



# Avaliação microbiológica da superfície dos implantes ortopédicos metálicos usados para fixar fraturas ósseas

Cássio Antonio Lanfredi dos Santos<sup>1</sup>; Elisabeth Loshchagin Pizzolitto<sup>1,2,\*</sup>; Flávio Ferraz de Campos Júnior<sup>2</sup>; Adilson César Abreu Bernardi<sup>3</sup>; Clarice Queico Fujimura Leite<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara/SP, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC – USP, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos/SP, Brasil.

## RESUMO

A maioria dos casos de fraturas ósseas é utilizada nas cirurgias, implantes ortopédicos de osteossíntese (placa-parafuso e parafusos) e a infecção associada ao implante está relacionada com crescimento de microrganismos em biofilme. O objetivo deste estudo foi identificar os microrganismos recuperados de implantes de osteossíntese usados para fixação de fratura óssea, avaliar a viabilidade celular, a capacidade de aderência dos estafilococos e, determinar o perfil de sensibilidade/resistência aos antimicrobianos. Após a remoção cirúrgica, os conjuntos metálicos de aço inoxidável austenítico ASTM F138/F139 ou ISO NBR 5832-1/9 foram enviados ao Laboratório de Microbiologia Clínica, lavados em solução tampão e submetidos ao banho ultrassônico em 40±2 kHz por 5 minutos. O fluido sonicado foi semeado em meios de cultura e a viabilidade celular foi avaliada por meio de marcador fluorescente. A produção de polissacarídeo extracelular por *Staphylococcus* spp. foi averiguada por meio do teste de aderência em placa de poliestireno. O perfil de sensibilidade/resistência foi determinado por meio de técnica do disco difusão. As bactérias mais isoladas incluíram *Staphylococcus coagulase-negativa* resistente à eritromicina, oxacilina e clindamicina. Em menor frequência, *Pseudomonas aeruginosa* resistente à sulfametoxazol/trimetoprim e ampicilina; *Acinetobacter baumannii* resistente à ceftazidima; *Enterobacter cloacae* resistente à cefalotina, cefoxitina, cefazolina, levofloxacina, ciprofloxacina; *Bacillus* spp. e *Candida tropicalis*. A observação ao microscópio de fluorescência demonstrou agrupamentos celulares

vivos envoltos em substância transparente. O teste de aderência dos *Staphylococcus coagulase-negativa* à placa de poliestireno mostrou que estes microrganismos são produtores de polissacarídeo extracelular. Em conclusão, os conjuntos metálicos foram colonizados por bactérias relacionadas à infecção de implantes ortopédicos, os quais apresentaram resistência múltipla aos antimicrobianos.

**Palavras-chave:** Aço inoxidável austenítico. Biofilme. Implantes ortopédicos. Osteossíntese. Resistência bacteriana. Sonicação.

## INTRODUÇÃO

Os aços inoxidáveis austeníticos são utilizados como implantes ortopédicos de fixação de fratura óssea (osteossíntese) (Disegi & Eschbach, 2000), por apresentar boas características de resistência mecânica, de corrosão (Rodríguez et al., 2004) e fraco teor de osteointegração, tornando-o um material mais apropriado para implantes temporários (Nasab & Hassan, 2010). Porém, em algumas situações, quando instalada, a infecção pode ser persistente, apesar do uso da cefazolina como antibiótico profilático e emergência de *Staphylococcus coagulase-negativa* resistente à oxacilina (Zimmerli et al., 1998; Haas & Kaiser, 2000; Widmer, 2001).

Nestes casos estas bactérias não são eliminadas pelas defesas do organismo hospedeiro, conseguem sobreviver e se multiplicar na vizinhança do implante. O desenvolvimento bacteriano é lento e os sintomas podem aparecer meses ou anos após a implantação do dispositivo (Costerton et al., 1999; Costerton et al., 2004; Long, 2008; Rochford et al., 2012). A patogênese das infecções associadas aos implantes de fixação da fratura está relacionada com crescimento de microrganismos em biofilmes (Costerton et al., 1999; Schmidt & Swiontkowski, 2000; Trampuz et al., 2003; Ehrlich et al., 2005; Trampuz et al., 2006), a qual se origina pela multiplicação de microrganismos na superfície dos implantes utilizados nas

*Autor correspondente:* Elisabeth Loshchagin Pizzolitto - Departamento de Análises Clínicas - Setor de Microbiologia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Rua Expedicionários do Brasil, 1621 - CEP: 14801-360 - Araraquara - SP - Brasil - tel: 55 (16) 3301-6107 - e-mail: pizzollet@fcfar.unesp.br.

cirurgias (Adachi et al., 2007). O biofilme consiste de uma população microbiana altamente organizada aderida a uma superfície e encapsulada em uma matriz de polissacarídeo extracelular de sua própria produção (Donlan & Costerton, 2002).

O tratamento das infecções associada ao implante ortopédico, passa a ser bem sucedido quando se faz a identificação dos microrganismos. Devido a sua simplicidade e baixo custo, a sonicação de dispositivos ortopédicos, parece ser o método mais promissor entre as técnicas mais recentes para o diagnóstico de infecção associados à implantes, o qual possui uma sensibilidade alta (80%) em comparação com métodos obtidos de cultura de tecido periprotético (60%) (Trampuz et al., 2007; Piper et al., 2009). O banho ultrassônico pode ser definido como energia ultrassônica aplicada diretamente à superfície do implante, para desalojar e recuperar bactérias aderentes, as quais se encontram em biofilme sobre implantes ortopédicos (Tunney et al., 1999; Zimmerli et al., 2004; Trampuz & Zimmerli, 2006; Trampuz et al., 2007). Os objetivos do presente estudo foram identificar os microrganismos recuperados do conjunto metálico placa-parafuso e parafusos após remoção cirúrgica, avaliar a viabilidade celular, a capacidade de aderência dos estafilococos isolados e determinar o perfil de sensibilidade/resistência aos antimicrobianos das bactérias planctônicas Gram-positivas e Gram-negativas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Seleção e Transporte dos implantes

Foram selecionados implantes ortopédicos metálicos (conjunto placa-parafuso e parafusos de aço inoxidável austenítico ASTM F138/F139 e ISO NBR 5832-1/9, utilizados para fixação de fratura óssea) removidos de pacientes internados no IOT-HCFMUSP, em função do desenvolvimento de infecção local ou sistêmica relacionada ao implante, ocasionando a sua remoção. As amostras foram nomeadas em P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8. Os conjuntos metálicos foram transportados em bolsa de polietileno esterilizada, com embalagem impermeável e fechada hermeticamente, para o Setor de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do IOT-HCFMUSP, sob registro nº 221.18763.2008.

### Recuperação dos microrganismos aderidos aos implantes

Foi utilizado o método de banho ultrassônico (sonicação) descrito por Trampuz et al. (2006) e para preservação da viabilidade microbiana, foram utilizados os procedimentos descritos por Pitt & Ross (2003). Os conjuntos metálicos foram processados e lavados, separadamente, três vezes com solução tampão fosfato-salino (PBS). Posteriormente, os implantes foram transferidos para bolsa de polietileno esterilizada, contendo 300 mL de solução Ringer, e submetidos ao banho ultrassônico (UNIQUE – mod. USC2800. Indaiatuba, SP, Brasil) com frequência

40±2 KHz por 5 minutos. Após o processo de sonicação, o fluido sonicado de cada amostra foi centrifugado a 3.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento de cada amostra, foi adicionada alíquota de 20 mL de solução Ringer para obter-se a suspensão de trabalho, direcionado para viabilidade e cultura das células recuperadas dos implantes.

### Avaliação da viabilidade celular por meio de microscópio de fluorescência

Uma alíquota de 15 mL do fluido sonicado foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e a biomassa foi ressuspensa em 1 mL em solução de NaCl 0,85%. A biomassa de cada conjunto metálico foi homogeneizada por vortex e uma alíquota de 500µL foi direcionada para coloração com o *Kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability* (Molecular Probes – Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). Os corantes do kit, SYTO 9 e Iodeto de propídio, foram balanceados para mistura 1:1 e dissolvidos em água deionizada perfazendo o volume final de 5 mL de solução. Após a preparação do corante, 50µL de biomassa foram adicionados a 50µL de corante. A coloração foi realizada individualmente para cada biomassa obtida do conjunto metálico. Em seguida, a biomassa corada foi homogeneizada, incubada à temperatura ambiente por 15 minutos no escuro e uma alíquota de 10µL da biomassa corada foi depositada sobre uma lâmina de vidro de microscópio e adicionada uma gota do óleo de montagem, a qual foi sobreposta por uma lamínula. O sistema (lâmina/laminula) foi observado ao Microscópio de Fluorescência (LEICA, mod. LEITZ DMRXE, Wetzlar, Germany), acoplado com Câmera (LEICA, mod. DFC300 FX) e Software Analisador de Imagens (LEICA, IM50 Image Manager Software). Os filtros foram selecionados de acordo com varredura na lâmina. A leitura foi baseada na determinação da viabilidade dos microrganismos a partir da diferença de integridade da membrana das células incorporadas, onde, os microrganismos vivos com as membranas intactas apresentam fluorescência verde (SYTO 9) e os microrganismos mortos com membranas danificadas apresentam fluorescência vermelha (Iodeto de propídio).

### Isolamento e identificação dos microrganismos

A suspensão de cada conjunto metálico foi homogeneizada por vortex (PHOENIX - mod. AP56) durante 30 segundos. Do fluido sonicado, uma alíquota de 10µL recebeu coloração de Gram e outros 10µL foram semeados nos meios de cultura Ágar Sangue Base acrescido de sangue de carneiro desfibrinado 5%, Ágar MacConkey, Ágar Sabouraud. Os meios de culturas foram incubados em estufa bacteriológica à 37°C por até sete dias (Ágar Sangue carneiro desfibrinado 5% em jarra de microaerofilia 5% CO<sub>2</sub> e Ágar MacConkey em aerobiose), e à temperatura ambiente por até 30 dias, Ágar Sabouraud. Os microrganismos crescidos nos respectivos meios de cultura foram enumerados e classificados por técnicas de rotina microbiológica padronizada (Murray et al., 2009). Para os microrganismos não identificados por técnicas

convencionais foi utilizado o sistema BD BBL Crystal™ Identification Systems – Kit Enteric/Nonfermenter ID Kit e Gram-Positive ID Kit (BECTON DICKINSON – BD).

### Caracterização fenotípica das cepas Gram-positivas (*Staphylococcus coagulase-negativa*) para formação de biofilme

A capacidade de produção de biofilme em placas de poliestireno foi determinada de acordo com Christensen et al. (1985). Os microrganismos isolados foram inoculados em 3,0 mL de caldo TSB e incubados a 37°C por 24 horas. Após este período, a cultura em TSB foi diluída na proporção de 1:100 em um novo TSB e, uma alíquota de 200µL de cada cultura diluída foi transferida para placa de poliestireno esterilizada de 96 poços (*wells*). A seguir estas placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e, posteriormente, o conteúdo de cada poço foi lavado quatro vezes com 200µL de tampão fosfato salino (PBS). A secagem da placa foi realizada em estufa a 60°C por 1 hora e em seguida, os poços foram corados com Cristal Violeta de Gram por 1 minuto e posteriormente, lavados quatro vezes com 200µL de água destilada. Após, foi realizada a secagem das placas em temperatura ambiente por 60 minutos e adicionado 200µL da solução de dodecil sulfato de sódio à 1% (SDS) em cada poço da placa para realização da leitura. A densidade óptica (D.O) dos filmes bacterianos aderidos e corados foi avaliada com o auxílio de um leitor de ELISA (BioTek – PowerWave XS2) em filtro de 570nm. As leituras foram divididas em três categorias de acordo com a reação de aderência das bactérias: não aderente (D.O. ≤ 0,120nm); fracamente aderente (D.O. 0,120 a 0,240nm); e fortemente aderente (D.O. ≥ 0,240nm). Caldo triptona soja (TSB) esterilizado foi usado como controle negativo. As leituras foram realizadas em triplicata e os valores da densidade óptica foram tomados como a média das leituras.

### Perfil de sensibilidade/resistência aos antimicrobianos das bactérias recuperadas dos conjuntos metálicos

Foi utilizado o método disco-difusão (Bauer et al., 1966). A escolha dos antibióticos foi realizada de acordo com o documento *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing – CLSI* (2011) para a bactéria identificada. Discos de papel-filtro impregnados com concentração padronizada do antibiótico foram colocados sobre uma placa de agar Mueller Hinton, previamente semeada com uma suspensão padronizada do microrganismo isolado. A placa com a sementeira foi incubada em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C. Após a incubação foi realizada a leitura dos discos de antibióticos, sendo os halos de inibição interpretados como: sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R), de acordo com os critérios estabelecidos no documento CLSI. Foram utilizados os antimicrobianos: Amicacina (AMI), Ampicilina (AMP), Amoxicilina/ Ác. Clavulânico (AMC), Aztreonam (ATM), Ceftazidima (CAZ), Cefotaxima (CTX), Cefepime (CPM), Cefalotina (CFL), Cefoxitina (CFO), Cefazolina (CFZ), Cefuroxima (CRX), Ciprofloxacina (CIP), Clindamicina (CLI), Eritromicina (ERI), Gentamicina (GEN), Imipenem (IPM), Levofloxacina (LEV), Meropenem (MPM), Oxacilina

(OXA), Piperacilina/Tazobactam (PIP), Penicilina (PEN), Rifamicina (RIF), Sulfametoxazol/Trimetoprim (SUT), Tetraciclina (TET), Ticarcilina/Ác. Clavulânico (TAC), Tobramicina (TOB), Trimetoprim (TRI) e Vancomicina (VAN).

## RESULTADOS

Após análise bacteriológica, individual, de oito conjuntos placa-parafuso e parafusos foram isolados e identificados microrganismos, classificados em Gram-negativos e Gram-positivos, em sete conjuntos apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Distribuição dos microrganismos isolados no conjunto placa-parafuso e parafusos.

Amostra	Peça	Microrganismo isolado	Amostra	Peça	Microrganismo isolado
P1	Placa	NHD*	P5	Placa	<i>Staphylococcus simulans</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Paraf.*	NHD		Paraf.	NHD
P2	Placa	<i>Bacillus</i> sp.	P6	Placa	<i>Enterobacter cloacae</i>
	Paraf.	<i>Bacillus</i> sp.		Paraf.	<i>Enterobacter cloacae</i>
P3	Placa	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	P7	Placa	NHD
	Paraf.	NHD		Paraf.	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Bacillus</i> sp.
P4	Placa	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	P8	Placa	NHD
	Paraf.	<i>Staphylococcus schleiferi</i> <i>Candida tropicalis</i>		Paraf.	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Bacillus</i> sp.

NHD: Não Houve Desenvolvimento; Paraf.: Parafuso.

A observação em microscópio de fluorescência mostrou que os microrganismos que colonizaram os conjuntos placa-parafuso e parafusos, estavam agrupados e aderidos uns aos outros, encapsulados em substância transparente e estavam vivos, demonstrado por fluorescência verde, conforme apresentado na Figura 1.

A caracterização fenotípica de *Staphylococcus coagulase-negativa* para produção de polissacarídeo extracelular em placa de poliestireno, mostrou que o *Staphylococcus epidermidis* (amostra P3) aderiu fracamente e *Staphylococcus schleiferi* (amostra P4) e *Staphylococcus simulans* (amostra P5) aderiram fortemente, demonstrado na Figura 2.

O perfil de sensibilidade/resistência das bactérias isoladas está apresentado na Figura 3 e 4. Os *Staphylococcus simulans* foram sensíveis a ciprofloxacina, penicilina, rifamicina, sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina, vancomicina e gentamicina. *S. epidermidis* e *S. schleiferi* foram sensíveis à clindamicina. E, *S. epidermidis* foi resistente a eritromicina. O resultado do teste de indução da resistência da clindamicina (lincosamina) por eritromicina (macrolídeos) foi positivo. A clindamicina foi reportada como resistente.

Entre as bactérias Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* foi sensível à ciprofloxacina, ceftazidima, imipenem e gentamicina; *Enterobacter cloacae* foi resistente à ciprofloxacina e sensível à gentamicina, imipenem e ceftazidima. Os isolados de *Acinetobacter baumannii* apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos ciprofloxacina, gentamicina e à ceftazidima.

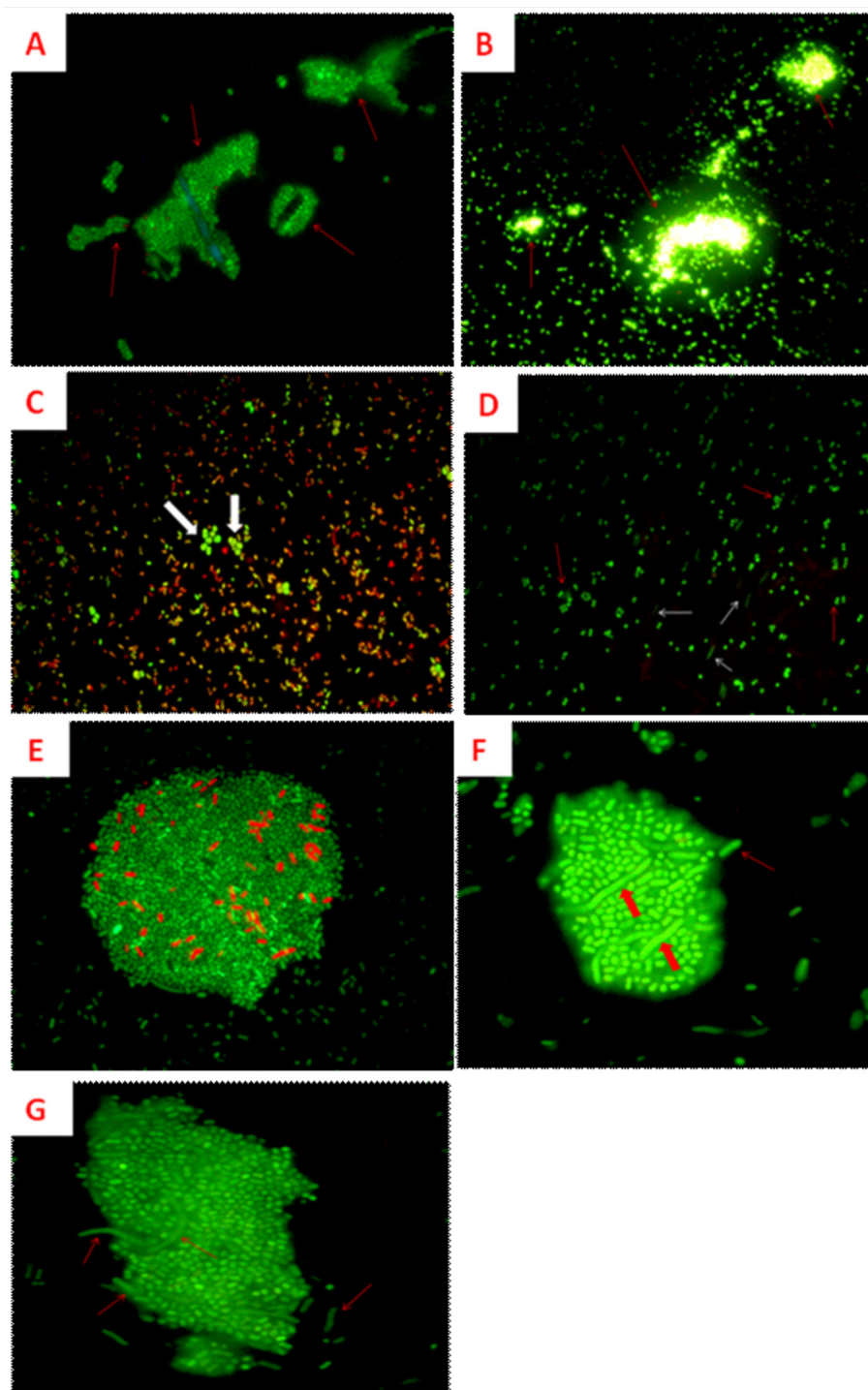


Figura 1: Micrografia de fluorescência dos microrganismos isolados de conjunto metálico: (A) amostra P3 – placa, as setas indicam agrupamento de células de *Staphylococcus epidermidis*, sugestivo de biofilme; (B) amostra P4 – placa, células de *Staphylococcus schleiferi*, caracterizado por biomassa de células vivas, envolto de substância amorfa, sugestiva de polissacarídeo extracelular (setas vermelhas); (C) Amostra P4 – parafuso, diversidade de células vivas e mortas de *Staphylococcus schleiferi* e células de levedura *Candida tropicalis* (setas brancas); (D) Amostra P5 – placa, células de *Staphylococcus simulans* (setas vermelhas) e *Pseudomonas aeruginosa* (setas brancas); (E) amostra P6 – placa: *Enterobacter cloacae* caracterizado por aglomerado celular (biofilme); (F) Aglomerado de células de *Acinetobacter baumannii* e *Bacillus sp.* indicados pela seta vermelha (amostra D5 – parafuso), envolvidos por polissacarídeo extracelular; (G) amostra D6 – parafuso (*Acinetobacter baumannii* e *Bacillus sp.* indicados pela seta vermelha), caracterizado por agrupamento de células vivas.

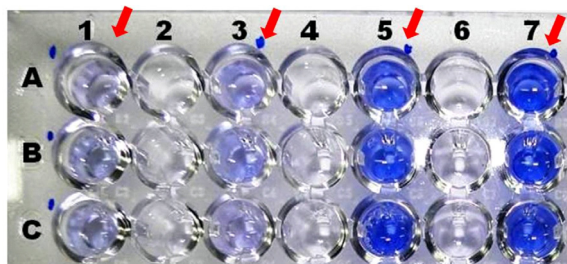


Figura 2. Teste de aderência em placa de poliestireno. Coluna 1, linhas A, B, C: TSB estéril; Coluna 3, linhas A, B, C: amostra P3 – placa, classificada como fracamente aderente (D.O 0,177); Coluna 5, linhas A, B, C: amostra P4 – parafuso, classificada como fortemente aderente (D.O 0,448); Coluna 7, linhas A, B, C: amostra P5 – placa, classificada como fortemente aderente (D.O 0,466).

Bactéria isolada				
Antibiótico	<i>S. epidermidis</i> (P3)	<i>S. schleiferi</i> (P4)	<i>S. simulans</i> (P5)	
CIP	S	S	S	
CLI	S	S	R	
ERI	R	S	R	
OXA	S	R	S	
PEN	S	S	S	
RIF	S	S	S	
SUT	S	S	S	
TET	S	S	S	
VAN	S	S	S	
GEN	S	S	S	

Figura 3. Avaliação do perfil de sensibilidade e resistência dos antimicrobianos testados em bactérias Gram-positivas. Legenda: (R) Resistente, (S) Sensível, ( - ) não testado, Ciprofloxacina (CIP), Clindamicina (CLI), Eritromicina (ERI), Oxacilina (OXA), Penicilina (PEN), Rifamicina (RIF), Sulfametoxazol/Trimetoprim (SUT), Tetraciclina (TET), Vancomicina (VAN), Gentamicina (GEN).

## DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, foram recuperados microrganismos de conjuntos metálicos (placa-parafuso e parafusos) usados para fixação de fratura óssea (Quadro 1). As bactérias isoladas incluíram *Staphylococcus* coagulase-negativa, das espécies *S. epidermidis*, *S. schleiferi* e *S. simulans*, dados corroborados por estudos de Campoccia et al. (2006) e Zimmerli et al. (2004). Estas bactérias podem ser encontradas na pele e na cavidade nasal de seres humanos saudáveis. Huebner & Goldmann (1999); von Eiff et al. (2002); Vuong & Otto (2002) relataram que a predominância de *Staphylococcus* coagulase-negativa em infecções humanas tem sido relacionada à microbiota normal da pele. Por outro lado, os estudos de Berbari et al. (1998); Urban & Garvin (2003); Arciola et al. (2005); Ehrlich et al. (2005)

Bactéria isolada		
Antibiótico	<i>P. aeruginosa</i> (P5)	<i>A. baumannii</i> (D5)
CIP	S	S
SUT	R	-
TET	S	-
GEN	S	S
IPM	S	-
CAZ	S	S
CTX	S	-
CPM	S	-
TAC	R	-
AMI	S	S
TOB	S	-
MPM	S	-
AMP	R	S
AMC	-	S
ATM	-	S
CFL	-	R
CFO	-	S
CFZ	-	R
CRX	-	S
TRI	-	S
LEV	-	-

Figura 4. Avaliação do perfil de sensibilidade e resistência dos antimicrobianos testados em bactérias Gram-negativas. Legenda: (R) Resistente, (S) Sensível, ( - ) não testado, Ciprofloxacina (CIP), Sulfametoxazol/Trimetoprim (SUT), Tetraciclina (TET), Gentamicina (GEN), Imipenem (IPM), Ceftazidima (CAZ), Cefotaxima (CTX), Cefepime (CPM), Ticarcilina/Ac. Clavulânico (TAC), Amicacina (AMI), Tobramicina (TOB), Meropenem (MPM), Ampicilina (AMP), Amoxicilina/ Ac. Clavulânico (AMC), Aztreonam (ATM), Cefalotina (CFL), Cefoxitina (CFO), Cefazolina.

mostraram que a maioria das infecções relacionadas com implantes na ortopedia, são infecções oportunistas que podem ser encontradas associadas ao hospedeiro sem causar doença. No entanto, quando as defesas imunológicas do paciente estão comprometidas devido a um procedimento cirúrgico invasivo, estes organismos inofensivos podem causar infecção e possivelmente mortalidade. Além disso, o próprio implante pode ter papel de destaque no desenvolvimento de uma infecção uma vez que fornece um substrato sobre o qual a bactéria contaminante pode aderir e formar biofilme (Rochford et al., 2012).

Uma infecção relacionada aos implantes ortopédicos tem início quando a bactéria adere na superfície do implante, multiplica-se e dissemina-se sobre a superfície do biomaterial formando microcolônias embutidas em matriz polissacarídica, constituindo assim o biofilme (Donlan,

2001; Donlan, 2002). No presente estudo, a habilidade dos isolados *Staphylococcus* coagulase-negativo em formar biofilme foi observada por leitura da densidade óptica após aderência em placa de poliestireno, onde *S. epidermidis* (P3) mostraram ser fracamente aderentes, *S. schleiferi* (P4) e *S. simulans* (P5) mostraram ser fortemente aderentes (Figura 2). A aderência ao poliestireno pode estar relacionada com a produção do polissacarídeo extracelular ou *slime*. O polissacarídeo extracelular produzido por estas bactérias protege-as das células fagocíticas do sistema imune do hospedeiro e dos antibióticos. Os dados do presente estudo estão de acordo com os de Donlan (2002) e Liu & Li (2008). Além disso, os estudos realizados por Alcaráz e colaboradores (2003) e Bernardi et al. (2007) mostraram que a produção de *slime* é uma característica das cepas hospitalares *Staphylococcus* coagulase-negativa patogênicas e a habilidade em produzir *slime* extracelular pode ser considerada como marcador de patogenicidade e está associada com a virulência dos *Staphylococcus* coagulase-negativa, além de ser o mecanismo pelo qual a bactéria adere e coloniza os implantes (Barcs et al., 1989; Alcaráz et al., 2003; Stepanovic et al., 2000).

A literatura cita que o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* de implantes ortopédicos representa 4 a 6% de todos os microrganismos envolvidos nas infecções de implantes ortopédicos (Bronqui et al., 1995; Mousa, 2001). O isolamento de *Enterobacter cloacae* nos conjuntos placa-parafuso e parafusos (Trampuz & Zimmerli, 2005) representam a relevância em termos de prevalência nas amostras clínicas de humanos (Morand et al., 2009). Na presente pesquisa houve o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* sensível a ciprofloxacina e *Enterobacter cloacae* resistente ao mesmo antibiótico (Figura 4). Em infecções relacionadas a implantes ortopédicos a ciprofloxacina é recomendada porque apresenta excelente penetração no osso (Greenberg et al., 2000). A ciprofloxacina sozinha é efetiva no tratamento da osteomielite causada por *P. aeruginosa* (Greenberg et al., 2000). No entanto, *P. aeruginosa* e *Enterobacter cloacae* foram sensíveis ao imipenem, dados similares aos obtidos por Khosravi et al. (2009). Contudo, na prevenção das infecções associada ao implante ortopédico cirúrgico são recomendadas várias combinações de antibióticos que incluem as penicilinas, cefalosporinas, vancomicina e aminoglicosídeos (Haas & Kaiser, 2000). A cefazolina tem sido o antibiótico profilático de escolha, principalmente, naqueles procedimentos que envolvem as cirurgias de implantes (Haas & Kaiser, 2000). O *Enterobacter cloacae* é resistente às cefalosporinas de primeira geração e, desenvolve rapidamente resistência às cefalosporinas de segunda e terceira geração (Stein et al., 2000). No presente estudo, todos os isolados *Staphylococcus* coagulase negativa apresentaram sensibilidade à vancomicina e ciprofloxacina (Figura 3). Os dados obtidos foram semelhantes aos relatados por Tunney et al. (1998) de que ciprofloxacina e vancomicina são os antibióticos mais efetivos, quando clindamicina, cefalosporina (primeira, segunda e terceira geração) e gentamicina não forem efetivos contra estas bactérias. No presente trabalho, o perfil de sensibilidade/resistência foi determinado para bactérias planctônicas, contudo, a

resistência de bactérias em biofilme aos antibióticos é de até 1.000 vezes maior do que para bactérias planctônicas (Stewart & Costerton, 2001).

De acordo com o estudo, também foram isolados *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus* sp. e *Candida tropicalis*. A relação destes isolados são semelhantes aos dados obtidos por Trampuz et al. (2005); Partanen et al. (2006); Muilwijk et al. (2006); Trampuz e Zimmerli (2006) e Khosravi et al. (2009). No entanto, Arciola et al. (2005) relataram que estes microrganismos têm relevância em termos de prevalência. Ainda, em relação aos microrganismos recuperados dos implantes ortopédicos, houve a recuperação de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (Quadro 1). Também foram isolados grupos mistos de microrganismos, dos quais as bactérias Gram-positivas foram os patógenos mais envolvidos, quais estes dados estão em conformidade com aqueles reportados na literatura (Hsieh et al., 2009). Contudo, uma característica comum destes microrganismos patogênicos para implantes ortopédicos é a habilidade em aderir a estes materiais estranhos (Gristina et al., 1991).

Foram identificadas também, células viáveis em biofilmes formados por estafilococos. As observações por micrografias foram confirmadas por culturas. A presente pesquisa demonstrou pela primeira vez agrupamentos de bactérias patogênicas, embutidos em uma substância transparente, sugestiva de cápsula e aderidos a superfície metálica de uso ortopédico (Figura 1). Os dados do presente estudo estão de acordo com os de (Stoodley et al., 2008; Stoodley et al., 2011).

A combinação de microscópio de fluorescência e cultura é uma ferramenta adequada para a detecção direta do biofilme, embora não seja um equipamento de rotina disponível em hospitais para o diagnóstico laboratorial. Deve-se ressaltar que muitos outros estudos serão necessários, visto que no Brasil, são raras as publicações a respeito de infecções relacionadas aos implantes ortopédicos, as quais geram, além do desconforto ao paciente, custos sócio-econômicos e constituem-se num importante desafio à clínica médica. A presente pesquisa pretende contribuir de forma significativa na investigação de alguns dos mecanismos de formação dos biofilmes sobre os implantes ortopédicos.

O diagnóstico microbiológico da infecção relacionada ao implante de osteossíntese é de fundamental importância para a correta antibioticoterapia e prognóstico favorável de cura. Os resultados obtidos por observação direta ao microscópio de fluorescência demonstraram a presença de microrganismos viáveis e a presença de agentes bacterianos responsáveis por altas taxas de incidência de infecções hospitalares e contaminações em materiais ortopédicos usados para fixação óssea.

#### Agradecimentos

Ao Laboratório de Análises Clínicas – Setor de Microbiologia Clínica do NAC/FCFAR/UNESP; ao Eng. Tomaz Puga Leivas do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo – IOT-HCFMUSP; ao Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico (PADC/FCFAR – UNESP).

## ABSTRACT

*Microbiological analysis of the surface of metal orthopedic implants used to fix bone fractures*

In the majority of cases of bone fracture requiring surgery, orthopedic implants (screw-plate and screw) are used for osteosynthesis and the infections associated with such implants are due to the growth of microorganisms in biofilms. The objective of this study was to identify microorganisms recovered from osteosynthesis implants used to fix bone fractures, to assess the viability of the cells and the ability of staphylococci to adhere to a substrate and to determine their sensitivity/resistance to antimicrobials. After surgical removal, the metal parts of austenitic stainless steel (ASTM F138/F139 or ISO NBR 5832-1/9) were transported to the Laboratory of Clinical Microbiology, washed in buffer and subjected to ultrasonic bath at 40±2 kHz for 5 minutes. The sonicated fluid was used to seed solid culture media and cell viability was assessed under the microscope by with the aid of a fluorescent marker. The production of extracellular polysaccharide by *Staphylococcus* spp. was investigated by means of adhesion to a polystyrene plate. The profile of susceptibility to antimicrobials was determined by the disk diffusion assay. The most frequently isolated bacteria included coagulase-negative *Staphylococcus* resistant to erythromycin, clindamycin and oxacillin. Less frequent were *Pseudomonas aeruginosa* resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole and ampicillin, *Acinetobacter baumannii* resistant to ceftazidime, *Enterobacter cloacae* resistant to cephalothin, cefoxitin, cefazolin, levofloxacin and ciprofloxacin, *Bacillus* spp. and *Candida tropicalis*. The observation of slides by fluorescence microscope showed clusters of living cells embedded in a transparent matrix. The test for adherence of coagulase-negative *Staphylococcus* to a polystyrene plate showed that these microorganisms produce extracellular polysaccharide. In conclusion, the metal parts were colonized by bacteria related to orthopedic implant infection, which were resistant to multiple antibiotics.

**Keywords:** Austenitic stainless steel. Biofilm. Orthopedic implants. Osteosynthesis. Bacterial resistance. Sonication.

## REFERÊNCIAS

- Adachi K, et al. New quantitative image analysis of Staphylococcal biofilms on the surface of nontranslucent metallic biomaterials. *J Orthop Sci.* 2007;12(2):178-84.
- Alcaráz LE, Satorres SE, Lucero RM, Centorbi ONP. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. *Braz J Microbiol.* 2003;34(1):45-51.
- Arciola CR, An YH, Campoccia D, Baldi R, Donati ME, Montanaro L. Etiology of implant orthopedic infections: A survey on 1027 clinical isolates. *Int J Artif Organs.* 2005;28(11):1091-100.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(4):493-6.
- Barcs I, Valvinagy T, Panovics J. Clinical occurrence and virulence testing of coagulase-negative staphylococci. *Acta Microbiol Hung.* 1989;36(4):415-24.
- Berbari EF, Hanssen AD, Duffy MC, Steckelberg JM, Ilstrup DM, Harmsen WS, Osmon DR. Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. *Clin Infect Dis.* 1998;27(5):1247-54.
- Bernardi ACA, Pizzolitto EL, Pizzolitto AC. Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venosos central. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2007;28(1):57-66.
- Bronqui P, Rousseau A, Stein M, Drancourt M, Raoult D. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infected orthopedic prostheses with ceftazidime-ciprofloxacin antibiotic combination. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(11):2423-2425.
- Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials.* 2006;27(11):2331-2339.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococcus* to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985;22(6):996-1006.
- Costerton B, Cook G, Shirtliff M, Stoodley P, Posmore M. Biofilms, biomaterials, and device-related infections. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials Science, Introduction to Materials in Medicine.* São Diego: Elsevier Academic Press; 2004. p. 345-354.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284(5418):1318-22.
- Disegi JA, Eschbach L. Stainless steel in bone surgery. *Injury.* 2000;31(Suppl 4):2-6.
- Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(2):277-281.
- Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):881-890.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-193.
- Ehrlich GD, Stoodley P, Kathju S, Zhao Y, McLeod BR, Balaban N, Hu FZ, Sotereanos NG, Costerton JW, Stewart PS. Engineering approaches for the detection and control of orthopaedic biofilm infections. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;437:59-66.

- Greenberg RN, Newman MT, Shariaty S, Pectorl RW. Ciprofloxacin, Lomefloxacin, or Levofloxacin as treatment for chronic osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(1):164-6.
- Gristina AG, Naylor PT, Myrvik QN. Mechanisms of musculoskeletal sepsis. *Orthop Clin North Am*. 1991;22(3):363-71.
- Haas DW, Kaiser AB. Antimicrobial prophylaxis of infections associated with foreign bodies. In: Waldvogel A & Bisno AL. *Infections Associated with indwelling medical devices*. 3<sup>rd</sup> ed. Washington, DC: ASM Press; 2000. p. 395-406.
- Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med*. 1999;50:223-36.
- Khosravi AD, Ahmadi F, Salmanzadeh S, Dashtbozorg A, Montazeri EA. Study of bacteria isolated from orthopedic implant infections and their antimicrobial susceptibility pattern. *Can J Microbiol*. 2009;4(4):158-163.
- Hsieh PH, Lee MS, Hsu KY, Chang YH, Shih HN, Ueng SW. Gram-negative prosthetic joint infections: risk factors and outcome of treatment. *Clin Infect Dis*. 2009;49(7):1036-43.
- Liu Y, Li J. Role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the initial adhesion, growth and detachment of *Escherichia coli* in porous media. *Environ Sci Technol*. 2008;42(2):443-449.
- Long PH. Medical devices in orthopedic applications. *Toxicol Pathol*. 2008;36(1):85-91.
- Mousa HA. Infection following orthopaedic implants and bone surgery. *East Mediterr Health J*. 2001;7(4-5):738-43.
- Morand PC, et al. Specific distribution within the *Enterobacter cloacae* complex of strains isolated from infected orthopedic implants. *J Clin Microbiol*. 2009;47(8):2489-95.
- Muilwijk J, Walenkamp GHIM, Voss A, Wille JC, Van Den Hof S. Random effect modeling of patient-related risk factors in orthopaedic procedures: results from the Dutch Nosocomial Infection Surveillance Network 'PREZIES'. *J Hosp Infect*. 2006;62(3):319-326.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of clinical microbiology*. 9<sup>th</sup> ed. Washington: ASM PRESS; 2009. p. 2488.
- Nasab MB, Hassan MR. Metallic biomaterials of knee and hips: a review. *Trends Biomater Artif Organs*. 2000;24(1):69-82.
- Partanen J, Syrjälä H, Vähänikkilä H, Jalovaara P. Impact of deep infection after hip fracture surgery on function and mortality. *J Hosp Infect*. 2006;62(1):44-49.
- Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement*. Document M100–S21. Vol. 31. Wayne, PA: CLSI; 2011.
- Piper KE, Jacobson MJ, Cofield RH, Sperling JW, Sanchez-Sotelo J, Osmon DR, Steckelberg JM, Mandrekar JN, Fernandez SM, Patel R. Microbiologic diagnosis of prosthetic shoulder infection using implant sonication. *J Clin Microbiol*. 2009;47(6):1878-1884.
- Pitt WG, Ross SA. Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. *Biotechnol Prog*. 2003;19(3):1038-1044.
- Rochford ETJ, Jaekel DJ, Hickok NJ, Richards RG, Moriarty TF, Poulsson AHC. Bacterial interactions with polyaryletherekertone. In: Kurtz, SM (editor). *PEEK Biomaterials Handbook*. Waltham, MA: Elsevier; 2012. P. 93-117.
- Rodríguez B, Romero A, Soto O, Varona O. *Biomaterials for orthopedics - Applications of Engineering Mechanics in Medicine*. Mayaguez: University of Puerto Rico; 2004.
- Schmidt AH, Swiontkowski MF. Pathophysiology of infections after internal fixation of fractures. *J Am Acad Orthop Surg*. 2000;8(5):285-91.
- Stein A, Drancourt M, Raoult D. Ambulatory management of infected orthopedic implant. In: Waldvogel A, Bisno, A. *Infections associated with indwelling medical devices*. 3<sup>rd</sup> ed. Washington, DC: ASM Press; 2000. P. 211-230.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Savic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000;40(2):175-179.
- Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001;358(9276):135-38.
- Stoodley P, Conti SF, DeMeo PJ, Nistico L, Melton-Kreft R, Johnson S, Darabi A, Ehrlich GD, Costerton JW, Kathju S. Characterization of a mixed MRSA/MRSE biofilm in an explanted total ankle arthroplasty. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;62(1):66-74.
- Stoodley P, Nistico L, Johnson S, Lasko LA, Baratz M, Gahlot V, Ehrlich GD, Kathju S. Direct demonstration of viable *Staphylococcus aureus* biofilm in an infected total joint arthroplasty – A case report. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(4):1751-58.
- Trampuz A, Kerryl E, Piper MS, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, Mandrekar JN, Cockerill FR, Steckelberg JM, Greeleaf JF, Patel R. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med*. 2007;357(7):654-63.
- Trampuz A, Gilomen A, Fluckiger U, Frei R, Zimmerli W, Widmer A. Treatment outcome of infections associated with internal fixation devices: Results from a 5-year retrospective study (1999-2003). In: 45. ICAAC, American Society for Microbiology; 2005 December 16-19; Washington, DC; American Society for Microbiology; 2005. p. K-882.



- Trampuz A, Piper KE, Hanssen AD, Osmon DR, Cockerill FR, Steckelberg JM, Patel R. Sonication of explanted prosthetic components in bags for diagnosis of prosthetic joint infection is associated with risk of contamination. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):628-31.
- Trampuz A, Steckelberg JM, Osmon DR, Cockerill FR, Hanssen AD, Patel R. Advances in the laboratory diagnosis of prosthetic joint infection. *Rev Med Microbiol.* 2003;14:1-14.
- Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury.* 2006;37(Suppl. 2):S59-S66.
- Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infection update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly.* 2005;135(17-18):243-51.
- Tunney MM, Patrick S, Curran MD, Ramage G, Hanna D, Nixon JR, Gorman SP, Davis RI, Anderson N. Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol.* 1999;37(10):3281-90.
- Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR, Anderson N, Davis RI, Hanna D, Ramage G. Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. *J Bone Joint Surg Br.* 1998;80(4):568-72.
- Urban JA, Garvin KL. Prosthetic joint infection. *Curr Treat Options Infect.* 2003;5:309-321.
- von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(11):677-85.
- Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect.* 2002;4(4):481-9.
- Widmer AF. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. *Clin Infect Dis.* 2001;33(Suppl. 2):S94-106.
- Zimmerli WA, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 2004;351:1645-1645.
- Zimmerli WA, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc.* 1998;279(19):1537-1541.

Recebido em 30 de dezembro de 2011

Aceito para publicação em 19 de setembro de 2012

