

Osteomieliti: l'evoluzione della diagnostica microbiologica

Giovanni Gesu

Dipartimento di Microbiologia e Virologia
Ospedale Niguarda - Milano

Le problematiche associate alla corretta diagnosi delle infezioni protesiche (PJI) sono molteplici e dalla loro soluzione deriva l'individuazione dei germi responsabili e, quindi, la risposta al trattamento. Illustrerò di seguito sia i principali ostacoli ad una individuazione quanto più possibile certa del patogeno responsabile, sia le modalità attraverso cui ridurre i rischi di falsa positività o falsa negatività, ovvero le procedure per incrementare l'efficacia diagnostica. In **figura 1** sono riportati i patogeni più frequentemente isolati da Mo-

ran *et al.* in 112 pazienti con infezioni protesiche stratificate per esordio¹.

E' interessante notare che quasi la metà (46.7%) delle infezioni precoci (<3 mesi) ed il 20.8% di quelle tardive (>12 mesi) sembrano essere polimicrobiche, con una netta prevalenza di stafilococchi coagulasi-negativi (CoNS) ed *S. aureus* meticillino-sensibili (MSSA), quale che sia il momento di esordio dell'infezione. Inoltre, conforta sapere che gli stipti meticillino-resistenti di *S. aureus* (MRSA) non superano il 10%.

1. Patogeni isolati in corso di infezioni protesiche sulla base dell'esordio rispetto al momento dell'impianto¹



Organismo	Entro 3 mesi (n=77)		3-12 mesi (n=11)		Dopo 12 mesi (n=24)	
	n°	Casi (%) <3 mesi (CI)	n°	Casi (%) 3-12 mesi (CI)	n°	Casi (%) >12 mesi (CI)
<i>S. aureus</i> meticillino-sensibile	29	37.7 (27.7-48.8)	4	36.4 (15.2-64.6)	11	45.8 (27.9-64.9)
<i>S. aureus</i> meticillino-resistente	8	10.4 (5.4-19.2)	1	9.1 (1.6-37.7)	0	0 (0-0.138)
Stafilococchi coagulasi-negativi	37	48.0 (37.2-59.0)	2	18.2 (5.1-48.0)	8	33.3 (18.0-53.3)
<i>Streptococcus</i> spp.	5	6.5 (2.8-14.3)	3	27.3 (9.7-56.6)	3	12.5 (4.3-31.0)
<i>Enterococcus</i> spp.	10	13 (7.2-22.3)	2	18.2 (5.1-48.0)	0	0 (0-0.138)
Difteroidi	15	19.5 (12.2-29.7)	0	0 (0-0.2588)	1	4.2 (0.7-20.2)
HACEK	0	0 (0-0.475)	0	0 (0-0.2588)	3	12.5 (4.3-31.0)
Bacilli enterici Gram-negativi	7	9.1 (4.5-17.6)	0	0 (0-0.2588)	1	4.2 (0.7-20.2)
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	1.3 (0.2-7.0)	0	0 (0-0.2588)	0	0 (0-0.138)
<i>Acinetobacter</i> spp.	3	3.9 (1.3-10.8)	0	0 (0-0.2588)	0	0 (0-0.138)
Anaerobi	6	7.8 (3.6-16.0)	0	0 (0-0.2588)	2	8.3 (2.3-25.8)
Funghi	0	0 (2.8-14.3)	0	0 (0-0.2588)	0	0 (0-0.138)
Micobatteri	0	0 (0-0.475)	0	0 (0-0.2588)	0	0 (0-0.138)
Altri	5	6.5 (2.8-24.3)	0	0 (0-0.2588)	1	4.2 (0.7-20.2)
Campioni polimicrobici	36	46.7 (36.0-57.8)	1	9.1 (1.6-37.7)	5	20.8 (9.2-40.5)

Intervallo di confidenza (CI) 95% calcolato usando la procedura di Wilson; "Altri" includono *Leuconostoc* spp. e *Bacillus* spp.

Come porsi di fronte al risultato colturale?

Il microbiologo dovrebbe entrare in gioco ai primi segni di infezione, prima che l'infettivologo inizi una terapia empirica che comprometterebbe totalmente la diagnostica. Ad esame colturale completato, quale che sia il risultato, il microbiologo deve porsi comunque alcune domande (**figura 2**). Per le **colture negative**, i due quesiti più importanti riguardano il sito di raccolta del campione e se non sia il caso di ricorrere ad altre procedure diagnostiche (istologia, tecniche molecolari) per meglio evidenziare gli eventuali patogeni presenti. Altrettanto prudente deve essere l'atteggiamento in presenza di **colture positive**.

Colture positive

La prima domanda da porsi è se il germe isolato sia realmente causa di infezione o se non vi sia stata contaminazione e, con particolare riferimento a questa frequente possibilità, la sede e la modalità di prelievo sono fattori determinanti. L'importanza di questi fattori si deduce da due lavori che hanno evidenziato quanto sia difficile ottenere un valore predittivo positivo (PPV) nelle infezioni periprotetische. Nello studio di Spanghehl su 180 pazienti esaminati l'artrocentesi è risultata positiva solo nel 67% dei casi, arrivando ad un PPV

2. Quesiti da porsi in presenza di:

Colture negative

- ✓ Escludono la diagnosi di infezione?
- ✓ Antibiotici dovrebbero essere sospesi... (*almeno 2 settimane di wash-out*)
- ✓ Campione
 - aspirato articolare
 - campioni peri-operatori
- ✓ Altri criteri: istologia, tecniche molecolari?

Colture positive

- ✓ E' sempre un'infezione?
- ✓ Il germe isolato è la causa dell'infezione?
- ✓ Prelievo
 - aspirato dal tragitto fistoloso
 - aspirato articolare
 - campioni peri-operatori
- ✓ Numero di campioni positivi
- ✓ Specie isolata/e

3. Colture positive²

Aspirazione dal tragitto fistoloso

- ✓ Valore predittivo positivo

- <i>S. aureus</i>	78%
-Enterobacteriaceae	29%
- <i>P. aeruginosa</i>	8%
- <i>Streptococcus</i>	19%
- ✓ Solo il 44% delle colture della fistola di pazienti con osteomielite da *S. aureus* ha permesso di isolare questi batteri

Aspirazione del liquido articolare

- ✓ Valore predittivo positivo (180 pazienti)

-artrocentesi iniziale	67%	(CI95: 46-83)
-artrocentesi ripetute	77%	(CI95: 54-91)
-falsi positivi	33%	

del 77% se ripetuta e con un elevato valore di falsi positivi (33%)².

Limiti ancora maggiori sono presenti quando il sito di raccolta è il tragitto fistoloso: in questo caso la predittività è molto bassa per tutti i potenziali patogeni. *S. aureus*, il Gram-positivo meglio individuato da aspirato fistolare è stato isolato in meno della metà dei pazienti con osteomielite sostenuta da questo germe, un dato allarmante quando si pensi di utilizzare tale sede di raccolta per ottenere un'indicazione terapeuticamente utile (**figura 3**). I dati sono ancora peggiori quando si cerchi di isolare da tale sede le Enterobacteriaceae (PPV = 29%) o *P. aeruginosa* (PPV = 8%).

Assai utile per migliorare la capacità diagnostica è il prelievo di più campioni o l'utilizzo di altre procedure oltre quelle colturali, per esempio la biopsia. Uno studio su campioni provenienti da osteomielite di piede diabetico ha chiaramente dimostrato che la biopsia ossea può aumentare enormemente il PPV e che la concordanza fra biopsia e tampone è bassissima per alcuni patogeni, per esempio per gli stafilococchi coagulasi-negativi (2.8%), e modesta per lo stesso *S. aureus* (42.8%)

Colture negative

Le colture negative non sono meno problematiche di quelle positive anche se il valore predittivo negativo (NPV) di un aspirato del liquido sinoviale è prossimo al 98% con una sensibilità pari all'85% (**figura 4**).

4. Colture negative



Aspirazione del liquido articolare

- ✓ Valore predittivo negativo 98% e sensibilità 85%
-3 su 21 pazienti con infezione avevano colture negative del liquido articolare aspirato
- ✓ Ripetere aspirazione o revisione dell'artroplastica a seconda dei sintomi
- ✓ VES (30 mm/h) + CRP (10 mg/L) + coltura negativa del liquido articolare: **NVP 100%**

Anche in questi casi è possibile aumentare la predittività aumentando il numero di prelievi o abbinando al dato microbiologico alcuni indici di laboratorio: una coltura negativa che si associ ad elevati valori di VES e CRP ha un NPV del 100%. In presenza di colture negative da campioni peri-operatori, il microbiologo dovrebbe sempre porsi il quesito se la "negatività" è reale o se non vi siano altre cause di falsa negatività. La presenza di falsi negativi provenienti da campioni preoperatori è risolta se la revisione avviene in due tempi ed il microbiologo riceve dal chirurgo l'intera protesi, che può essere sottoposta a sonicazione, una procedura che consente di staccare interamente il biofilm dalle superfici metalliche. Solo in questo caso una coltura negativa corrisponde realmente all'assenza di patogeni.

Misure per una diagnostica batteriologica ottimale

Alla luce di quanto sin qui riportato appare necessario migliorare la diagnostica adottando strategie nuove (sonicazione o indagini molecolari) o combinando fra loro procedure complementari (microbiologia più istologia).

Utilizzo di campioni multipli prelevati da differenti siti

In primo luogo è utile reperire almeno 5-6 campioni prelevati da siti diversi (liquido articolare, pseudomembrane etc). L'incremento della capacità diagnostica utilizzando più cam-

pioni da siti diversi è stato evidenziato già un decennio fa da Atkins (**figura 5**): il rinvenimento di tre campioni positivi fa aumentare di ~9 volte la probabilità di infezione rispetto ad un singolo campione positivo.

Utilizzo dell'istologia

Un'altra misura utile a migliorare la diagnostica microbiologica nelle infezioni protesiche è la valutazione istologica dei tessuti infetti alla ricerca di marker cellulari ed umorali di flogosi. In presenza di segni acuti di flogosi il rinvenimento di più di 5 polimorfonucleati (PMN) per campo aumenta significativamente gli indici di predittività (PPV = 100%; NPV = 97%). Questi elevati valori si riducono sensibilmente quando la flogosi è cronica.

Tecniche combinate: microbiologia più istologia e sonicazione

Qualora si combini la positività microbiologica ottenuta da almeno 3 distinti campioni provenienti da altrettanti siti con la positività istologica (>5 PMN/HPF), il PPV supera il 95% (**figura 5**). L'uso degli ultrasuoni per staccare il biofilm dalla protesi, costituisce una delle tecniche emergenti. Con sensibilità intorno al 78% e specificità prossima al

5. L'istologia contribuisce alla diagnosi?^{3,4}



		PPV	NPV
Infiammazione acuta*	> 1 – 5 PMN/HPF	92%	100%
	> 5 PMN/HPF	100%	97%
Infiammazione cronica*	> 1 – 5 PMN/HPF	25%	91%
	> 5 PMN/HPF	44%	89%

*n° medio di cellule all'esame ≥10 HPF (x 400)

Numero di campioni positivi	Istologia		PPV (%)*
	+	-	
≥3	27	1	96.4**
	19	1	95***
2	2	6	25.2
1	5	42	10.6

*: confronto con istologia (> 5 PMN/HPF)

** : qualsiasi microorganismo; ***: per i CoNS

99% la coltura da sonicato è infatti altamente predittiva⁵.

Tecniche molecolari

L'amplificazione del genoma batterico o di altre componenti strutturali, per esempio la subunità ribosomale 16S, costituisce un'efficace procedura per evidenziare anche basse concentrazioni batteriche. In **figura 6** sono comparati i risultati dall'esame colturale standard sia verso amplificazione genica con reazione polimerasica (PCR) dell'RNA ribosomale 16S (PCR 16S rRNA) sia verso la coltura da sonicato in 120 pazienti sottoposti a revisione di anca in due tempi: è immediatamente evidente il basso grado di efficacia diagnostica dell'esame colturale convenzionale (4% di campioni positivi). La PCR e l'istologia risultano le indagini di gran lunga più sensibili: delle 25 colture da sonicato risultate positive, tutte erano anche positive alla PCR, mentre 60 colture negative sono risultate PCR positive.

6. Sonicazione e tecniche molecolari⁶

	N. Campioni	N. Positivi	% Positivi
Coltura standard	120	5	4%
Coltura del sonicato	120	25	22%
PCR 16S rRNA	118	85	72%
Score PMN > 1/HPF	81	59	73%

- ✓ Tutte le 25 colture positive erano PCR positive
 - S. aureus* (1)
 - CoNS (14)
 - P. acnes* (15)
- ✓ 60 pazienti con colture negative avevano PCR positive
- ✓ DNA batterico contaminante escluso perchè il limite inferiore di sensibilità era di 10⁴ cfu/mL

In conclusione si può affermare che la diagnostica microbiologica per migliorare la capacità di individuare i patogeni responsabili di osteomielite, deve utilizzare sia le tecniche convenzionali (coltura) sia quelle appannaggio di altre branche specialistiche, come l'istologia e la biologia molecolare.

Bibliografia

1. Moran E, Masters S, Berendt AR, et al. Atkins Guiding empirical antibiotic therapy in orthopaedics: The microbiology of prosthetic joint infection managed by debridement, irrigation and prosthesis retention. *J Infection* 2007; 55:1-7.
2. Spangehl MJ, Masri BA, O'Connell JX, et al. Prospective Analysis of Preoperative and Intraoperative Investigations for the Diagnosis of Infection at the Sites of Two Hundred and Two Revision Total Hip Arthroplasties. *The J Bone Joint Surg* 1999; 81:672-683.
3. Pandey R, Drakoulakis E, Athanasou NA. An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. *J Clin Pathol* 1999; 52:118-123.
4. Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, et al. Prospective evaluation of criteria for microbiologic diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. *J Clin Microbiol* 1998;36:2932-2939
5. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, et al. Sonication of Removed Hip and Knee Prostheses for Diagnosis of Infection. *N Engl J Med* 2007; 357:654-663.
6. Tunney MM, Patrick S, Curran MD, et al. Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3281-3290.