Corso di Aggiornamento

Educazione professionale degli operatori tecnico-commerciali della sanità
II edizione - 3 febraio 2007

LE INFEZIONI in CHIRUGIA ORTOPEDICA fra

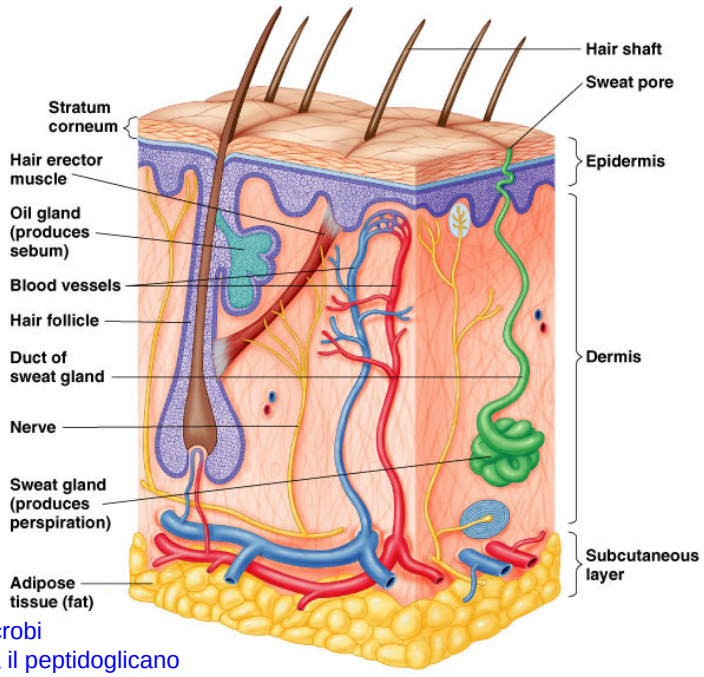
TUTELA del PAZIENTE e SICUREZZA degli OPERATORI

news & views in microbiologia:aggiornamento microbiologico

prof. Oliviero E. Varnier
Sezione di Microbiologia - Facoltà di Medicina e Chirurgia -Università di Genova

PowerPoint Lecture Slide Presentation prepared by Oliviero E. Varnier

Cute



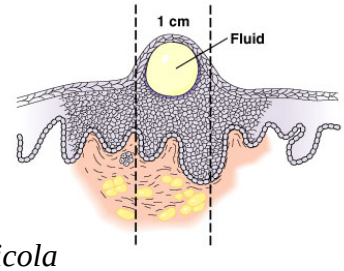
- Sali inibiscono i microbi
- Il Lisozima idrolizza il peptidoglicano
- Gli acidi grassi inibiscono alcuni patogeni

MEMBRANE MUCOSE

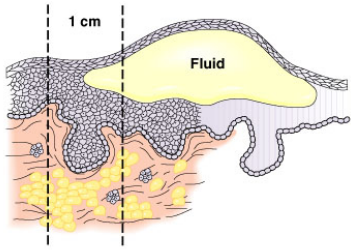
- Cellule epiteliali attaccate ad una matrice extracellulare
- Le cellule secernono muco
- Alcune hanno le cilia

3

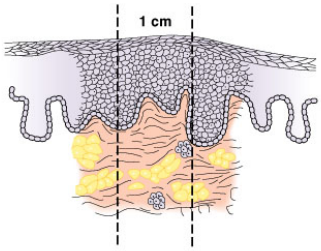
Malattie Microbiche della Cute



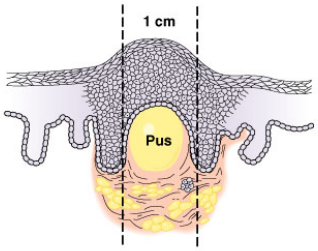
vescicola



bolla



macula



Pustola (papula)

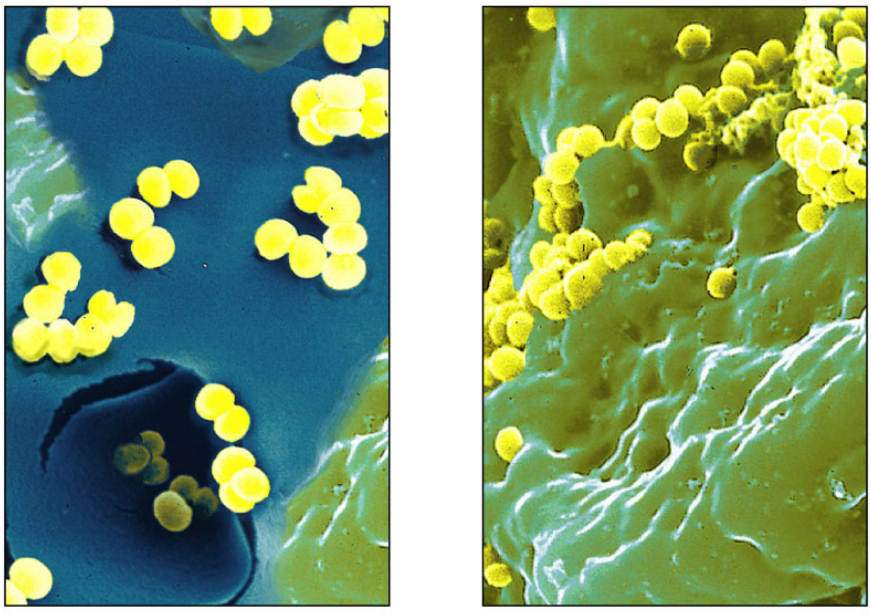
CONSIDERAZIONI

1. **L**e infezioni sono complicazioni **rare** ma talvolta **devastanti** in ortopedia

2. **1 – 2%** degli interventi chirurgici ortopedici possono avere delle sequele infettive con una mortalità che raggiunge l'**8%** nei pazienti più anziani *(Am J Med 1990; Infect Dis Clin Pract 1998)*

5

Infezioni Stafilococciche della Cute



(a) (b)

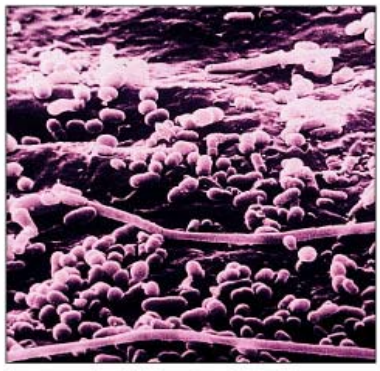
Infezioni Cutanee da Stafilococco

- ***S. epidermidis***
  - Cocchi gram-positivi, coagulasi-**negativi**
- ***Staphylococcus aureus***
  - Cocchi gram-positivi, coagulasi-**positivi**
  - Leucocidina
  - Tossina esfoliativa

7

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Gli stafilococchi aurei sono gli agenti più frequenti delle **infezioni cutanee (foruncoli, favi),** che iniziano a livello delle ghiandole sebacee e dei follicoli piliferi, in conseguenza della produzione da parte dei batteri di numerosi **enzimi lipolitici** che consentono, da una parte, l'eliminazione di alcuni componenti dei **lipidi cutanei** (sebo) dotati di **azione antimicrobica** e dall'altra l'utilizzazione di alimenti e i lipidi stessi come **sorgente di energia** metabolica.



Stafilococchi Gram-positivi, resistenti ai Sali, Micrococci, Difteroidi

8

INFEZIONI STAFILOCCICHE della CUTE

ESOTOSSINE: 4 tossine citolitiche ed emolitiche: emolisina **alfa, beta, gamma** e **delta.**

LEUCOCIDINA: uccide i globuli bianchi. *In vivo* i ceppi patogeni produttori si replicano attivamente all'interno delle cellule.

TOSSINA ESFOLIATIVA O EPIDERMOLITICA causa la sindrome della cute ustionata (**scalded skin syndrome** = necrolisi epidermica acuta), che colpisce quasi esclusivamente i bambini della prima infanzia ed è caratterizzata dallo scollamento spontaneo di ampie zone di strati superficiali di epidermide necrotica, causato dalla rottura dei desmosomi.

9

INFEZIONI STREPTOCOCCICHE della CUTE

- Erisipela

- Impetigine

INFEZIONI INVASIVE da STREPTOCOCCO di GRUPPO A

- Streptochinasi
- Ialuronidasi
- Esotossina A, superantigene
- Cellulite
- Fascite Necrotizzante

ARTRITI

- **Infezione di una articolazione**,**ovvero** una **infiltrazione microbica dello spazio interno alla capsula articolare.**

  I principali segni di infiammazione sono:

  - la perdita dell'ampiezza del movimento,
  - la tumefazione,
  - il dolore dell'articolazione colpita e
  - talvolta la febbre.

- ***La DIAGNOSI DI LABORATORIO***

  si avvale dell'esame colturale del liquido articolare torbido o purulento, aspirato con puntura dall'articolazione colpita (artrocentesi), che consentirà di definire l'eziologia dell'infezione.

- **Il TRATTAMENTO** si basa su:

  - la somministrazione di antibiotici
  - la rimozione chirurgica dei tessuti colpiti

12

ARTRITI

- Le **artriti più comuni** sono dovute a patogeni **BATTERICI** che colpiscono generalmente una singola articolazione,

  mentre quelle **VIRALI** colpiscono in genere più articolazioni:

  - virus dell'epatite B, prevalente
  - virus della rosolia, dell'influenza e della parotite in misura minore

13

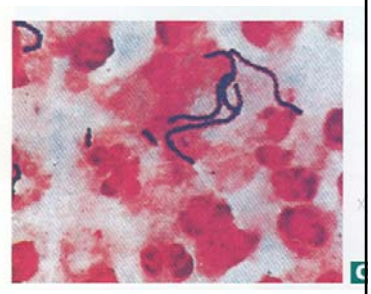
INFEZIONI delle ARTICOLAZIONI SINOVIALI

La più comune forma di infezione dell'adulto o del giovane è associata ad una batteriemia causata da:

- *Neisseria gonorrhoeae,*
- *Staphylococcus aureus,*
- *Streptococcus pneumoniae*

mentre nei bambini da:

- *Haemophylus influenzae,*
- *Streptococcus* spp
- *Staphylococcus aureus*



14

OSTEOMIELITE

- **Processo infiammatorio dell'osso causato da germi della suppurazione**:
  - **stafilococchi** *(S. aureus,* 60-70% dei casi, 90% nei bambini)
  - **streptococchi** (10% dei casi),
  - **enterobatteri** *(E. coli)* e ***Pseudomonas aeruginosa*** (20-30%).
- I germi possono aggredire le ossa:
- per **diffusione dai tessuti contigui o per via diretta**, cioè con l'innesto dei germi a livello dell'osso per lesioni traumatiche (fratture esposte e ferite accidentali, in genere agli arti, per incidenti stradali o di lavoro, per ferite d'arma da fuoco);

15

OSTEOMIELITE

I germi possono aggredire le ossa:

- per **diffusione dai tessuti contigui** o **per via diretta**, cioè con l'innesto dei germi a livello dell'osso per lesioni traumatiche (fratture esposte e ferite accidentali, in genere agli arti, per incidenti stradali o di lavoro, per ferite d'arma da fuoco);
- per **via ematogena** (prevalente in età pediatrica), con produzione di una setticemia (artrite settica); in tal caso la via di ingresso è rappresentata spesso da una tonsillite, da un foruncolo cutaneo, da un ascesso, ecc. La sintomatologia è caratterizzata da febbre elevata con brivido, cefalea, dolore intenso con limitazione del movimento delle ossa interessate.
- **L'accertamento microbiologico** si basa sulla coltura del campione prelevato per via chirurgica o mediante agoaspirazione. Il trattamento si basa sulla somministrazione di antibiotici.

16

BORSITE SETTICA

- Le borse del ginocchio e della spalla sono frequentemente soggette al rischio di **ferite** con conseguente infiammazione o infezione.
- Queste due zone articolari sono soggette a borsite settica soprattutto in soggetti impegnati più frequentemente in **attività di giardinaggio, carpenteria, idraulica, golf, ginnastica** ecc.
- L'agente eziologico maggiormente responsabile delle borsiti settiche è ***Staphylococcus aureus*** (più del **90%).**
- Il trattamento terapeutico si avvale del drenaggio dell'area coinvolta e dell'uso di antibiotici.

17

PATOGENESI

- **Biofilm**. Uno strato di glicoproteine si deposita sulla superficie delle **protesi** formando un **biofilm**.

  Questo peculiare **ecosistema** consente:
  - ai batteri di aderire alla protesi e di replicarsi,
  - mentre ostacola la penetrazione dei leucociti e degli antibiotici.

18

PATOGENESI

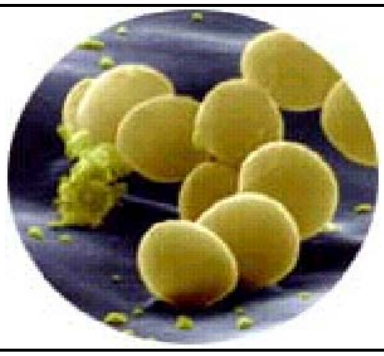
- **Diffusione per contiguità: la maggior parte delle infezioni:**
  - Contaminazione diretta delle protesi durante l'intervento chirurgico da parte di patogeni presenti:
    - nell'aria delle sale operatorie
    - sulla cute del paziente o dello staff delle sale operatorie (*Clin Orthop 1972*)
  - Traumi
  - Direttamente sulle protesi dai tessuti infetti soprastanti
- **Disseminazione ematica**
  - dall'orofaringe, dagli apparati respiratorio, urinario, gastrointestinale, e dalla cute (*Clin Orthop 1975)*

19

STAFILOCOCCHI

- I microorganismi più frequentemente identificati nelle infezioni ortopediche sono gli **stafilococchi**

1. Stafilococchi
   a) Staphylococcus epidermidis
   b) Staphylococcus aureus
2. Bastoncini gran-negativi
3. Streptococchi
4. Enterococchi
5. Anaerobi
6. Altri



In uno studio retrospettivo di **3051** protesi d'anca, sono state osservate: **47 infezioni**: ***Staphylococcus aureus*** (33%), ***E.coli* e *Pseudomonas spp.*** (36%), ***S. epidemidis*** (12%) ed ***Enterococcus spp***. (10%) (Clin Orthop 1992).

20

PATOGENESI

- Le **infezioni precoci**, che si osservano nel primo anno post-operatorio, sono causate da:
  - *S. epidermidis*
  - *S. aureus*
  - *Streptococcus spp*.
- Le **infezioni tardive**, che si osservano dopo il primo anno post-operatorio, sono causate da:
  - *S. epidermidis*
  - *S. aureus*
  - Bastoncini gram-negativi

L'incidenza delle **infezioni polimicrobiche** non è ben documentata: in uno studio è stata del **19%.**
Sono **rare** le infezioni da miceti, micobatteri e da anaerobi.

21

FATTORI di RISCHIO

- **dell'ospite:**
  - Età avanzata
  - Diabete mellito
  - Neoplasie
  - Artrite reumatoide
  - Emofilia
  - Pregresso intervento
- **peri- operatori**
  - Ematoma
  - Incisioni della cute
- **post- operatori**
  - Disseminazione ematogena di batteri
  - Ulcerazioni della cute
  - Infezioni respiratorie, urinarie e dentali possono dare batteriemie transitorie

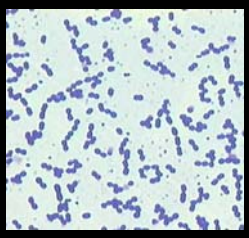
22

DIAGNOSI

- **Il gold standard di una diagnosi di infezione ortopedica è l'isolamento di batteri dal liquido sinoviale o da campioni intraoperatori.**
  - L'aspirazione pre-operatoria ottiene una coltura positiva in **>80%** dei casi con infezione documentata
  - Per l'adesività dei batteri alle protesi si hanno **falsi negativi**
- **Raccolta di più campioni intraoperatori da diversi siti per esami colturali in aereobiosi ed anaerobiosi e microscopici dopo colorazione con Gram:**
  - Esame microscopico: informazioni sulla morfologia
  - Esame colturale con identificazione : **24-48 ore**
  - Antibiogramma : **24 ore**

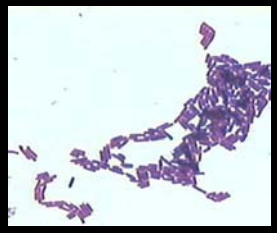
23

LA COLORAZIONE DI GRAM



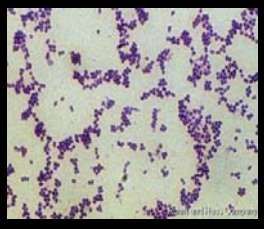
Un Gram positivo

Un Gram negativo

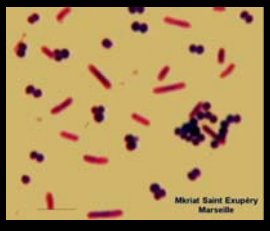


Un Gram positivo

Cocchi Gram positivi



Cocchi Gram positivi



Bastoncelli Gram negativi misti a cocchi Gram positivi

AGAR SALE-MANNITOLO

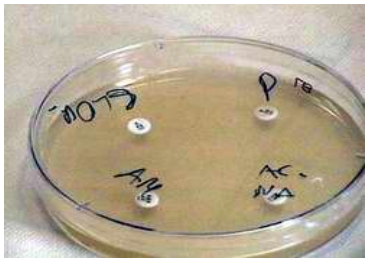
- Selettivo/differenziale
- Contiene NaCl, mannitolo, rosso fenolo
- Utilizzato per isolare stafilococchi e streptococchi, inibisce la crescita della maggior parte degli enterobatteri.

Staphylococcus aureus

25

ANTIBIOGRAMMA (SISTEMA KIRBY-BAUER)

- Quando la superficie è asciutta si depongono sulla piastra i dischetti contenenti gli antibiotici da saggiare.



- Incubazione di 18 ore a 37°C.
- Misura aloni di inibizione attorno a ciascun dischetto
- Interpretazione secondo NCCLS
- La sensibilità o resistenza agli antibiotici di un patogeno è stabilita sulla base di concentrazioni di antibiotici dette breakpoint.

DIAGNOSI

Rilevamento di acidi nucleici batterici in campioni di tessuto periprotesico e nel liquido sinoviale mediante amplificazione genica (PCR):

- **sensibilità eccellente**
- **nessun risultato falso positivo**

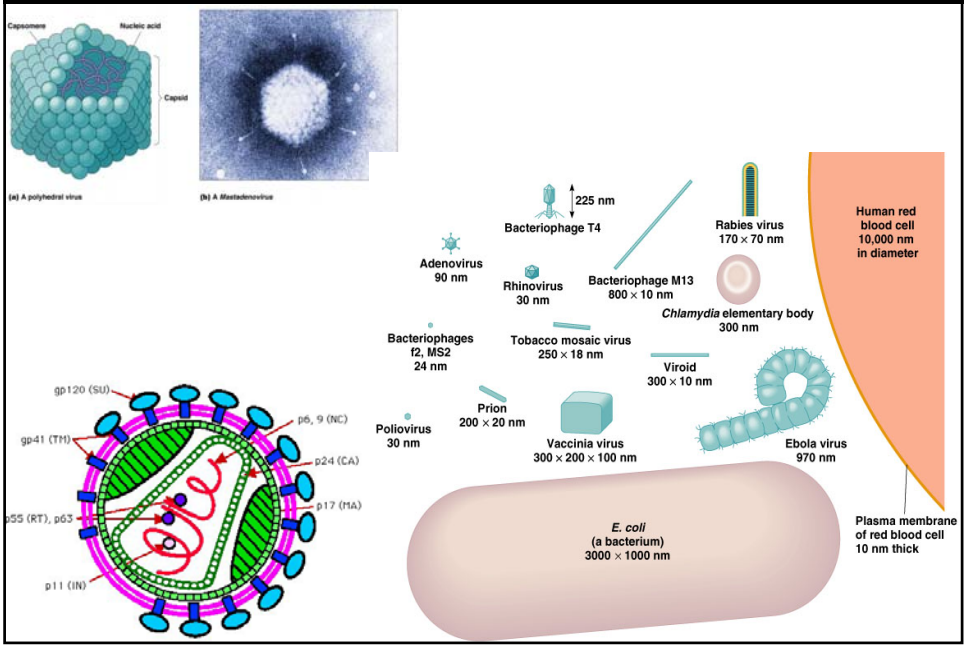
27

I CHIRURGHI ORTOPEDICI CHIEDONO …

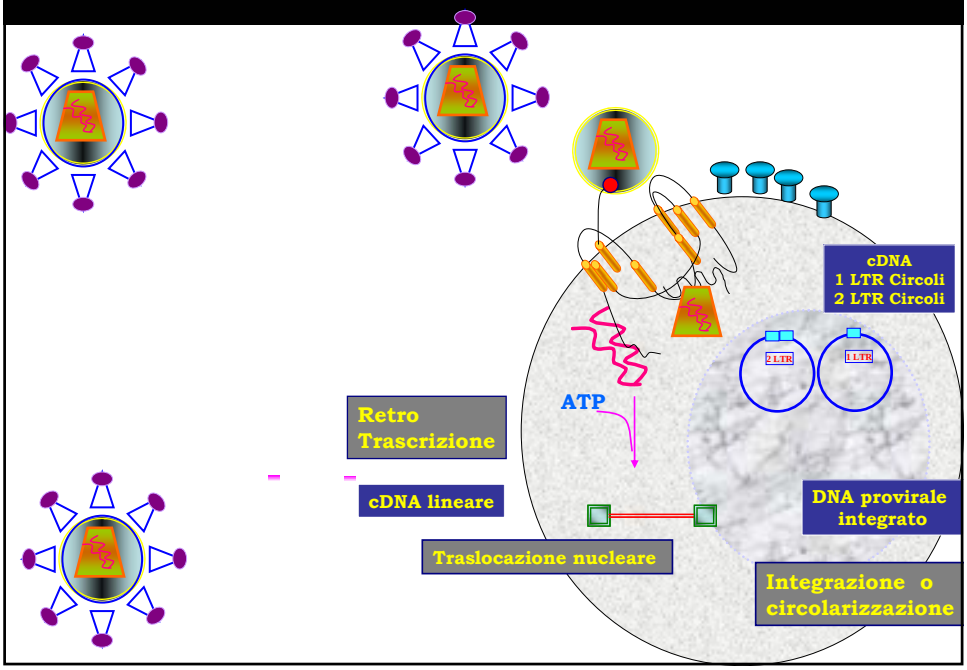
- **ESAMI CHE IDENTIFICANO UN'INFEZIONE IN ATTO**
- **ESAMI QUANTITATIVI**
- **REFERTI IN GIORNATA**

28

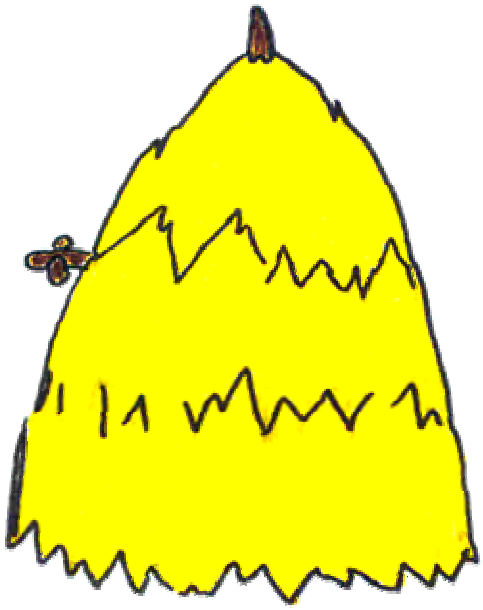
BATTERI, FUNGHI, VIRUS



INFEZIONE VIRALE



UN AGO IN UN PAGLIAIO

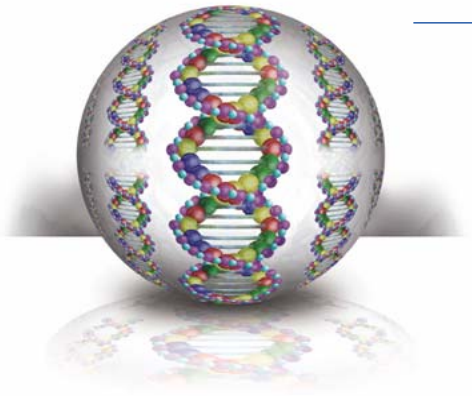


AMPLIFICAZIONE

Fare copia
Fare copia
Fare copia
Fare copia
Fare copia

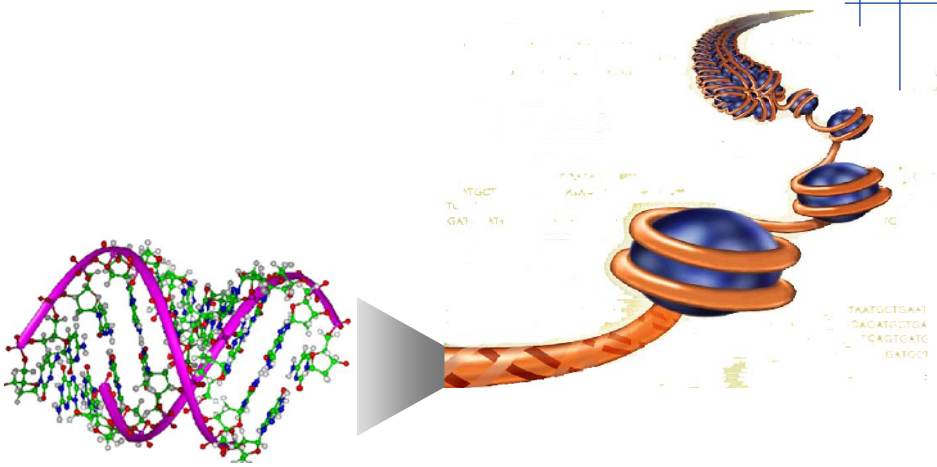
32

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)
REAZIONE POLIMERASICA a CATENA
AMPLIFICAZIONE GENICA



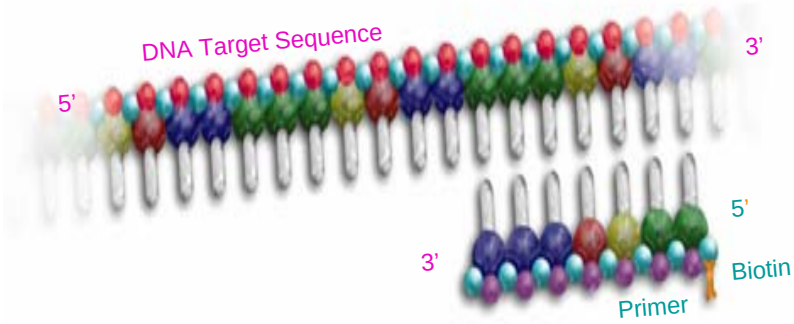
33

IL DNA



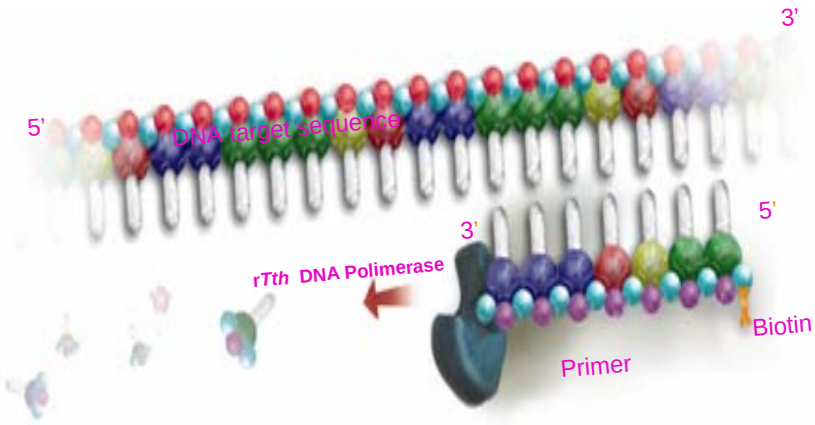
34

PCR: FASE 1: I PRIMER SI LEGANO AL DNA BERSAGLIO



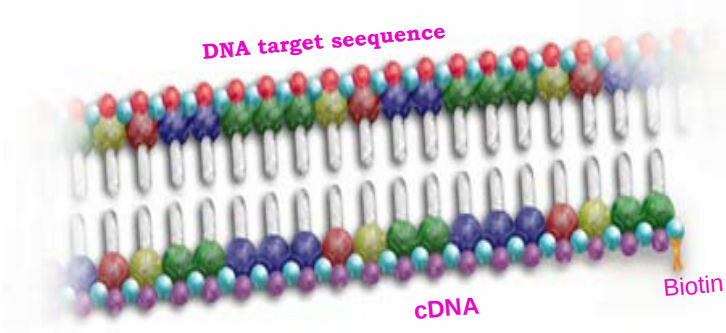
35

PCR FASE 2: LA POLIMERASI FA UNA COPIA DEL DNA



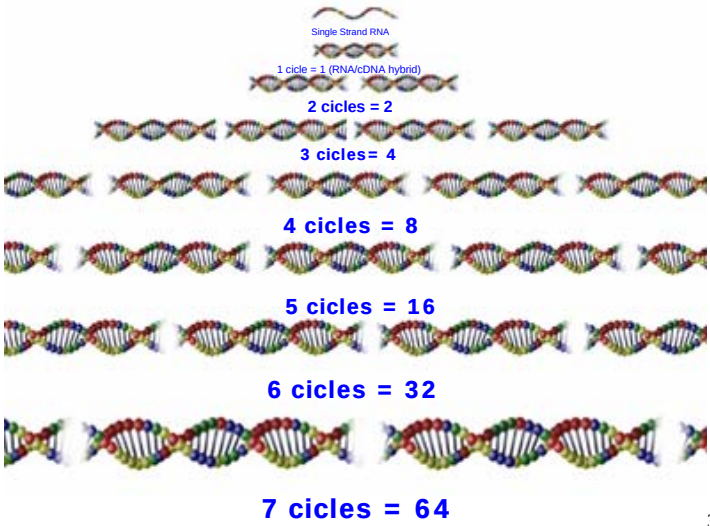
36

PCR FASE 3: SI OTTIENE UN COPIA DEL DNA BERSAGLIO



37

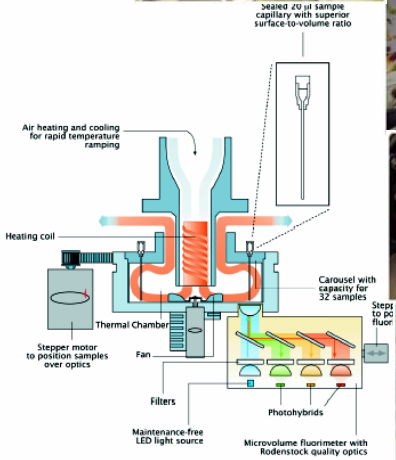
PCR: REAZIONE POLIMERASICA A CATENA



38

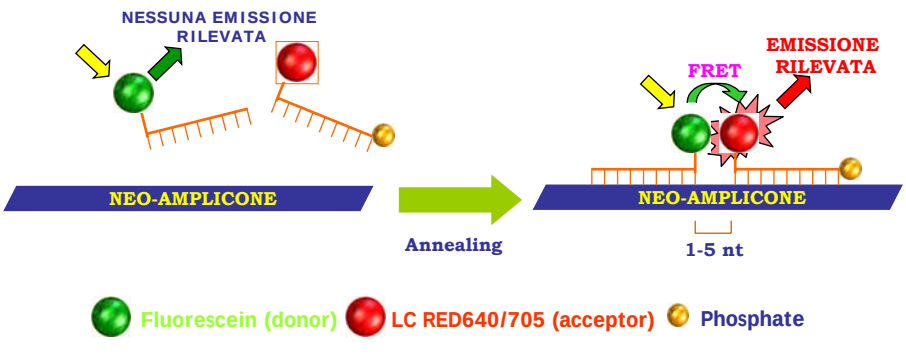
RealTime PCR: LightCycler

… include amplificazione (PCR), ibridizzazione e il rilevamento del segnale in una singola fase …… in **Real Time**



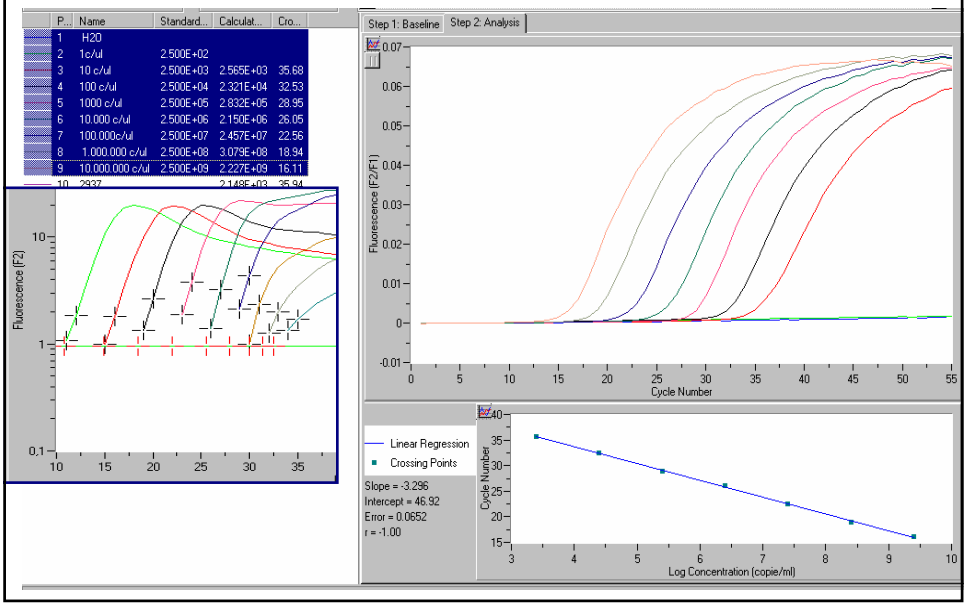
Concetto Molecolare: Sonde di Ibridizzazione

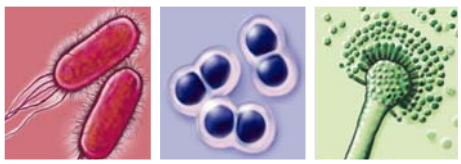
Principio: ibridizzazione adiacente e
Fluorescence Resonance Enery Transfer (FRET)



40

LightCycler RealTime PCR Quantitativa: Accuratezza, Intervallo di Calcolo, Linearità





Light Cycler REAL TIME PCR *SeptiFast*

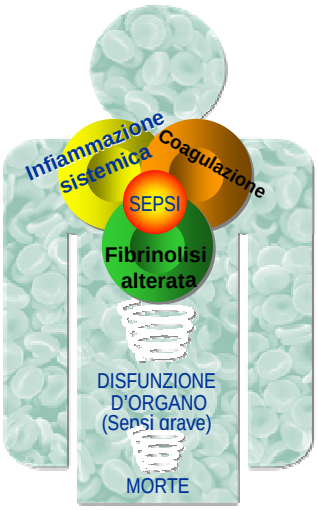
Il test in PCR *real-time* per la diagnosi rapida di sepsi

modified & adapted by Oliviero E. Varnier – **Sez Microbiologia, Facoltà di Medicina. Università di Genova**

42

SEPSI GRAVE: SINDROME CLINICA COMPLESSA E IMPREVEDIBILE

Una volta attivata, la **triade** dell'infiammazione sistemica, della coagulazione e della fibrinolisi alterata, può condurre ad una disfunzione acuta degli organi (**sepsi grave**) e alla **morte**, anche se il processo dell'infezione sottostante è sotto controllo.



43

Light Cycler *SeptiFast*: microorganismi identificabili

GRADE

Purificazione del DNA

Reagenti DNA free

Gram (-)

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumoniae / oxytoca*
- *Serratia marcescens*
- *Enterobacter cloacae / aerogenes*
- *Proteus mirabilis*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Stenotrophomonas maltophilia*

Gram (+)

- *Staphylococcus aureus*
- *CoNS (S. epidermidis, haemolyt.)*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus viridans ("group")*
- *Streptococcus spp.*
  - *Streptococcus pyogenes*
  - *Streptococcus agalactiae*
  - *Streptococcus sanguinis*
- *Enterococcus faecium*
- *Enterococcus faecalis*

MRSA (mecA)

Funghi

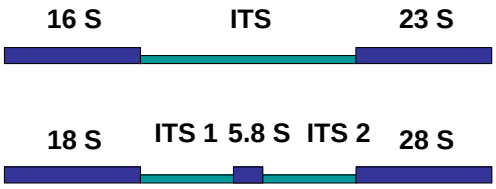
- *Candida albicans (tropicalis & parapsilosis)*
- *Candida krusei & glabrata)*
- *Aspergillus fumigatus*

44

~ 25 parametri ⇒ ~ 90% dei ceppi isolati

LIGHT CYCLER *SEPTIFAST*: IL DISEGNO DEL TEST

- primers e probes sono derivati dalla regione "**Internal transgenic spacer**" del genoma del patogeno (ITS e ITS1, ITS2).
- sono regioni ben studiate e specifiche per batteri e funghi e sono coperte da brevetti.
- sequenziate oltre **1.800 regioni ITS** da batteri e funghi.

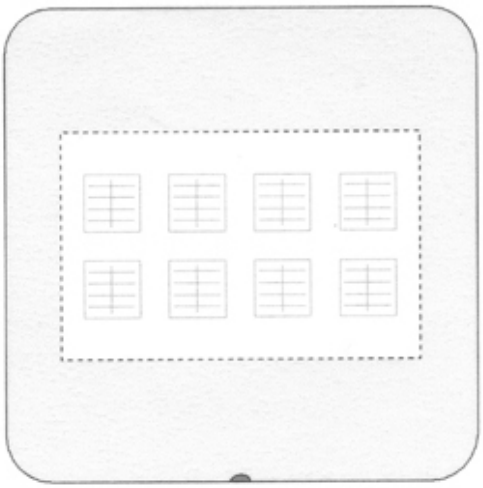


45

LIGHT CYCLER *SEPTIFAST*

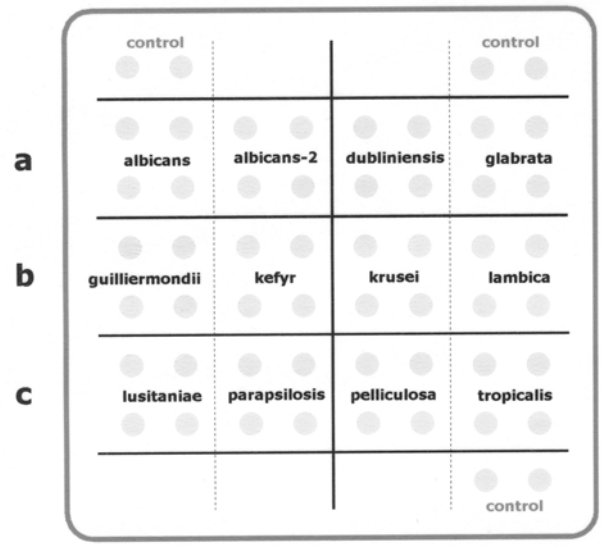
N°	Ceppo	TOTALI	EMO SOLO	RT PCR SOLO	ENTRAMBI I METODI
1	*Staphylococcus aureus*	29	0	**19**	10
2	CoNS	16	0	**12**	4
3	*Streptococcus pneumoniae*	6	**2**	**4**	**0**
4	*Streptococcus spp*	11	**2**	**5**	4
5	*Enterococcus faecalis*	14	**4**	**10**	**0**
6	*Enterococcus faecium*	13	**3**	**9**	1
7	*Acinetobacter baumanni*	0	0	0	**0**
8	*Enterobacter aerogenes/cloacae*	32	**2**	**22**	8
9	*Escherichia coli*	33	**1**	**22**	10
10	*Klebsiella pneumoniae/oxitoca*	26	**1**	**23**	2
11	*Proteus mirabilis*	2	**1**	**1**	**0**
12	*Pseudomonas aueruginosa*	11	0	**8**	3
13	*Serratia marcescens*	8	**2**	**5**	1
14	*Stenotrophomonas malthophila*	5	**1**	**1**	3
15	*Aspergillus fumigatus*	20	0	**20**	**0**
16	*Candida albicans*	8	**2**	**3**	3
17	*Candida glabrata*	2	**2**	0	**0**
18	*Candida krusei*	1	0	**1**	**0**
19	*Candida parapsilosis*	0	0	0	0
20	*Candida tropicalis*	0	0	0	0
	specie non incluse nell'elenco SI	25	9	8	8
	TOTALE	**262**	**32**	**173**	**57**

LCD "LOW COST and DENSITY" BIOCHIPS



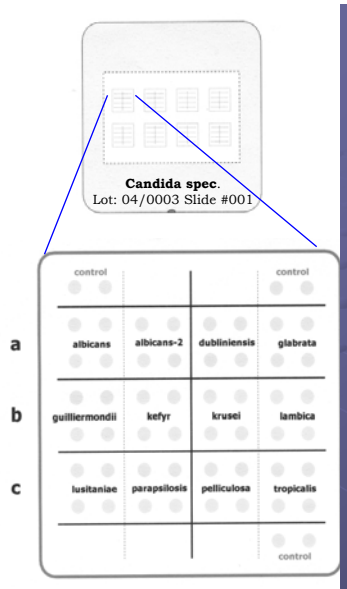
47

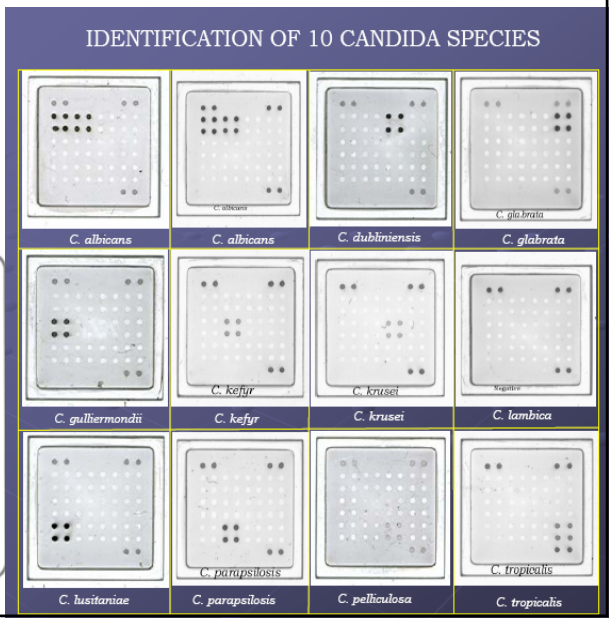
BioChips -> Candida



48

RISULTATI the 1st BioChip: *Candida spp.*



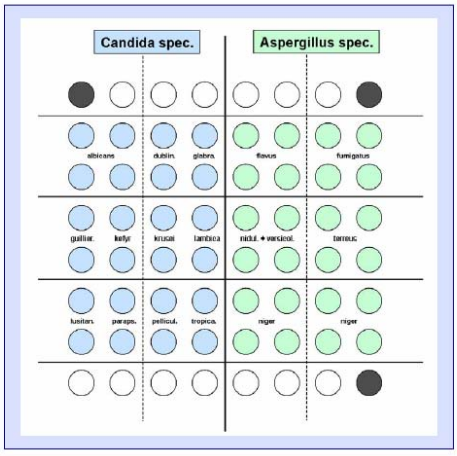


LCD "LOW COST and DENSITY" BIOCHIPS FUNGI

chipron

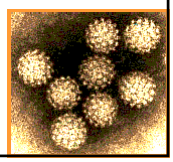
Candida / Aspergillus-Array

- 1 PCR-Reaction
- 11 Candida species
- 6 Aspergillus species
- Combination with Real-Time-PCR (optional)
- 2.5 hrs Assay-time



PAPILLOMAVIRUS UMANI

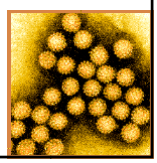
- Si conoscono oltre **200 tipi** di HPV (**2-10%)**
- **85 genotipi** sono stati caratterizzati
- HPV possono infettare cellule epiteliali basali della cute oppure lo strato esterno dei tessuti e sono quindi classificati in:
  - **tipi cutanei**: epidermotropi-> cute delle mani e dei piedi
  - **tipi mucosali**: mucosa della bocca, gola, apparato respiratorio ed epitelio anogenitale



PAPILLOMAVIRUS UMANI

- Storicamente, **HPV 16 e HPV 18** sono stati considerati i tipi con il più alto rischio oncogeno;
- i tipi **6 e 11** sono HPV a basso rischio;
- **HPV 31, 33 e 35** sono stati considerati a rischio intermedio
- Questi **7 tipi di HPV** causano circa il 70% dei tumori cervicali

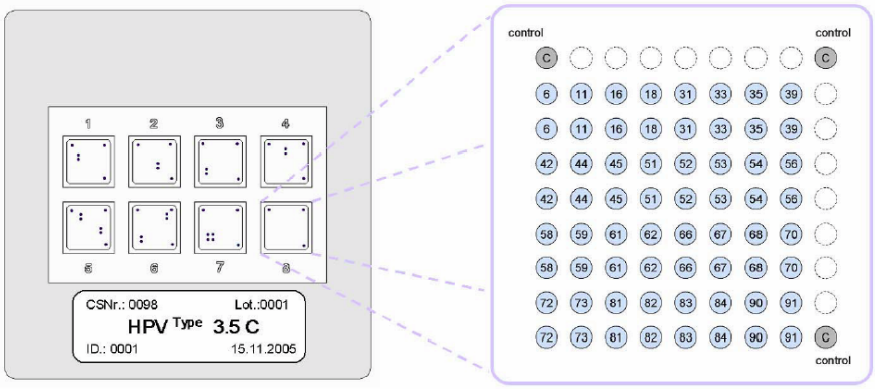
- **Alto rischio** (HR):16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 26, 30, 54.
- **Basso rischio** (LR): 6, 11, 40, 42, 43, 44.



LCD-Array HPV Type 3.5 C

Array Description

Each LCD-Chip contains eight identical arrays in rectangular reaction chambers which can be addressed individually. The capture probes are immobilized as duplicates (vertical). Functional controls (to monitor hybridization + staining) are located in three corners. The formed array is an 9 x 9 pattern with average spot diameters of 300 µm.



53

LCD-Array HPV Type 3.5 C

Capture Probes

Specific capture probes are immobilized for the following HPV subtypes:

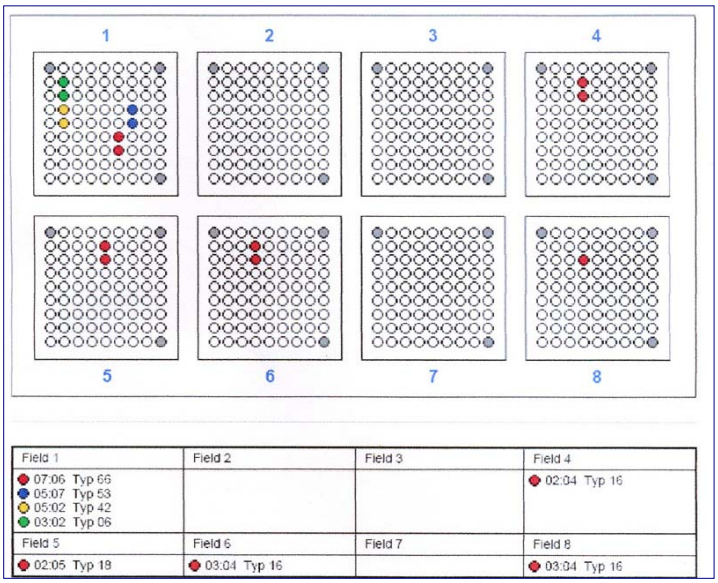
Hyb-Control								Hyb-Control
HPV 06	HPV 11	HPV 16	HPV 18	HPV 31	HPV 33	HPV 35	HPV 39	
HPV 42	HPV 44	HPV 45	HPV 51	HPV 52	HPV 53	HPV 54	HPV 56	
HPV 58	HPV 59	HPV 61	HPV 62	HPV 66	HPV 67	HPV 68	HPV 70	
HPV 72	HPV 73	HPV 81	HPV 82	HPV 83	HPV 84	HPV 90	HPV 91	Hyb-Control

The probes are immobilized as vertical duplicates in numerical order (compare above graphic).

chipron
Technology for your daily routine

54

LCD-Array HPV Type 3.5 C Identification of human papilloma virus subtypes



55

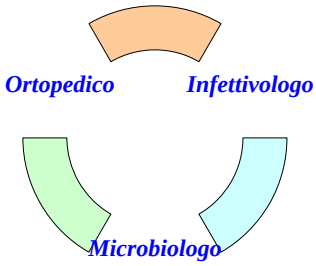
RIFLESSIONI CONCLUSIVE

- Le infezioni in ortopedia sono causate da batteri diversi con lo *Staphylocccus aureus* nel ruolo di protagonista
- La diagnosi eziologica è importante per una terapia personalizzata
- Le biotecnologie offrono test (real Time PCR) rapidi, sensibili e specifici
- L'amplificazione di RNA ribosomale batterico con primers universali consentirebbe di amplificare qualsiasi batterio presente con una eccellente sensibilità. L'identificazione potrebbe essere eseguita con un BioChip LCD contenente le sonde specifiche per i più importanti e frequenti patogeni

56

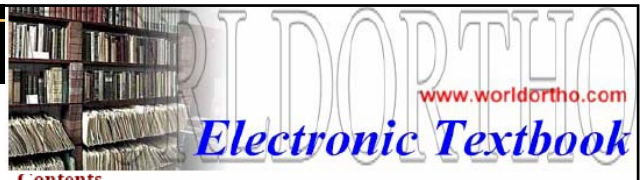
CONCLUSIONE

- Il managment delle infezioni in ortopedia richiede un "**team approach**":



La terapia deve essere individualizzata sulla base dello stato clinico del paziente e del microorganismo patogeno

57



Contents

Chapter 1	Paediatric orthopaedics
Chapter 2	Adult bone trauma
Chapter 3	Patello-femoral instability
Chapter 4	Multiple Neurofibromatosis
Chapter 5	Primary Care for the Spinal Injured
Chapter 6	Radiology of the Musculoskeletal System
Chapter 7	Infections of Bone and Joints
Chapter 8	Basic Sciences
Chapter 9a	The Normal Joint
Chapter 9b	The Abnormal Joint
Chapter 10	Molecular Genetics and Immunology of Orthopaedics
Chapter 11	Perioperative Checks
Chapter 12	Adult Reconstruction - Hip and Knee
Chapter 13	Disorders of the Foot and Ankle in Adults
Chapter 14	Orthopaedic Pathology
Chapter 15	Principles of Management of Spinal Trauma
Chapter 16	Bone Lymphomas

Arrivederci da Genova

59