haja vista que esses marcadores apresentam-se elevados em qualquer tipo de inflamação e infecção, comprometendo, assim, a sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da IAP. Desse modo, valores dentro da faixa de normalidade não são capazes de excluir infecção periprotética^{10,12,13,14,15}. Assim, torna-se importante avaliar esses parâmetros diagnósticos na população brasileira.

Pérez-Prieto *et al.* demonstraram que um terço das infecções periprotéticas apresentavam PCR dentro da normalidade e que dois terços desses também apresentavam VHS dentro da normalidade¹⁶. Em nosso estudo 16% dos pacientes com infecção periprotética apresentavam VHS dentro da normalidade e, entre os pacientes com falhas assépticas de prótese, 54% apresentavam VHS superior aos valores para o diagnóstico de IAP.. Em recente metanálise, Carli *et al.* evidenciaram sensibilidade de 79% e especificidade de 81,6% para a VHS, enquanto que a sensibilidade e especificidade foram,

respectivamente, 81,3% e 84,5% para o PCR ^{10,14}. Em nosso estudo, a especificidade da VHS foi drasticamente inferior à apresentada por Carli *et al.* Em relação ao PCR, nossa série apresentou sensibilidade similar à metanálise de Carli *et al.*, mas a especificidade foi expressivamente maior (84,5% versus 100%). Acreditamos que tais diferenças possam ser explicadas, pelo menos parcialmente, por diferenças no perfil microbiológico das infecções nas diferentes séries, haja vista que o perfil de virulência do patógeno pode apresentar relação com o padrão de resposta inflamatória do hospedeiro.

A concentração do D-dímero tem sido investigada como potencial biomarcador para o diagnóstico ^{9,17}. Entretanto, o D-dímero não é um marcador específico de infecção ⁹. No estudo de Shahi *et al.* a sensibilidade e especificidade do D-dímero foi de, respectivamente, 89,4% e 92,7% ¹⁸. Outros autores, entretanto, demonstraram sensibilidade 64,5% a 68% e especificidade de 50,7% a 65% ¹⁹⁻²¹. Em nosso estudo, observamos que a sensibilidade do D-dímero encontra-se dentro da variação descrita, contudo, identificamos especificidade significativamente inferior aos relatados na literatura. Desse modo, acurácia desse teste sorológico somente foi superior ao do percentual de polimorfonucleares e do exame histopatológico em nossa série.

De forma similar, os marcadores do líquido sinovial podem ser influenciados pelo sistema imunológico do hospedeiro e, também, pelo uso prévio de antimicrobianos ^{9,10,22}. A contagem de células brancas no LS pode estar aumentada em pacientes portadores de artrite reumatoide, naqueles com fratura periprotética e, também, em pacientes no período pós-operatório precoce de ATJ^{10,22-25}. Assim, acreditamos que esses testes do líquido sinovial podem

apresentar variável sensibilidade e especificidade para a confirmação do diagnóstico em diferentes populações.

Recente metanálise evidenciou que a contagem de leucócitos apresenta sensibilidade de 92,5% e especificidade de 90,1% para o diagnóstico de infecção periprotética crônica¹⁰. Outros autores demonstraram sensibilidade e especificidade de, respectivamente, 83% e 94%¹⁴. Desse modo, identificamos que nossos resultados quanto à contagem de leucócitos encontra-se em concordância com a literatura^{10,14,23,24}. Esse teste, apresentou, portanto, boa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de IAP.

A sensibilidade da percentagem de polimorfonuclear para o diagnóstico de IAP varia de 78% a 87,8%, enquanto a especificidade variou de 90,7 a 93%.^{10,14} Nossos resultados confirmam que esse teste apresenta elevada especificidade, sendo de 100% em nossa série, entretanto, identificamos sensibilidade significativamente inferior (33%) ao descrito na literatura. Vários estudos identificaram heterogeneidade funcional intrínseca no conjunto de neutrófilos humanos em condições fisiológicas e patológicas^{26,27}. Assim, acreditamos que a epidemiologia e virulência dos patógenos possa influenciar no recrutamento e ativação dessas células e, conseqüentemente, acarretar variabilidade desse parâmetro.

Estudos recentes demonstraram ampla variação da sensibilidade das culturas microbiológicas para o diagnóstico de IAP, variando de 44,6% a 97,5%. Em nosso estudo a sensibilidade foi de 77,4%^{10,28}. Acreditamos que tal variação nos resultados das culturas microbiológicas sejam justificadas, pelo menos parcialmente pela falta de padronização dos processos laboratoriais e meios de

cultura, além da falta de consenso sobre qual o tecido peri-implante mais sensível e, portanto, mais indicado para a realização de culturas.

Recente metanálise avaliando a acurácia dos testes diagnósticos para infecção periprotética crônica evidenciou que sensibilidade e especificidade do histopatológico considerando 5 PMN por campo de grande aumento foi de 95,6% e 76,6%, com sensibilidade de 72%. Quando o limite de 10 PMN por campo de grande aumento foi considerado a sensibilidade foi de 94,2%, a especificidade de 73,9% e a acurácia 68% ¹⁰. Em nosso estudo, a sensibilidade desse teste foi significativamente inferior, acreditamos que tais diferenças decorram de variações relacionadas ao treinamento do observador.

Esse estudo apresenta algumas limitações. O reduzido número de pacientes com falhas assépticas incluídos no estudo foi devido o fato de que parte do período de análise coincidiu com a pandemia de Covid-19, no qual observamos redução do número de cirurgias, sobretudo eletivas. Outra limitação refere-se a perdas de análise de alguns dos marcadores. Esse fato pode ser explicado, pelo menos parcialmente, pela desestruturação dos processos de atendimento durante a pandemia de Covid-19 e necessidade de abordagem de urgência de alguns pacientes. Por fim, apesar de apenas 17% dos pacientes de nossa amostra apresentarem doença inflamatória crônica, não realizamos avaliação da influencia dessas patologias sobre os parâmetros de diagnóstico de infecção periprotética. Desse modo, entendemos que estudos futuros com maior número de pacientes e avaliação de subpopulações, assim como avaliação da correlação com os patógenos e da cronicidade da infecção se fazem necessários.

Conclusões

A contagem total de leucócitos no líquido sinovial e as culturas microbiológicas dos tecidos periprotéticos foram os testes de maior acurácia para o diagnóstico de infecção periprotética. O percentual de polimorfonucleares e o exame histopatológico foram os testes de menor acurácia, em nosso estudo, para o diagnóstico de infecção periprotética.

Referências:

1. Fuchs M, Trampuz A, Kirschbaum S, Winkler T, Sass FA. Soluble Pecam-1 as a Biomarker in Periprosthetic Joint Infection. *J Clin Med*. 2021;10(4):612.
2. 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*. 2020;103-B(1):18–25.
3. Izakovicova P, Borens O, Trampuz A. Periprosthetic joint infection: current concepts and outlook. *EFORT Open Rev*. 2019;4(7):482–94.
4. Li C, Renz N, Trampuz A, Ojeda-Thies C. Twenty common errors in the diagnosis and treatment of periprosthetic joint infection. *Int Orthop*. 2020;44(1):3–14.
5. Parvizi J, Tan TL, Goswami K, Higuera C, Della Valle C, Chen AF, et al. The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *J Arthroplasty*. 2018;33(5):1309-1314.e2.
6. Villa JM, Pannu TS, Piuze N, Riesgo AM, Higuera CA. Evolution of Diagnostic Definitions for Periprosthetic Joint Infection in Total Hip and Knee Arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2020;35(3):S9–13.
7. Schwarz EM, Parvizi J, Gehrke T, Aiyer A, Battenberg A, Brown SA, et al. 2018 International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection: Research Priorities from the General Assembly Questions. *J Orthop Res*. 2019;37(5):997–1006.
8. Yan CH, Arciola CR, Soriano A, Levin LS, Bauer TW, Parvizi J. Team Approach: The Management of Infection After Total Knee Replacement. *JBJS Rev*. 2018;6(4):e9.
9. Wasterlain AS, Goswami K, Ghasemi SA, Parvizi J. Diagnosis of Periprosthetic Infection: Recent Developments. *J Bone Joint Surg Am*. 2020;102(15):1366–75.

10. Carli AV, Abdelbary H, Ahmadzai N, Cheng W, Shea B, Hutton B, et al. Diagnostic Accuracy of Serum, Synovial, and Tissue Testing for Chronic Periprosthetic Joint Infection After Hip and Knee Replacements: A Systematic Review. *J Bone Jt Surg.* 2019;101(7):635–49.
11. Iorio R, Viglietta E, Mazza D, Petrucca A, Borro M, Iolanda S, et al. Accuracy and Cost-Effectiveness of a Novel Method for Alpha Defensins Measurement in the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infections. *J Arthroplasty.* 2021;36(9):3275–81.
12. Tubb CC, Polkowski GG, Krause B. Diagnosis and Prevention of Periprosthetic Joint Infections. *JAAOS - J Am Acad Orthop Surg.* 2020;28(8):e340.
13. Sharma K, Ivy M, Block DR, Abdel MP, Hanssen AD, Beauchamp C, et al. Comparative analysis of 23 synovial fluid biomarkers for hip and knee periprosthetic joint infection detection. *J Orthop Res.* 2020;38(12):2664–74.
14. Kheir MM, Tan TL, Shohat N, Foltz C, Parvizi J. Routine Diagnostic Tests for Periprosthetic Joint Infection Demonstrate a High False-Negative Rate and Are Influenced by the Infecting Organism: *J Bone Jt Surg.* 2018;100(23):2057–65.
15. Uvodich ME, Dugdale EM, Osmon DR, Pagnano MW, Berry DJ, Abdel MP. The effectiveness of laboratory tests to predict early postoperative periprosthetic infection after total knee arthroplasty. *Bone Jt J.* 2021;103-B(6 Supple A):177–84.
16. Pérez-Prieto D, Portillo ME, Puig-Verdié L, Alier A, Martínez S, Sorlí L, et al. C-reactive protein may misdiagnose prosthetic joint infections, particularly chronic and low-grade infections. *Int Orthop.* 2017;41(7):1315–9.
17. Palan J, Nolan C, Sarantos K, Westerman R, King R, Foguet P. Culture-negative periprosthetic joint infections. *EFORT Open Rev.* 2019;4(10):585–94.
18. Shahi A, Kheir MM, Tarabichi M, Hosseinzadeh HRS, Tan TL, Parvizi J. Serum D-Dimer Test Is Promising for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection and Timing of Reimplantation: *J Bone Jt Surg.* 2017;99(17):1419–27.
19. Li R, Shao HY, Hao LB, Yu BZ, Qu PF, Zhou YX, et al. Plasma Fibrinogen Exhibits Better Performance Than Plasma D-Dimer in the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: A Multicenter Retrospective Study. *J Bone Jt Surg.* 2019;101(7):613–9.
20. Pan L, Wu H, Liu H, Yang X, Meng Z, Cao Y. Fibrinogen performs better than D-dimer for the diagnosis of periprosthetic joint infection: a meta-analysis of diagnostic trials. *J Orthop Surg [Internet].* 9 de janeiro de 2021 [citado 27 de março de 2021];16. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7796531/>

21. Xu H, Xie J, Huang Q, Lei Y, Zhang S, Pei F. Plasma Fibrin Degradation Product and D-Dimer Are of Limited Value for Diagnosing Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*. 2019;34(10):2454–60.
22. Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhave A, Mont MA. Periprosthetic joint infection. *The Lancet*. 2016;387(10016):386–94.
23. Chisari E, Parvizi J. Accuracy of blood-tests and synovial fluid-tests in the diagnosis of periprosthetic joint infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2020;18(11):1135–42.
24. Balato G, Franceschini V, Ascione T, Lamberti A, Balboni F, Baldini A. Diagnostic accuracy of synovial fluid, blood markers, and microbiological testing in chronic knee prosthetic infections. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2018;138(2):165–71.
25. Izakovicova P, Borens O, Trampuz A. Periprosthetic joint infection: current concepts and outlook. *EFORT Open Rev*. 2019;4(7):482–94.
26. Filep JG, Ariel A. Neutrophil heterogeneity and fate in inflamed tissues: implications for the resolution of inflammation. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2020;319(3):C510–32.
27. Deniset JF, Kubes P. Neutrophil heterogeneity: Bona fide subsets or polarization states? *J Leukoc Biol*. 2018;103(5):829–38.
28. Muñoz-Mahamud E, Molinas I, Lozano L, Bosch J, Morata L, Combalia A, et al. Usefulness of Culturing the Periprosthetic Membrane or Neosynovium for the Diagnosis of Infection During Hip and Knee Revision Arthroplasty. *JAAOS - J Am Acad Orthop Surg*. 2018;26(20):e442.

Tabela 1 Critérios de exclusão

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO
- Recusa em assinar o TCLE
- Revisão de artroplastia unicompartmental
- Informações insuficientes para confirmação ou exclusão diagnóstico infecção
- Utilização de medicações antibióticas no período de 15 dias prévios
- Portadores de doenças infecciosas bacteriana ativas

Tabela 2 Distribuição dos dados demográficos.

	Não infecção	Infecção
n	22	62
Sexo, n (%)		
Feminino	11 (50 %)	23 (37 %)
Masculino	11 (50 %)	39 (63 %)
Idade (anos), média (± DP)	71,2 (± 7,9)	68,9 (± 8,7)
IMC (kg/m²), média (± DP)	26,9 (± 10,4)	27,4 (± 9,9)
Diabetes, n (%)	5 (23 %)	12 (19 %)
Doença inflamatória, n (%)	3 (14 %)	11 (18 %)
Implante prévio, n (%)		
Prótese primária	18 (82 %)	38 (61 %)
Revisão	4 (19 %)	18 (29 %)
Frequência de eventos característicos de infecção, n (%)		
Fístula	0	16 (25 %)
≥ 2 culturas positivas	0	46 (74 %)
Purulência intraoperatória	0	11 (18 %)
Tempo entre a colocação da prótese e a infecção, n (%)		
≤ 3 meses	1 (5 %)	23 (37 %)
3 – 12 meses	2 (9 %)	7 (11 %)
> 12 meses	19 (86 %)	32 (52 %)

^a teste T, ^b teste exato de Fischer, n: número de pacientes, IMC: índice de massa corporal

Tabela 3 Performance diagnóstica dos marcadores de infecção periprotética do joelho.

	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia
PCR	64,5 %	100%	100 %	50 %	73,8 %
VHS	83,6 %	45,4 %	79,3 %	52,6 %	72,7 %
D-dímero	78,9 %	25 %	71,4 %	33,3 %	62,9 %
Leucócitos LS	75,6 %	100 %	100 %	68,7 %	84,1 %
% PMN LS	33 %	100 %	100 %	45,8 %	57,3 %
Histopatológico	43,7 %	100 %	100 %	43,7 %	60,8 %
Cul. Microbiol. (≥ 2)	77,4 %	100%	100 %	61,1 %	83,3 %

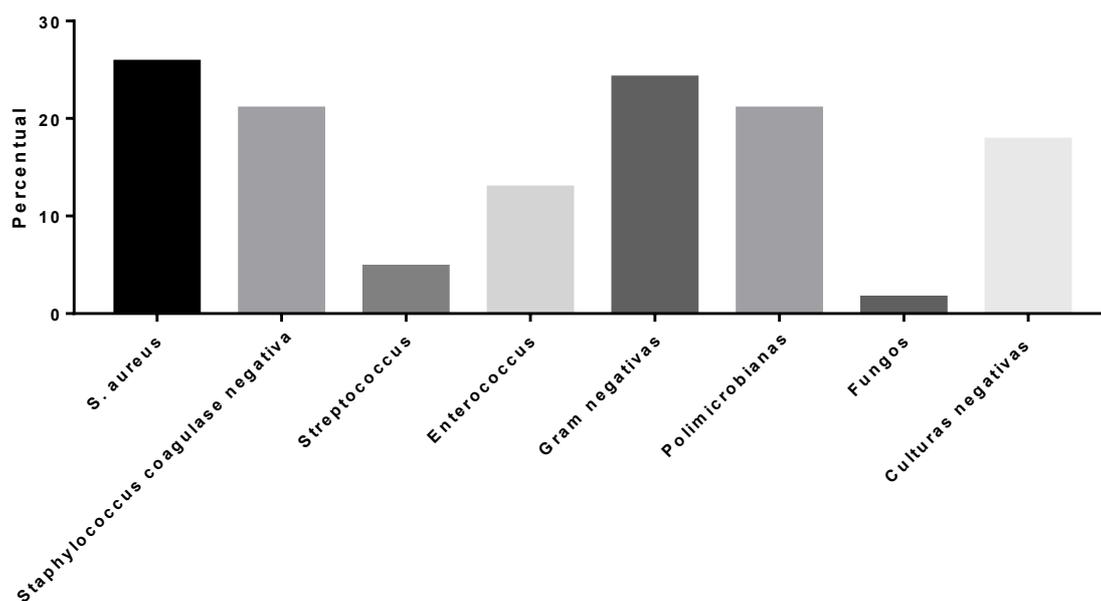


Figura 1 Perfil microbiológico dos pacientes com infecção articular periprotética.

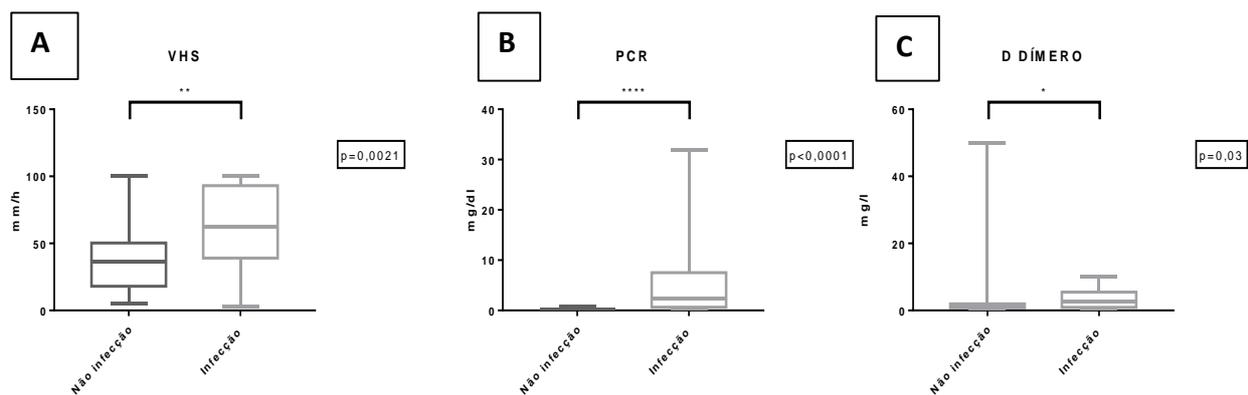


Figura 2 (A) Velocidade de hemossedimentação dos pacientes do grupo infecção e grupo não infecção. ** $p=0,0021$. **(B) Proteína C reativa** dos pacientes do grupo infecção e grupo não infecção. * $p<0,0001$. **(C) D-dímero.** O D-dímero dos pacientes do grupo infecção e grupo não infecção. * $p=0,03$. Teste Mann Whitney.

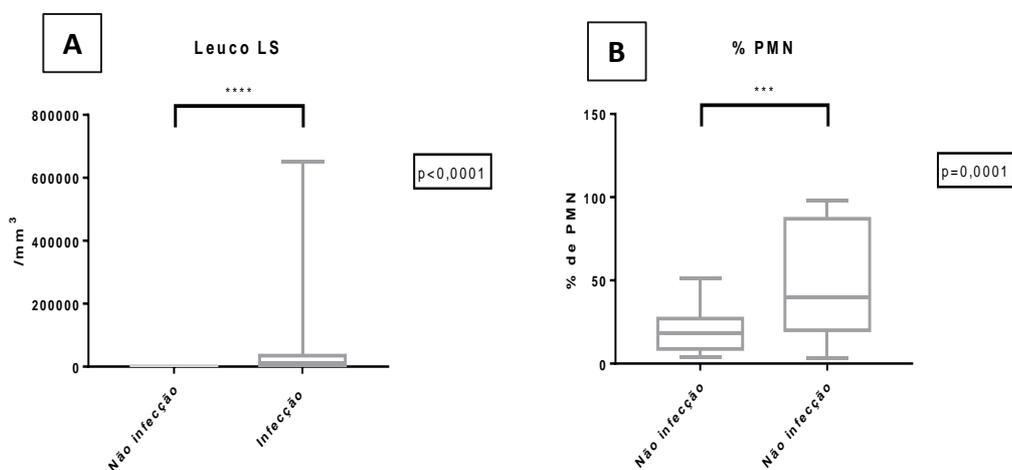


Figura 3 (A) Contagem de células brancas no líquido sinovial dos pacientes do grupo infecção e do grupo não infecção. **(B) Percentual de células polimorfonucleares no líquido sinovial** dos pacientes do grupo infecção e no grupo não infecção. * $p<0,0001$. Teste Mann Whitney.

Date: Sep 01, 2022
To: "Alan de Paula Mozella" apmozella@terra.com.br
From: "Revista Brasileira de Ortopedia" rbo@sbot.org.br
Subject: Ref.: Ms. No. RBO-D-22-00112R2 Perfil microbiológico das infecções periprotéticas do joelho em um hospital do Sistema único de Saúde especializado em cirurgias ortopédicas de alta complexidade

Ref.: Ms. No. RBO-D-22-00112R2

Perfil microbiológico das infecções periprotéticas do joelho em um hospital do Sistema único de Saúde especializado em cirurgias ortopédicas de alta complexidade
Revista Brasileira de Ortopedia

Dear Dr. Mozella,

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department. Meanwhile, you will be asked to complete a number of online forms required for publication. If we need additional information from you during the production process, we will contact.

Thank you for submitting your work to Revista Brasileira de Ortopedia. We hope you consider us again for future submissions.

Kind regards,

Sergio L. Checchia
Editor-in-Chief
Revista Brasileira de Ortopedia

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/rbo/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

Revista Brasileira de Ortopedia

Perfil microbiológico das infecções periprotéticas do joelho em um hospital do Sistema único de Saúde especializado em cirurgias ortopédicas de alta complexidade --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Perfil microbiológico das infecções periprotéticas do joelho em um hospital do Sistema único de Saúde especializado em cirurgias ortopédicas de alta complexidade
Short Title:	
Article Type:	Original Study
Section/Category:	Clinical Section
Keywords:	artroplastia total de joelho; complicações pós-operatórias; infecção periprotética
Corresponding Author:	Alan de Paula Mozella, Mestre Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia – INTO Rio de Janeiro, RJ BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia – INTO
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Alan de Paula Mozella, Mestre
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Alan de Paula Mozella, Mestre Thales Nunes de Assunção, Médico Hugo Alexandre de Araújo Barros Cobra, Mestre Sandra Tie Nishibe Minamoto, Mestre Rodrigo Salim, Doutor Ana Carolina Leal, Doutora
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	<p>Resumo</p> <p>Objetivo</p> <p>identificar o perfil microbiológico das infecções periprotéticas do joelho tratadas em um hospital terciário brasileiro.</p> <p>Metodologia</p> <p>estudo prospectivo, com pacientes submetidos à cirurgia de revisão de artroplastia total do joelho em um único hospital terciário, no período compreendido entre novembro de 2019 e dezembro de 2021.</p> <p>Resultados</p> <p>62 pacientes foram diagnosticados com infecção periprotética (IAP) pelos critérios do International Consensus 2018. Culturas monomicrobianas foram identificados em 79% e polimicrobianas em 21% dos casos. A bactéria mais frequentemente identificada nas culturas microbiológicas de tecidos e líquido sinovial foi o <i>Staphylococcus aureus</i>, presente em 26% dos pacientes com infecção periprotética.</p>

	<p>IAP com culturas negativas ocorreram em 23% dos pacientes.</p> <p>Conclusão</p> <p>Nossos resultados evidenciam: i) alta prevalência de bactérias do gênero <i>Staphylococcus</i> como causadores da IAP do joelho; ii) a alta incidência de infecções polimicrobianas nas infecções precoces e iii) a limitada sensibilidade dos testes microbiológicos para identificação das infecções.</p>
Additional Information:	
Question	Response
Please enter the Word Count of your manuscript	1955

Perfil microbiológico das infecções periprotéticas do joelho em um hospital do Sistema único de Saúde especializado em cirurgias ortopédicas de alta complexidade

Alan de Paula Mozella^a *

Thales Nunes de Assunção^b

Hugo Alexandre de Araújo Barros Cobra^a

Sandra Tie Nishibe Minamoto^a

Rodrigo Salim^c

Ana Carolina Leal^d

a – Centro de Cirurgia do Joelho, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), Rio de Janeiro, Brasil.

b – Médico especializando em Cirurgia do Joelho, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), Rio de Janeiro, Brasil.

c – Departamento de Ortopedia e Anestesiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP-RP), São Paulo, Brasil.

d – Divisão de Ensino e Pesquisa, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), Rio de Janeiro, Brasil.

*autor correspondente:

Alan de Paula Mozella - apmozella@terra.com.br / ORCID: 0000-0001-5855-5808

Thales Nunes de Assunção – thalesnunes@gmail.com / ORCID 0000-0003-0612-1172

Hugo Alexandre de Araújo Barros Cobra - cobra.hugo@gmail.com / ORCID: 0000-0002-7315-0961

Sandra Tie Nishibe – sandra.tie@yahoo.com /ORCID: 0000-0001-8815-2161

Rodrigo Salim - rodsalim@gmail.com / ORCID: 0000-22 0003-3978-4888

Ana Carolina Leal – leal.carol@gmail.com / ORCID: 0000-0002-2556-3446

Tabela 1: Critérios de exclusão

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO
- Recusa em assinar o TCLE
- Revisão de artroplastia unicompartmental
- Reimplantes em pacientes com espaçadores (2º tempo)
- Impossibilidade de coleta de líquido sinovial
- Informações insuficientes para confirmação ou exclusão diagnóstico infecção
- Utilização de medicações antibióticas no período de 15 dias prévios à cirurgia
- Portadores de outras doenças infecciosas bacteriana ativas
- Portadores de Síndrome de imunodeficiência adquirida

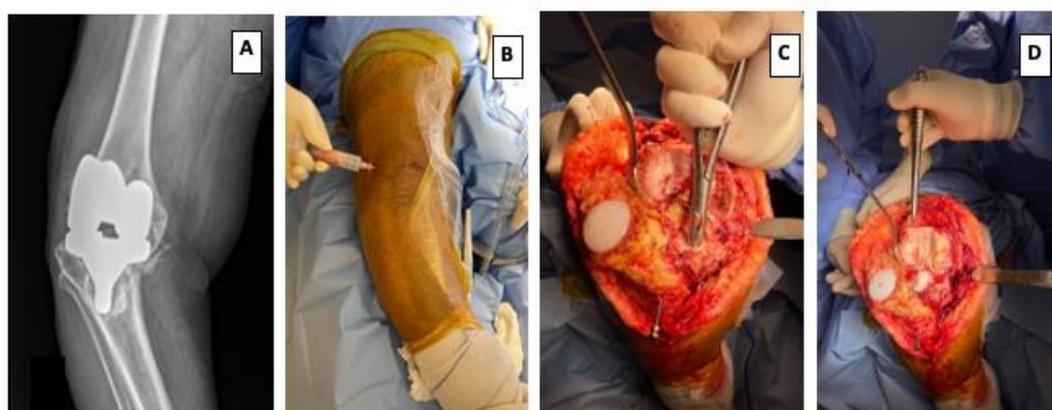


Figura 1. Procedimento cirúrgico e coleta de materiais biológicos. (A) Radiografia anterior-posterior do joelho direito evidenciando falha da artroplastia total do joelho; (B) Após a colocação dos campos estéreis foi realizada a artrocentese antes da incisão cirúrgica para evitar contaminação do líquido sinovial por sangue, (C) Coleta de amostras de tecido ósseo periprotético para análise microbiológica, (D) Coleta de membrana periprotética para análise histopatológica.

Quadro 1. Algoritmo para diagnóstico da infecção periprotética proposto pelo *International Consensus Meeting 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

Tabela 2. Distribuição dos dados demográficos.

Variável	Infecção
n	62
Sexo, n (%)	
Feminino	23 (37 %)
Masculino	39 (63 %)
Idade (anos), média (± DP)	68,9 (± 8,7)
IMC (kg/m²), média (± DP)	27,4 (± 9,9)
Diabetes, n (%)	12 (19 %)
Doença inflamatória, n (%)	11 (18 %)
Implante prévio, n (%)	
Prótese primária	38 (61 %)
Revisão	18 (29 %)
Frequência de eventos característicos de infecção, n (%)	
Fístula	16 (25 %)
≥ 2 culturas positivas	46 (74 %)
Tempo entre a colocação da prótese e revisão, n (%)	
≤ 3 meses	23 (37 %)
3 – 12 meses	9 (15 %)
> 12 meses	30 (48 %)

n: número de pacientes, IMC: índice de massa corporal

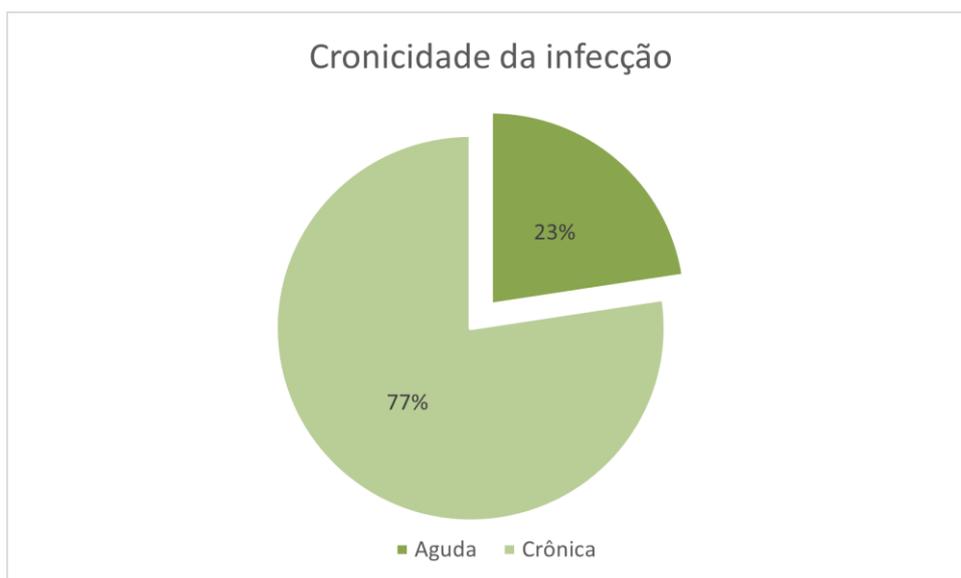


Figura 2 : Distribuição dos pacientes portadores de IAP aguda e crônica.

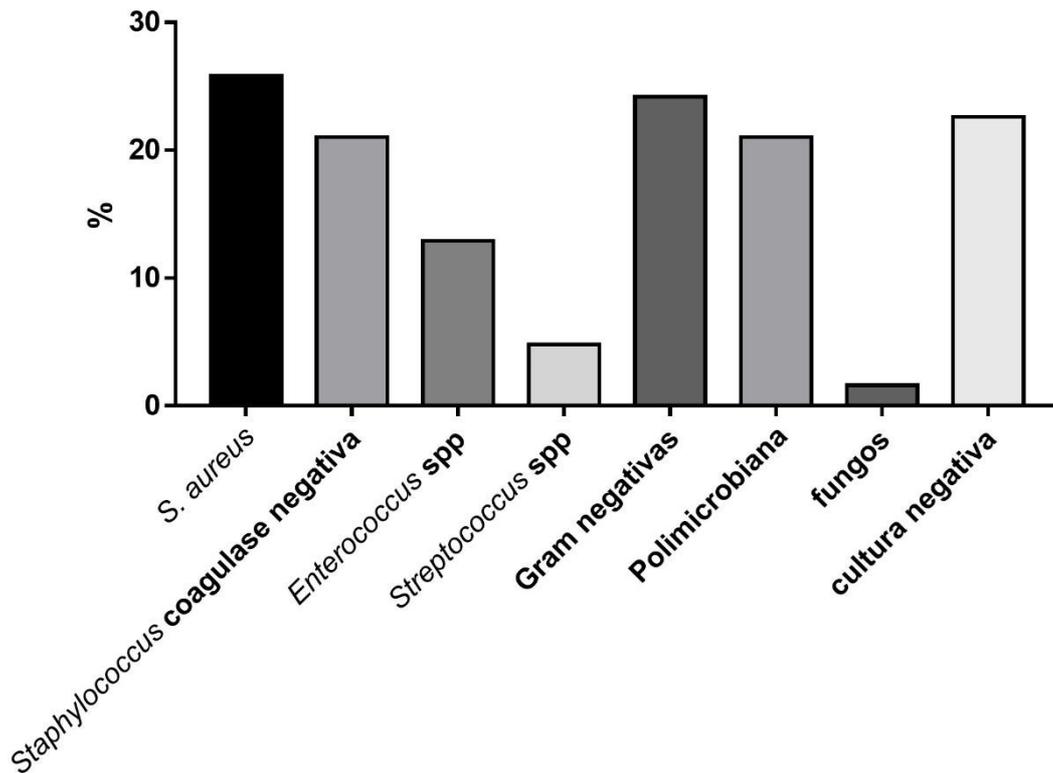


Figura 3: Distribuição dos patógenos identificados em cultura.

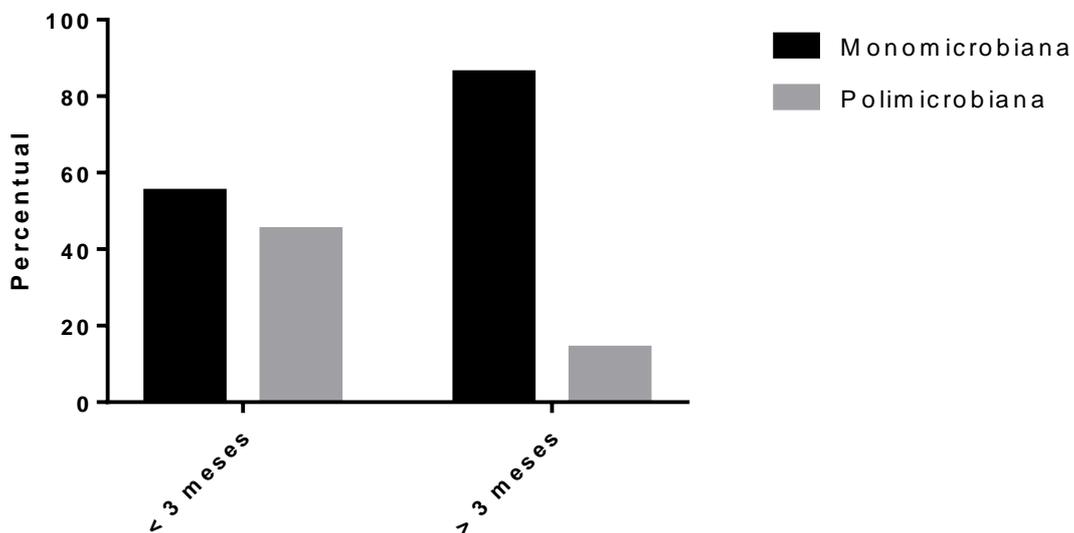


Figura 4. Frequência de infecções mono ou polimicrobianas em relação ao tempo entre a cirurgia prévia e a revisão da ATJ.

Perfil microbiológico das infecções periprotéticas do joelho em um hospital do Sistema único de Saúde especializado em cirurgias ortopédicas de alta complexidade

Resumo

Objetivo: identificar o perfil microbiológico das infecções periprotéticas do joelho tratadas em um hospital terciário brasileiro. **Metodologia:** estudo prospectivo, com pacientes submetidos à cirurgia de revisão de artroplastia total do joelho em um único hospital terciário, no período compreendido entre novembro de 2019 e dezembro de 2021. **Resultados:** 62 pacientes foram diagnosticados com infecção periprotética (IAP) pelos critérios do *International Consensus* 2018. Culturas monomicrobianas foram identificados em 79% e polimicrobianas em 21% dos casos. A bactéria mais frequentemente identificada nas culturas microbiológicas de tecidos e líquido sinovial foi o *Staphylococcus aureus*, presente em 26% dos pacientes com infecção periprotética. IAP com culturas negativas ocorreram em 23% dos pacientes. **Conclusão:** Nossos resultados evidenciam: i) alta prevalência de bactérias do gênero *Staphylococcus* como causadores da IAP do joelho; ii) a alta incidência de infecções polimicrobianas nas infecções precoces e iii) a limitada sensibilidade dos testes microbiológicos para identificação das infecções.

Palavras chaves: artroplastia total de joelho, complicações pós-operatórias, infecção periprotética.

Introdução

A infecção articular periprotética (IAP) representa uma complicação grave com incidência variando de 1 a 4% após artroplastias primárias, contudo, podendo alcançar 5 a 15% nos pacientes de alto risco e naqueles submetido à cirurgia de revisão. Assim, a infecção periprotética é, atualmente, em muitas séries, a principal causa de revisão da moderna artroplastia do joelho (1–3).

O diagnóstico precoce e a identificação do patógeno são fundamentais para o tratamento adequado e erradicação da infecção. Entretanto, o diagnóstico de IAP, frequentemente, representa um desafio, devido às diferentes formas de apresentação clínica e a inexistência de um único teste clínico capaz de confirmar ou excluir essa complicação. Assim, desde 2011, diversas Sociedades propuseram critérios para a padronização do diagnóstico de IAP (4–6).

Esses critérios permitem a confirmação diagnóstica de infecção periprotética mesmo em pacientes com cultura microbiológicas negativas. Entretanto, a identificação do patógeno é, ainda hoje, princípio fundamental para o tratamento destas infecções (5,7). Dessa forma, o objetivo deste estudo é caracterizar o perfil microbiológico das infecções periprotéticas do joelho tratadas em um hospital terciário brasileiro.

Material e métodos

Participantes do estudo

Foi realizado um estudo prospectivo, unicêntrico, com pacientes submetidos à cirurgia de revisão de artroplastia total do joelho (RATJ), no período compreendido entre novembro de 2019 e dezembro de 2021, e que tiveram o diagnóstico de infecção periprotética confirmado de acordo com critérios do *International Consensus Meeting (ICM) 2018*. Após aprovação pelo Comitê de

Ética em Pesquisa (nº 20309419.0.0000.5273), os voluntários confirmaram a sua participação no estudo após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os critérios de exclusão são demonstrados na **tabela 1**.

Após a aplicação dos critérios de exclusão, permaneceram no estudo 62 pacientes com diagnóstico de infecção periprotética do joelho.

Procedimento cirúrgico e coleta das amostras biológicas

No dia anterior à cirurgia, foi coletada amostra de sangue periférico de todos os pacientes para exames sorológicos da rotina pré-operatório da instituição, a qual incluía velocidade de hemossedimentação (VHS), proteína C reativa (PCR) e D-dímero.

Todos os pacientes foram submetidos à anestesia raquidiana associada a bloqueio de nervo periférico. Todos os procedimentos foram realizados sob isquemia com o manguito pneumático inflado com pressão de 100 mmHg superior à pressão arterial sistólica.

Após exsanguinação do membro e colocação dos campos cirúrgicos, foi realizada a coleta de líquido sinovial (LS) por artrocentese com agulha 20G, isto é, sem acesso cirúrgico e, também, sem bloqueio anestésico local adicional, com objetivo de minimizar a possibilidade de contaminação do líquido sinovial por sangue ou agentes contaminantes (**Figura 1**). Nos casos em que não foi possível a coleta de LS nesse momento, uma segunda tentativa foi realizada por visualização direta após realização do acesso cirúrgico parapatelar medial.

Alíquotas de 1 a 2 mL de LS foram acondicionadas em tubo de coleta de sangue à vácuo, contendo EDTA e enviadas, imediatamente, para o laboratório, para a realização da contagem total de células brancas e identificação do percentual de polimorfonucleares. A citometria global e específica do LS foi realizada por método automatizado em aparelho Cell Dyn 3700 SL (Abbott).

Alíquota de 3 a 5 mL de LS foram inoculadas em um tubo de hemocultura para aeróbio e, caso possível, 3 a 5 mL do LS foram, também, inoculados em um tubo de hemocultura para anaeróbio. Os tubos de hemocultura foram, imediatamente, enviados para realização de cultura microbiológica. Todas as amostras foram cultivadas por 14 dias.

Após a remoção dos componentes protéticos, foram coletadas as seguintes amostras para análise microbiológica: três amostras de tecido ósseo femoral, três amostras de tecido ósseo tibial e um fragmento de membrana periprotética. Nos casos em que não foi possível a coleta de fragmento de membrana periprotética, foi coletada uma amostra de partes moles peri implantes. Para a análise histopatológica foi coletada uma amostra de membrana periprotética do fêmur e uma amostra da membrana periprotética da tíbia. Antibioticoterapia somente foi iniciado após a coleta de todas as amostras biológicas.

Os fragmentos ósseos foram acondicionados em tubos estéreis e adicionado 1 mL de soro fisiológico 0,9%. As amostras foram, imediatamente, enviadas ao para realização de culturas microbiológica. Todas as amostras foram cultivadas por 14 dias.

Para o exame histopatológico, um ou dois fragmentos de membrana periprotética foram coletados e armazenados em frasco contendo formol a 10%.

As membranas foram classificadas de acordo com os parâmetros propostos por Morawietz et al. em 2009 (8).

Definição do diagnóstico e formação dos grupos

A confirmação do diagnóstico de IAP foi realizado de acordo com o critério do ICM 2018: i) identificação de crescimento do mesmo patógeno em duas ou mais culturas de tecidos periprotéticos ou ii) presença de fístula, são consideradas critérios maiores e, quando presentes, são suficientes para a confirmação do diagnóstico. Além disso, foram considerados infectados os pacientes que apresentaram nota igual ou maior que 6, quando avaliados pelo algoritmo proposto (Quadro 1).

Análise estatística

As análises descritivas para os dados quantitativos foram analisadas e apresentadas na forma de médias, acompanhadas dos respectivos desvios padrão (DP), medianas, valores mínimos e máximos. As variáveis categóricas foram expressas através de suas frequências e porcentagens. As variáveis categóricas foram analisadas com o teste de Qui Quadrado ou Exato de Fisher quando necessário. Todas as análises foram realizadas no software Med Calc e GraphPad Prism. O valor de p foi considerado significativo quando menor que 0,05.

Resultados

População de estudo

Após avaliação dos dados clínicos e exames laboratoriais, 84 pacientes submetidos à cirurgia de RATJ foram avaliados quanto ao diagnóstico de IAP de acordo com os critérios propostos pelo *International Consensus Meeting* (ICM),

em 2018. Dessa forma, 62 pacientes foram diagnosticados com IAP e incluídos no estudo. As características demográficas destes pacientes estão resumidas na Tabela 2.

Os pacientes do grupo infecção foram avaliados segundo a classificação temporal (30 dias), conforme **Figura 2**.

Identificação dos patógenos

As culturas microbiológicas apresentaram resultados positivos, que permitiram a identificação dos patógenos, em 77% (48 pacientes) dos casos. Culturas monomicrobianas foram identificadas em 79% e polimicrobianas em 21% dos casos. IAP com culturas negativas ocorreram em 23% dos pacientes.

Em 24% das culturas foram identificados patógenos gram negativos. Considerando apenas as infecções monomicrobianas, as infecções causadas exclusivamente por germes gram positivos ocorreram em 86% dos pacientes e gram negativos em 14%. A bactéria mais frequentemente identificada nas culturas microbiológicas de tecidos periprotéticos e líquido sinovial foi o *Staphylococcus aureus*, presente em 26% dos pacientes com infecção periprotética. As bactérias identificadas nas culturas microbiológicas dos pacientes com IAP e a frequência com que foram identificadas estão descritas na **Figura 3**.

Quando avaliadas apenas os pacientes que apresentaram resultados positivo na cultura microbiológica, identificamos que as infecções

polimicrobianas foram, significativamente, mais frequentes nos pacientes com infecção precoce, ou seja, aquelas que ocorreram até 3 meses após a cirurgia, em relação aos pacientes que apresentaram infecções intermediárias ou tardia ($p=0,02$) (**Figura 4**). A distribuição de pacientes com IAP com culturas negativas foram similares entre as infecções agudas, intermediária e crônica.

Discussão

Embora o risco de infecção periprotética pós artroplastia de joelho seja baixo, o aumento exponencial no número de ATJ realizadas anualmente torna esta complicação um problema importante e cada vez mais frequente.

Os critérios para o diagnóstico de infecção periprotética de acordo com o *International Consensus Meeting* de 2018 possibilitem a confirmação diagnóstica mesmo na ausência de culturas positivas, entretanto, a identificação dos patógenos permanece sendo princípio fundamental para o diagnóstico e adequado tratamento das doenças infecciosas bacterianas, assim como, para a escolha dos antibióticos mais apropriados. Neste contexto, um dos grandes desafios relacionados aos ensaios microbiológicos é a sensibilidade, uma vez que é reportado que a cultura microbiológica falha em identificar o agente causador da infecção periprotética em 5 a 45% dos casos (9–11). As culturas negativas impõem enorme desafio para o tratamento da infecção periprotética, uma vez que a falta de identificação do patógeno conduz ao uso empírico de antimicrobianos com potencial não cobertura do verdadeiro agente infectante e são associados a 4,5 vezes maior risco de reinfecção quando comparados com casos de culturas positivas (12,13,14). Dessa forma, nossos resultados evidenciam o perfil microbiológico nas infecções periprotéticas do joelho tratadas

em um hospital terciário brasileiro especializado em cirurgia ortopédica de alta complexidade.

Em nossa casuística, o patógeno mais frequentemente identificado foi o *S. aureus*, seguido por *Staphylococcus coagulase negativa*. Tal resultado é consistente com o reportado em outras séries, onde as infecções causadas por estes patógenos podem representar de 50 a 60 % dos casos (15,16). As infecções polimicrobianas representaram 21% dos casos, sendo mais comuns nas infecções precoces. Cobo *et al.* encontraram resultado similar, com incidência de 32% de infecções polimicrobianas em indivíduos com IAP precoce. Outros estudos, também, corroboram este achado, e sugerem que essa maior frequência de infecções polimicrobianas em infecções precoces possivelmente reflete a inoculação de múltiplos microrganismos no momento da cirurgia ou disseminação contígua a partir da incisão cirúrgica (15,17,18).

Em um estudo conduzido por Tan *et al.*, a incidência suspeitada de infecção periprotética com cultura negativa foi de 22%, obedecendo os critérios diagnósticos *Musculoskeletal Infection Society* (MSIS), a incidência de infecções com culturas negativas foi de 6,4% (10). Pelo ICM 2018, a verdadeira incidência de infecção periprotética com culturas negativa varia entre 7% a 15% (11). Tais resultados reforçam a importância de diferenciar se as infecções periprotéticas com culturas negativas são realmente negativas ou se são falso negativo, isto é, os testes diagnósticos falharam em identificar o microrganismo, mas existe infecção no implante (11).

Os principais fatores que contribuem para a cultura negativa são: (1) administração de antibioticoterapia prévia à coleta de amostras para cultura, (2) meio de cultura inadequado para germes atípicos ou aqueles encapsulados em

biofilme, (3) inadequado manuseio e transporte das amostras, (4) tempo de incubação inadequado sobretudo para germes raros e indolentes, (5) limitado número de amostras ou inadequada coleta de tecidos, (6) atraso no transporte para o laboratório, (7) infecção com organismo de baixo virulência (9–11). É importante ressaltar que, diferentemente do observado em outras áreas do diagnóstico microbiológico, não há padronização dos métodos de cultivo para o diagnóstico da IAP. O ICM 2018 recomenda que durante as cirurgias de revisão sejam coletados, no mínimo, três e idealmente cinco ou mais amostras de tecido peri-implante para a realização de culturas, além da amostra de líquido sinovial. Entretanto, não existe consenso quanto ao tipo de tecido sólido mais adequado para ser utilizado na realização de culturas convencionais. Dessa forma, fica evidente a necessidade de estudos que busquem a padronização dos métodos de cultura de forma a otimizar a eficiência deste exame (17).

Em nossa casuística aproximadamente um quarto dos pacientes apresentaram resultado negativo na cultura biológica. O diagnóstico de infecção nestes pacientes somente foi possível devido a avaliação de outros exames que compõem o critério diagnóstico proposto pelo ICM. Estudos apontam que os cirurgiões tendem a minimizar a IAP, e a realizar avaliações incompletas para confirmar o diagnóstico (19). Além disso, é sabido que na rotina dos hospitais públicos brasileiro, muitos destes exames não estão disponíveis. Entretanto, diante deste cenário, ressaltamos a importância da adoção de uma rotina criteriosa de avaliação dos pacientes que apresentam ferida secretiva persistente ou uma articulação quente, inchada ou dolorosa, com o objetivo de excluir ou confirmar o diagnóstico de IAP, possibilitando no diagnóstico precoce e maior efetividade no tratamento.

Este estudo apresenta como limitações o fato de não ter sido avaliado o perfil de resistência a antibióticos das bactérias identificadas, e o fato de ter sido realizado no período da pandemia, o que pode ter impactado no perfil dos pacientes atendidos no instituto.

Conclusão

Nossos resultados evidenciam: i) alta prevalência de bactérias do gênero *Staphylococcus* como causadores da IAP do joelho; ii) a alta incidência de infecções polimicrobianas nas infecções precoces e iii) IAP com culturas negativas ocorre em, aproximadamente, um quarto dos pacientes.

Referências

1. Delanois RE, Mistry JB, Gwam CU, Mohamed NS, Choksi US, Mont MA. Current Epidemiology of Revision Total Knee Arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty*. 2017;32(9):2663–8.
2. Evangelopoulos DS, Ahmad SS, Krismer AM, Albers CE, Hoppe S, Kleer B, et al. Periprosthetic Infection: Major Cause of Early Failure of Primary and Revision Total Knee Arthroplasty. *J Knee Surg*. 2019;32(10):941–6.
3. Meyer JA, Zhu M, Cavadino A, Coleman B, Munro JT, Young SW. Infection and periprosthetic fracture are the leading causes of failure after aseptic revision total knee arthroplasty. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2021;141(8):1373–83.
4. 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*. 2020;103-B(1):18–25.
5. Parvizi J, Tan TL, Goswami K, Higuera C, Della Valle C, Chen AF, et al. The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *J Arthroplasty*. 2018;33(5):1309-1314.e2.
6. Schwarz EM, Parvizi J, Gehrke T, Aiyer A, Battenberg A, Brown SA, et al. 2018 International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection: Research Priorities from the General Assembly Questions. *J Orthop Res*. 2019;37(5):997–1006.
7. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-Joint Infections. *N Engl J Med*. 2004;351(16):1645–54.

8. 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*. 2009;54(7):847–53.
9. Kalbian I, Park JW, Goswami K, Lee Y-K, Parvizi J, Koo K-H. Culture-negative periprosthetic joint infection: prevalence, aetiology, evaluation, recommendations, and treatment. *Int Orthop*. 2020;44(7):1255–61.
10. Tan TL, Kheir MM, Shohat N, Tan DD, Kheir M, Chen C, et al. Culture-Negative Periprosthetic Joint Infection. *JBJS Open Access [Internet]*. 12 de julho de 2018 [citado 3 de novembro de 2020];3(3). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6242327/>
11. Palan J, Nolan C, Sarantos K, Westerman R, King R, Foguet P. Culture-negative periprosthetic joint infections. *EFORT Open Rev*. 2019;4(10):585–94.
12. Tarabichi M, Shohat N, Goswami K, Alvand A, Silibovsky R, Belden K, et al. Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: The Potential of Next-Generation Sequencing. *J Bone Joint Surg Am*. 2018;100(2):147–54.
13. Drago L, Clerici P, Morelli I, Ashok J, Benzakour T, Bozhkova S, et al. The World Association against Infection in Orthopaedics and Trauma (WAIOT) procedures for Microbiological Sampling and Processing for Periprosthetic Joint Infections (PJIs) and other Implant-Related Infections. *J Clin Med*. 2019;8(7):E933.
14. Bémer P, Léger J, Tandé D, Plouzeau C, Valentin AS, Jolivet-Gougeon A, et al. How Many Samples and How Many Culture Media To Diagnose a Prosthetic Joint Infection: a Clinical and Microbiological Prospective Multicenter Study. *J Clin Microbiol*. 2016;54(2):385–91.
15. Tande AJ, Patel R. Prosthetic Joint Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(2):302–45.
16. Peel TN, Cheng AC, Buising KL, Choong PFM. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(5):2386–91.
17. Rieber H, Frontzek A, Heinrich S, Breil-Wirth A, Messler J, Hegermann S, et al. Microbiological diagnosis of polymicrobial periprosthetic joint infection revealed superiority of investigated tissue samples compared to sonicate fluid generated from the implant surface. *Int J Infect Dis*. 2021;106:302–7.
18. Tsai Y, Chang C-H, Lin Y-C, Lee S-H, Hsieh P-H, Chang Y. Different microbiological profiles between hip and knee prosthetic joint infections. *J Orthop Surg Hong Kong*. 2019;27(2):2309499019847768.

19. Li, C., Renz, N., Trampuz, A. et al. Twenty common errors in the diagnosis and treatment of periprosthetic joint infection. *International Orthopaedics (SICOT)*, 2020; 44, 3–14.