



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Sede di Alessandria

Corso di Laurea Magistrale in Biologia

Tesi di Laurea

**Diagnosi delle infezioni periprotetiche ortopediche: studio
prospettico e valutazione del contributo della biologia
molecolare nei campioni clinici**

Relatrice: Prof.ssa Elisa Gamalero

Correlatrice: Dott.ssa Samantha Sottotetti

Candidata: Asia Zavattaro

Matricola n° 20031299

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

Ai miei nonni, sempre

Indice

1. INTRODUZIONE	5
1.1 DEFINIZIONE DI INFEZIONE DELLA PROTESI ARTICOLARE	6
1.2 CLASSIFICAZIONE DELLE INFEZIONI DI PROTESI ARTICOLARI E DEI MEZZI DI OSTEOSINTESI	8
1.3 MICRORGANISMI ASSOCIATI A INFEZIONE DI PROTESI ARTICOLARE E MEZZI DI OSTEOSINTESI	11
1.4 IL BIOFILM	13
1.5 LA SONICAZIONE NELLA DIAGNOSI DELLE INFEZIONI PERIPROTESICHE	16
1.6 METODICHE COLTURALI E TERRENI DI CRESCITA	16
1.7 EUCAST E STANDARDIZZAZIONE DELLA SUSCETTIBILITÀ ANTIMICROBICA	19
1.7.1 BREAKPOINT CLINICI	19
1.7.2 INTERPRETAZIONE DELL'ANTIBIOGRAMMA	19
1.8 BIOLOGIA MOLECOLARE NELLE INFEZIONI OSTEOARTICOLARI E PERIPROTESICHE	21
1.9 RUOLO DELL'IGIENE DELLE MANI NELLA PREVENZIONE DELLE INFEZIONI	24
2. SCOPO DEL LAVORO	26
3. MATERIALI E METODI	27
3.1 FASE PRE-ANALITICA: MODALITÀ DI RACCOLTA, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI	27
3.2 RICHIESTA, ACCETTAZIONE E TRACCIABILITÀ DEI CAMPIONI	28
3.3 FASE ANALITICA: PROCESSAMENTO MICROBIOLOGICO DEI CAMPIONI	30
3.4 SONICAZIONE DEI MEZZI DI OSTEOSINTESI	31
3.5 TEMPI DI INCUBAZIONE E LETTURA DELLE COLTURE	32
3.6 IDENTIFICAZIONE MICROBIOLOGICA E ANTIBIOGRAMMA	32
3.6.1 VITEK	33
3.7 METODICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE, SISTEMA XPERT PER L'IDENTIFICAZIONE DI <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> E MRSA	36
3.8 CONTROLLO MICROBIOLOGICO DELLE MANI DEGLI OPERATORI SANITARI ..	40
3.9 RACCOLTA E ANALISI DEI DATI	41
4. RISULTATI	43
4.1 ANALISI DEI CAMPIONI CLINICI: DISTINZIONE TRA INFEZIONI ACCERTATE E CONTAMINAZIONI	43
4.2 DISTRIBUZIONE DEI MICRORGANISMI ISOLATI	44
4.3 INFEZIONI DA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> : DISTINZIONE TRA MRSA E MSSA E RUOLO DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE	46
4.4 RISULTATI DELL'ANTIBIOGRAMMA NEI MICRORGANISMI ISOLATI	48

4.5	RISULTATI DEL CONTROLLO MICROBIOLOGICO DELLE MANI DEGLI OPERATORI SANITARI	50
5.	<i>DISCUSSIONE</i>	52
5.1	DISTRIBUZIONE DEGLI ESITI MICROBIOLOGICI E CRITERI DI INTERPRETAZIONE	52
5.2	PREVALENZA DEI MICRORGANISMI ISOLATI E CONFRONTO CON LA LETTERATURA	53
5.3	RUOLO DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE: SISTEMA XPERT CEPHEID E UTILIZZO OFF-LABEL	53
5.4	PROFILI DI RESISTENZA ANTIBIOTICA.....	54
5.5	IL RUOLO DELLA SONICAZIONE NELL'ITER DIAGNOSTICO.....	55
5.6	IGIENE DELLE MANI E PREVENZIONE DELLE INFEZIONI CORRELATE ALL'ASSISTENZA.....	55
5.7	LIMITI DELLO STUDIO E PROSPETTIVE FUTURE.....	56
6.	<i>CONCLUSIONI</i>	58
7.	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	61
8.	<i>RINGRAZIAMENTI</i>	66

1. INTRODUZIONE

Le infezioni a carico delle protesi articolari rappresentano una delle complicanze più serie nell'ambito della chirurgia ortopedica protesica e richiedono un percorso diagnostico microbiologico estremamente accurato per garantire una gestione clinica adeguata. L'incidenza delle infezioni nelle artroprotesi di ginocchio si colloca tra lo 0,8% e l'1,9%, mentre nelle protesi totali d'anca varia dallo 0,3% all'1,7%. È prevedibile che, con l'aumento dell'età media della popolazione e il continuo perfezionamento delle tecniche chirurgiche, il numero degli interventi protesici cresca ulteriormente, comportando un incremento proporzionale anche delle complicanze infettive. (1)

L'incidenza di complicanze infettive cambia sensibilmente quando si considerano i dispositivi utilizzati per l'osteosintesi (come chiodi endomidollari, placche, viti, fili o perni transcutanei), con percentuali che oscillano dall'1–2% nelle fratture chiuse fino a oltre il 30% nei casi di fratture esposte. Nonostante le differenze tra protesi articolari e mezzi di sintesi, l'iter diagnostico condivide molte procedure e criteri, permettendo un approccio uniformato alla raccolta dei campioni e alla coltura microbiologica. (1)

Studi più recenti (Wildeman, 2021) mostrano come la mortalità a dieci anni, per qualsiasi causa, risulti più elevata nei pazienti con infezioni protesiche (45%) rispetto a quelli non infetti (29%). (2) Tale differenza può essere attribuita sia alla fisiologica evoluzione degli impianti nel tempo, sia alle difficoltà di gestione clinica e microbiologica di queste infezioni. Va inoltre ricordato che una definizione universalmente condivisa di infezione protesica non è ancora stata raggiunta, poiché ne esistono molteplici e non sempre sovrapponibili. In questo contesto, la valutazione clinica, sia preoperatoria che intraoperatoria, assume un ruolo centrale; le indagini di laboratorio, a loro volta, consentono di individuare i microrganismi coinvolti e di definirne la sensibilità agli antibiotici. (2)

I dispositivi protesici e i mezzi di osteosintesi rappresentano superfici abiotiche che, una volta introdotte nell'organismo, favoriscono l'adesione e la colonizzazione da parte di numerosi microrganismi. Sebbene spesso il sistema immunitario innato riesca a eliminarli, in alcune circostanze essi possono dare origine a infezioni severe, potenzialmente anche fatali, note come infezioni associate all'impianto (IAI). La principale difficoltà risiede nel fatto che i batteri aderenti al materiale implantare risultano meno vulnerabili alle risposte immunitarie (3); inoltre, questi microrganismi sono in grado di sopravvivere sulla superficie e formare biofilm, strutture che riducono l'efficacia dei trattamenti antimicrobici e favoriscono colonizzazioni persistenti. Per una corretta identificazione dei reali patogeni, è spesso necessario procedere alla disgregazione del biofilm prima delle usuali tecniche microbiologiche (4).

Le infezioni definite “impianto-correlate e sostenute da biofilm” costituiscono tuttora un ambito delicato e in evoluzione, in cui mancano indicazioni definitive e percorsi diagnostici pienamente condivisi; risulta quindi essenziale affrontare questi temi con particolare rigore, nell’ottica di migliorare ulteriormente le strategie diagnostiche disponibili. Questo lavoro si propone di descrivere gli strumenti microbiologici e molecolari più rilevanti per affinare l’iter diagnostico e offrire un supporto efficace al chirurgo ortopedico e allo specialista in malattie infettive. (4)

È necessario analizzare campioni multipli, raccolti in sedi appropriate con tecniche che riducano al minimo le contaminazioni, preferibilmente in assenza di terapia antibiotica per un periodo adeguato. Le procedure colturali devono includere trattamenti specifici e l’impiego di metodologie adatte al tipo di materiale analizzato. I risultati ottenuti devono poi essere interpretati considerando anche gli esiti delle valutazioni pre- e intraoperatorie, seguendo criteri ben definiti così da ottimizzare la sensibilità diagnostica e distinguere gli effettivi patogeni da eventuali contaminanti. (4)

L’incubazione delle colture, condotta in differenti condizioni atmosferiche, dovrebbe essere prolungata fino a 5–10 giorni per i terreni solidi e fino a 14 giorni per i terreni liquidi. I microrganismi isolati devono essere identificati accuratamente per determinarne il possibile ruolo eziologico e, di conseguenza, la fase interpretativa e il referto microbiologico assumono un’importanza fondamentale. Analogamente, il test di sensibilità agli antibiotici deve includere farmaci adeguati alla scelta della terapia più indicata, che dovrà essere somministrata con tempi e concentrazioni appropriati. (5)

È importante sottolineare che solo un approccio multidisciplinare, che coinvolga ortopedici, infettivologi e microbiologi, può aumentare significativamente le probabilità di eradicazione dell’infezione.

1.1 DEFINIZIONE DI INFEZIONE DELLA PROTESI ARTICOLARE

La definizione di infezione periprotetica è tuttora oggetto di discussione (5). Tuttavia, quella più comunemente adottata nella letteratura scientifica è la definizione proposta dal “*International Consensus Meeting on Periprosthetic Joint Infection*” (6), secondo la quale la diagnosi può essere formulata in presenza di almeno uno dei seguenti criteri:

- a) isolamento dello stesso microrganismo, con identico fenotipo, in almeno due colture ottenute da materiali periprotetici;
- b) presenza di una fistola che metta in comunicazione la cute con l’impianto protesico;
- c) riscontro di almeno tre dei cinque criteri minori che includono: l’incremento dei valori ematici di

VES (Velocità di Eritrosedimentazione) e PCR (Proteina C Reattiva) (7); il numero elevato di leucociti nel liquido articolare o positività “++” al test dell’esterasi leucocitaria eseguito mediante striscia reattiva; percentuale aumentata di neutrofili nel liquido articolare (8;9) ; evidenza istologica di infiammazione acuta dei tessuti periprotetici (10) e crescita microbica da un singolo campione.

È importante sottolineare che, nonostante in passato la presenza di materiale purulento nello spazio periprotetico venisse considerata un segno patognomonico di infezione, questo reperto non è più incluso tra i criteri minori. La purulenza, infatti, può essere presente anche in condizioni non infettive, come nelle reazioni avverse dei tessuti ai detriti da usura o nei fenomeni di corrosione che si osservano in alcuni impianti d’anca, chiamati metallo-metallo, che utilizzano una testa femorale e una coppa acetabolare interamente in metallo, offrendo maggior stabilità soprattutto per i pazienti più giovani. (11)

I valori soglia dei marker infiammatori differiscono tra infezioni acute e croniche:

- **Infezioni acute:**
 - PCR > 100 mg/L
 - leucociti nel liquido articolare > 10.000/μL con neutrofili > 90%
- **Infezioni croniche:**
 - VES > 30 mm/h
 - PCR > 10 mg/L
 - leucociti nel liquido articolare > 3.000/μL con neutrofili > 80%

Questi indicatori possono variare in base a età, sesso e comorbidità del paziente e possono rimanere alterati fino a sei settimane dopo un intervento chirurgico. (12)

Un ulteriore elemento diagnostico è rappresentato dall’esame istologico dei tessuti periprotetici. La presenza di almeno 5–10 neutrofili per campo ad alto ingrandimento, in almeno cinque campi, è considerata indicativa di infezione, fatta eccezione per i casi entro i primi tre mesi dall’intervento o in presenza di malattie articolari infiammatorie. (13)

Oltre ai criteri tradizionali, sono state proposte classificazioni più recenti che mirano a stratificare l’infezione sulla base della sua gravità e delle caratteristiche del paziente. La World Association Against Infection in Orthopaedics and Trauma (W.A.I.O.T.) ha elaborato un modello innovativo che integra tre aspetti fondamentali: la capacità dei test diagnostici di confermare o escludere

un'infezione, le caratteristiche cliniche del quadro infettivo e la distinzione tra reperti ottenuti prima o durante l'intervento chirurgico e le successive conferme postoperatorie. (14)

Nel sistema proposto, a ogni test con specificità superiore al 90% viene assegnato un punteggio positivo, mentre ai test con sensibilità maggiore del 90% viene attribuito un punteggio negativo. La combinazione dei valori ottenuti consente di collocare il paziente in uno dei cinque scenari diagnostici previsti: assenza di infezione, contaminazione, malfunzionamento dell'impianto associato alla presenza di biofilm, infezione di basso grado oppure infezione di alto grado. (14)

Questa classificazione permette di interpretare meglio la relazione tra i risultati diagnostici e i sintomi clinici. Un punteggio inferiore a zero indica che i disturbi possono essere legati a problematiche meccaniche come usura, detriti, metallosi, instabilità articolare, lussazioni, fratture o dolore di origine neuropatica. (14) Quando il punteggio è inferiore oppure uguale a zero ma i sintomi risultano difficili da spiegare, come dolore persistente, gonfiore o rigidità, si può ipotizzare la presenza di biofilm responsabile di un malfunzionamento dell'impianto o di una infezione a bassa carica batterica. Un punteggio pari o superiore a 1 suggerisce invece un quadro clinico più tipico delle infezioni ad alto grado, in cui compaiono frequentemente dolore, tumefazione, arrossamento, aumento della temperatura locale e limitazione funzionale. (15)

Il sistema proposto dalla W.A.I.O.T. è stato validato clinicamente e retrospettivamente su una coorte internazionale di 210 pazienti sottoposti a revisione protesica dell'anca o del ginocchio in sei centri distribuiti tra Africa, Asia, Europa e Sud America, con un follow-up minimo di due anni. L'analisi ha confermato l'affidabilità di questa classificazione nel distinguere le diverse forme di infezione periprotetica e nell'orientare più efficacemente il percorso diagnostico-terapeutico. (15)

1.2 CLASSIFICAZIONE DELLE INFEZIONI DI PROTESI ARTICOLARI E DEI MEZZI DI OSTEOSINTESI

Possono essere classificate sia le infezioni delle protesi articolari sia quelle dei mezzi di osteosintesi osservando innanzitutto il momento in cui compaiono i sintomi dopo l'intervento. Questo criterio temporale, pur non essendo da solo sufficiente a definire prognosi e strategia terapeutica, permette comunque di riconoscere alcune caratteristiche ricorrenti legate alla modalità di acquisizione dell'infezione, alla patogenicità dei microrganismi coinvolti e alla possibile maturità del biofilm. (13)

Nel caso delle protesi articolari, si distinguono innanzitutto le infezioni precoci, che insorgono nelle prime 4–6 settimane dall'impianto, oppure entro i primi tre mesi. (12) Queste forme, in genere acquisite durante l'intervento chirurgico a causa della dispersione microbica sul campo operatorio,

possono talvolta derivare anche dalla diffusione ematogena di un focolaio infettivo non bonificato prima della sostituzione articolare. Sono più spesso sostenute da microrganismi dotati di elevata patogenicità, come *Staphylococcus aureus* o bacilli Gram-negativi. (12) Quando la diagnosi è molto precoce, cioè entro tre settimane, è possibile che la colonizzazione batterica non sia ancora estesa, pur sapendo che il biofilm inizia a strutturarsi già dopo poche ore o pochi giorni dall'impianto. In questa fase, se la localizzazione dei batteri è raggiungibile con un adeguato debridement, una procedura medica che rimuove tessuto danneggiato, morto o infetto per favorire la crescita di tessuto sano e accelerare la guarigione, è ancora perseguibile un approccio conservativo che associa pulizia chirurgica accurata, eventuale sostituzione delle componenti modulari e ritenzione dell'impianto, il tutto accompagnato da una terapia antibiotica prolungata e di massima efficacia. Tuttavia, il semplice riferimento temporale non garantisce di per sé il successo del trattamento, poiché il risultato dipende dalla reale accessibilità chirurgica delle aree colonizzate. (12)

Le infezioni ritardate delle protesi articolari, che compaiono tra tre e ventiquattro mesi dall'intervento, rappresentano un'altra categoria. Anche in questo caso l'origine può essere esogena, legata allo spargimento o diffusione di contaminanti all'interno del campo chirurgico durante un intervento, fenomeno chiamato shedding intraoperatorio, oppure ematogena, soprattutto nei pazienti che presentano fattori di rischio. (13) Si tratta tipicamente di infezioni sostenute da microrganismi a bassa o media patogenicità, come gli stafilococchi coagulasi negativi, *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp. o *Cutibacterium acnes*, ma possono essere coinvolti anche agenti più virulenti se presenti a bassa carica. In queste situazioni si presume che il biofilm sia ormai stabilizzato e difficilmente aggredibile tramite un approccio conservativo. (15) Per questo motivo la strategia più condivisa è quella non conservativa: rimozione dell'impianto protesico, posizionamento di uno spaziatore in cemento, trattamento antibiotico a elevata performance per un periodo generalmente compreso tra quattro e sei settimane, e solo in seguito, una volta verificata la completa eradicazione dell'infezione, il reimpianto della protesi. La decisione di procedere a quest'ultima fase deve essere supportata dalla stabilizzazione dei parametri infiammatori, in particolare la normalizzazione della PCR, che guida in modo più affidabile rispetto a una durata prefissata della terapia. (16)

Le infezioni tardive delle protesi articolari, quelle che insorgono dopo i ventiquattro mesi dall'impianto, hanno in genere un'origine ematogena e derivano da focolai remoti o da fenomeni di traslocazione batterica da sedi ricche di flora microbica, come l'intestino o il cavo orale. (17) Anche per queste, in presenza di sintomi da meno di tre settimane, si è ipotizzato che possa persistere una condizione di biofilm non ancora completamente maturo, tale da consentire un tentativo terapeutico conservativo analogo a quello delle forme precoci. Tuttavia, soprattutto quando l'infezione è

sostenuta da *S. aureus*, le percentuali di fallimento si sono rivelate elevate, rendendo necessario approfondire ulteriormente quale sia la strategia chirurgica più efficace per questo tipo di presentazioni. (17)

Un criterio temporale simile viene utilizzato anche per classificare le infezioni dei mezzi di osteosintesi, pur con alcune differenze dovute alla natura stessa dei dispositivi e al contesto traumatico nel quale spesso vengono impiantati. (17)

Le infezioni precoci compaiono entro due settimane dall'intervento o dal trauma e sono quasi sempre legate alla contaminazione perioperatoria o al trauma stesso. I microrganismi coinvolti sono tipicamente altamente virulenti, come *S. aureus* e bacilli Gram-negativi. (18)

Le infezioni ritardate, che si manifestano tra due e dieci settimane, sono anch'esse correlate al trauma o alla procedura chirurgica, ma presentano più spesso microrganismi a bassa virulenza, come gli stafilococchi coagulasi negativi. (18)

Infine, quelle tardive, che compaiono oltre dieci settimane, derivano ancora una volta da contaminazione intraoperatoria o legata al trauma, e sono generalmente sostenute da patogeni a bassa virulenza; solo occasionalmente si osservano forme a origine ematogena da focolai remoti. (18)

La gestione delle infezioni osteo-articolari associate a protesi rappresenta una sfida clinica complessa e richiede spesso un approccio multidisciplinare che integri terapia antibiotica e trattamento chirurgico. Le strategie chirurgiche possono variare in funzione della durata dell'infezione, del patogeno coinvolto e delle condizioni generali del paziente. (18)

Tra gli approcci più utilizzati rientra il debridement chirurgico con mantenimento dell'impianto (DAIR o DYER), che prevede un lavaggio accurato dell'articolazione e la rimozione dei tessuti infetti, associato a terapia antibiotica mirata. Nei casi più complessi o nelle infezioni croniche può rendersi necessaria la rimozione della protesi e la sua sostituzione temporanea con uno spacer antibiotato, seguita da un successivo reimpianto.

Entrambe le procedure prevedono il prelievo intraoperatorio di campioni periprotetici, da tre a sette campioni, per l'analisi microbiologica fondamentale per l'identificazione dell'agente eziologico e per la valutazione dell'efficacia del trattamento.

1.3 MICRORGANISMI ASSOCIATI A INFEZIONE DI PROTESI ARTICOLARE E MEZZI DI OSTEOSINTESI

I microrganismi coinvolti nelle infezioni di protesi articolari e dei mezzi di osteosintesi sono numerosi e diversificati, come riportato nelle principali casistiche. Tra tutti, gli stafilococchi rappresentano i patogeni più frequentemente isolati, indipendentemente dal momento di insorgenza dell'infezione.

Nelle infezioni protesiche, in particolare, prevalgono gli stafilococchi coagulasi negativi, batteri che non producono l'enzima coagulasi, capace di far coagulare il sangue, con *Staphylococcus epidermidis* in primo piano ma anche *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus caprae*, che rappresentano circa il 30–43% degli isolamenti, seguiti da *S. aureus* (coagulasi positivo), presente nel 12–23% dei casi. (19)

Batteri Gram-positivi come streptococchi ed enterococchi compaiono in circa un decimo degli episodi, mentre i batteri Gram-negativi si collocano generalmente tra il 10 e il 17%, pur essendo riportate anche serie con valori più bassi.

Tra gli anaerobi gram-positivi, *Cutibacterium acnes* merita particolare attenzione per la sua frequenza e per il ruolo predominante nelle infezioni della spalla. È inoltre rilevante ricordare che una quota non trascurabile di queste infezioni, variabile tra il 10 e il 20%, presenta una natura polimicrobica. (20)

Quando l'infezione ha un'origine ematogena, emerge il ruolo di *S. aureus*, seguito da streptococchi e da bacilli Gram-negativi, pur restando possibile l'isolamento di stafilococchi coagulasi negativi in una quota consistente di casi.

Le sorgenti di disseminazione ematogena sono molteplici: infezioni respiratorie possono essere associate a *Streptococcus pneumoniae*; condizioni gastrointestinali o disbiosi rendono possibile la traslocazione di *Salmonella*, *Bacteroides* o streptococchi; le vie urinarie possono originare quadri batteriemici sostenuti da *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp. o *Enterobacter* spp.; mentre le procedure odontoiatriche rappresentano un serbatoio noto per gli streptococchi del gruppo *viridans*. (20)

Nel contesto dei mezzi di osteosintesi, invece, si osserva più spesso il predominio di *S. aureus*, accompagnato da una frequente presenza di infezioni polimicrobiche. Rimane comunque possibile l'introduzione di numerosi altri agenti per inoculo diretto o tramite diffusione ematogena, inclusi micobatteri e funghi. Le infezioni micotiche, pur rappresentando una minoranza (circa l'1–3%),

costituiscono complicanze rilevanti, soprattutto in pazienti con comorbidità. La maggior parte di queste è dovuta a specie di *Candida*, in particolare *C. albicans*. (21)

In generale, qualsiasi microrganismo isolato da un campione ottenuto in associazione a una protesi o a un altro dispositivo ortopedico deve essere considerato un potenziale agente eziologico. Nonostante ciò, la diagnosi rimane spesso complessa, principalmente perché molte specie non vengono rilevate con le metodiche colturali tradizionali. (21)

Questa difficoltà deriva dal fatto che i patogeni coinvolti nelle infezioni osteoarticolari e protesiche tendono a organizzarsi in biofilm che modificano profondamente il loro comportamento biologico.

All'interno del biofilm, i microrganismi assumono caratteristiche peculiari con importanti implicazioni diagnostiche e terapeutiche:

- La diversità fenotipica rappresenta un elemento fondamentale, le cellule possono differenziarsi in sottopopolazioni a crescita lenta, formando colonie piccole e difficili da individuare nei tempi e con gli approcci colturali convenzionali. Da un punto di vista clinico, questa lentezza si traduce spesso in un aumento del rischio di fallimento terapeutico e giustifica la necessità di trattamenti antibiotici prolungati.
- La produzione di una matrice polisaccaridica extracellulare è un altro aspetto decisivo che crea un microambiente protettivo: le cellule comunicano efficacemente tra loro, la persistenza dei microrganismi è favorita e la fagocitosi risulta fortemente ostacolata.
- L'adesione alle superfici protesiche riduce la probabilità di recuperarli tramite la semplice analisi del liquido articolare, motivo per cui la diagnosi richiede spesso campioni multipli, sia protesici sia tissutali. (21)

Queste peculiarità rendono estremamente difficile eliminare in modo efficace i microrganismi organizzati nel biofilm e spiegano perché spesso non sia possibile eradicare l'infezione mantenendo in sede la componente colonizzata. Quando la rimozione non è praticabile, la terapia deve basarsi su antibiotici capaci di penetrare all'interno del biofilm, anche se la sensibilità rilevata con le metodiche standard non è necessariamente predittiva della reale attività richiesta in queste condizioni. (20) Attualmente non sono disponibili nei laboratori di routine strumenti standardizzati per valutare l'efficacia degli antimicrobici contro i microrganismi in biofilm, benché diverse società scientifiche, tra cui ESCMID, stiano lavorando per definire criteri e metodiche che permettano, almeno in casi particolari, di valutare parametri come la MIC (Minima Concentrazione Inibente) e la MCB (Minima Concentrazione Battericida) in presenza di tali strutture. Parametri fondamentali per selezionare

antibiotici efficaci e guidare a terapie più mirate, specie nei casi in cui il dispositivo non possa essere rimosso. (21)

La MIC indica la minima concentrazione di un antimicrobico necessaria a inibire la crescita dei microrganismi all'interno del biofilm. Poiché i batteri nel biofilm mostrano un fenotipo molto più tollerante agli antibiotici rispetto ai batteri liberi, la MIC risulta molto più alta rispetto a quella tradizionale. (21)

La MCB rappresenta la minima concentrazione di un antibiotico necessaria a determinare un'azione battericida sui batteri organizzati nel biofilm, ancora più difficile da raggiungere rispetto alla MIC proprio a causa della protezione conferita dalla matrice extracellulare e dalla ridotta attività metabolica delle cellule nel biofilm. (21)

1.4 IL BIOFILM

Alla base della particolare complessità diagnostica e terapeutica delle infezioni osteoarticolari e periprotesi vi è la capacità di numerosi microrganismi di formare biofilm sulle superfici abiotiche degli impianti ortopedici. (Figura 1) Questa modalità di crescita offre ai batteri un vantaggio determinante, trasformando un'infezione potenzialmente eradicabile in una condizione cronica, difficile da riconoscere e spesso resistente ai trattamenti convenzionali. La capacità dei microrganismi di aderire e organizzarsi in strutture complesse è ciò che spiega la persistenza dell'infezione, la difficoltà nell'isolarne l'agente eziologico e l'elevato tasso di fallimento terapeutico. (22)

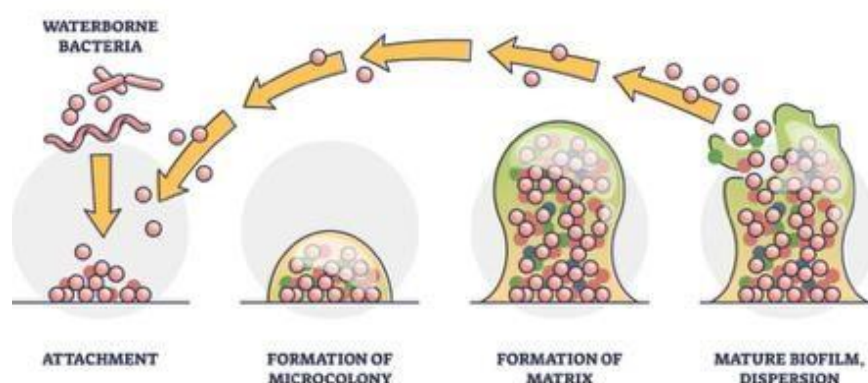


Figura 1: Rappresentazione grafica della formazione del Biofilm batterico su di una superficie

Il biofilm è una comunità strutturata di cellule microbiche immerse in una matrice extracellulare di natura polisaccaridica, proteica e lipidica. Quando un impianto viene inserito, la sua superficie immediatamente ricoperta da proteine plasmatiche dell'ospite diventa un substrato ideale per

l'adesione iniziale dei batteri. Tale adesione può avvenire già nelle prime ore successive all'intervento, molto prima che compaiano i sintomi clinici. (22)

Nei giorni successivi, i microrganismi iniziano a proliferare formando colonie organizzate, fino allo sviluppo di una struttura tridimensionale matura in grado di resistere a condizioni ambientali sfavorevoli, con la formazione di microambienti con concentrazioni variabili di ossigeno, pH e nutrienti. Ne derivano sottopopolazioni batteriche con fenotipi diversi, tra cui cellule persistenti a metabolismo estremamente ridotto, che contribuiscono alla tolleranza nei confronti degli antimicrobici. (22)

Nel contesto ortopedico, la presenza del biofilm interferisce direttamente con i meccanismi diagnostici e terapeutici. Da un lato, l'adesione alle superfici protesiche e la presenza della matrice rendono difficile recuperare i microrganismi sia dal liquido articolare sia dai campioni tissutali. È per questo che la diagnosi richiede spesso tecniche dedicate, come l'utilizzo di più prelievi tissutali o l'impiego della sonicazione, in grado di disgregare parzialmente il biofilm e liberare le cellule al suo interno. (22)

Dall'altro lato, la stessa struttura protettiva del biofilm ostacola l'efficacia del sistema immunitario e limita la diffusione degli antibiotici. La matrice extracellulare rallenta la penetrazione delle molecole antimicrobiche, mentre le sottopopolazioni a crescita lenta e le cellule persistenti risultano intrinsecamente meno sensibili ai farmaci che agiscono sui processi metabolici attivi. Ne deriva una tolleranza antimicrobica che non coincide con la resistenza genetica tradizionale, ma che produce un effetto altrettanto rilevante sul fallimento terapeutico. (23)

Tali caratteristiche spiegano perché, nonostante la sensibilità rilevata con le metodiche standard in coltura planctonica, molti antibiotici non siano realmente efficaci nel contesto del biofilm. L'assenza, allo stato attuale, di metodiche standardizzate di laboratorio per valutare in modo routinario l'attività degli antimicrobici all'interno del biofilm rappresenta un ulteriore limite. A livello di ricerca, tuttavia, si sta lavorando per introdurre parametri dedicati come la MIC e la MCB, che consentirebbero di descrivere in modo più accurato la reale efficacia dei farmaci all'interno di queste strutture complesse. (23)

Nel complesso, il biofilm costituisce il principale motivo per cui le infezioni protesiche e dei mezzi di osteosintesi si manifestano come quadri clinici difficili da trattare, caratterizzati da alta recidiva, necessità di terapie prolungate e frequente ricorso alla rimozione del dispositivo. Comprenderne la

biologia è dunque essenziale per impostare strategie diagnostiche e terapeutiche adeguate, orientando sia la scelta degli antibiotici sia le decisioni chirurgiche. (23)

Il biofilm è stato visualizzato sui terreni COS e SCS dopo semina del campione chirurgico, mostrando un aspetto mucoide, viscoso e filamentoso. (Figura 2 e 3)

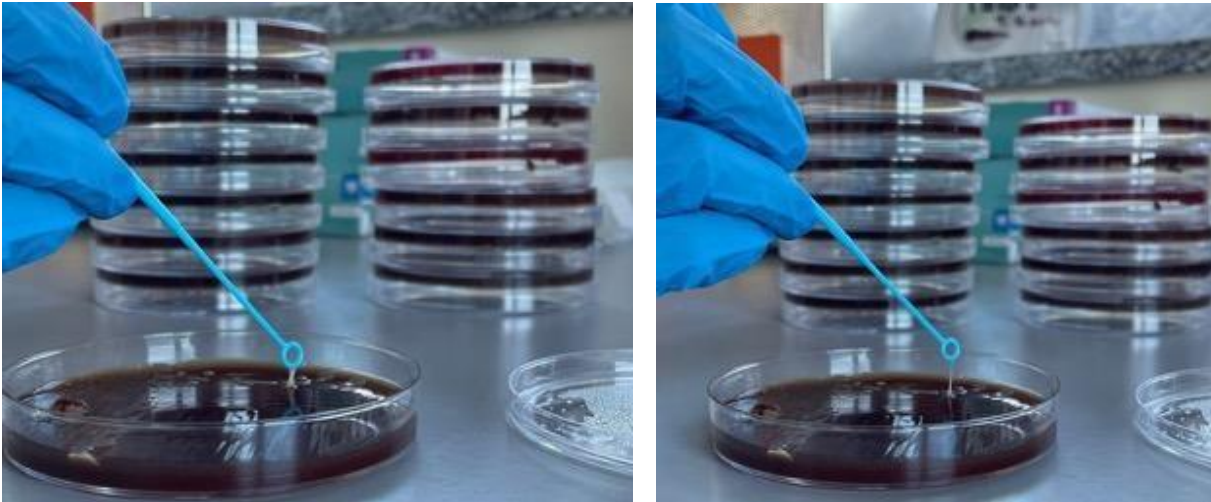


Figura 2 e 3: String test positivo, da colonia su piastra Petri mediante ansa sterile si tocca la colonia per la valutazione della crescita in biofilm.

1.5 LA SONICAZIONE NELLA DIAGNOSI DELLE INFEZIONI PERIPROTESICHE

La complessità della diagnosi microbiologica nelle infezioni periprotetiche è strettamente legata alla presenza del biofilm, che riduce l'efficacia delle tecniche colturali tradizionali e limita il rilascio spontaneo di microrganismi nel liquido articolare. Per superare questo limite, è stata introdotta la metodica della sonicazione, mediante l'utilizzo di un sonicatore (Figura 4). (23)



Figura 4: Sonicatore

La sonicazione applica onde ultrasoniche a bassa frequenza (solitamente 35–40 kHz) alle componenti protesiche rimosse chirurgicamente. Le vibrazioni meccaniche prodotte facilitano la disgregazione del biofilm e il distacco dei microrganismi che vi sono inglobati. In questo modo si ottiene un campione più rappresentativo della flora microbica effettivamente coinvolta nell'infezione, incrementando la probabilità di isolamento anche nei casi caratterizzati da cariche batteriche molto basse o da batteri a crescita lenta. (24)

Questo permette di aumentare significativamente la probabilità di recupero colturale, con un beneficio particolarmente evidente nelle infezioni croniche e nei pazienti che hanno già ricevuto terapia antibiotica. La sonicazione da un lato migliora la capacità di recuperare il microrganismo responsabile, dall'altro offre un supporto clinico rilevante per orientare scelte terapeutiche più mirate. (24)

1.6 METODICHE COLTURALI E TERRENI DI CRESCITA

Nell'ambito della microbiologia clinica, i terreni di coltura rappresentano uno strumento fondamentale per l'isolamento dei microrganismi presenti nei campioni biologici.

Si differenziano in terreni selettivi e non selettivi: i selettivi inibiscono la crescita di alcuni tipi di microrganismi, permettendo solo a quelli desiderati di crescere. Contengono quindi fattori inibitori come antibiotici, coloranti o sali che bloccano lo sviluppo di specie non desiderate. I terreni non selettivi consentono la crescita di un'ampia varietà di microrganismi senza alcuna inibizione essendo costituiti da nutrienti di base che supportano la crescita di molti tipi di microrganismi. (25)



Figura 5: Piastre Agar Sangue (COS) con microrganismi beta-emolitici Columbia Agar sangue (COS) (Figura 5). Questi terreni rappresentano lo standard per la coltura primaria dei campioni prelevati da impianti ortopedici, permettendo di isolare stafilococchi, streptococchi, bacilli Gram-negativi e anaerobi, inclusi microrganismi a crescita lenta come *Cutibacterium acnes*, particolarmente rilevante nelle infezioni croniche della spalla. (25)



Figura 6: Brodo THIO-T

Accanto ai terreni svolgono un ruolo determinante i brodi di arricchimento, che permettono di aumentare significativamente la probabilità di isolare i microrganismi presenti in quantità molto basse o danneggiati da trattamenti antibiotici precedenti. (26) A differenza dei terreni solidi, che richiedono un numero minimo di cellule per consentire una crescita visibile, i brodi offrono un ambiente ottimale che favorisce la moltiplicazione anche di cellule sofferenti o rare. Questa caratteristica li rende particolarmente utili nelle infezioni croniche o nei pazienti sottoposti a terapie antibiotiche prima del prelievo, situazioni in cui la coltura diretta potrebbe risultare poco sensibile. (26)

Tra questi, i brodi al tioglicolato (THIO) (Figura 6) sono tra i più diffusi, poiché permettono la crescita sia dei batteri aerobi sia degli anaerobi obbligati, creando un gradiente di ossigeno adatto a recuperare microrganismi che non sopravviverebbero sulle piastre standard. La sua composizione è infatti studiata per creare un ambiente aerobio in alto e anaerobio in basso e ridurre il potenziale redox grazie a suoi componenti come estratto di lievito, glucosio o destrosio, cloruro di sodio che mantiene l'equilibrio osmotico, agenti riducenti come il tioglicolato di sodio e L-cisteina per creare l'ambiente anaerobio reagendo con l'ossigeno molecolare disciolto e acqua purificata. Questo è particolarmente importante per isolare agenti a lenta crescita o intrappolati nel biofilm. (26)

L'utilizzo combinato di piastre e brodi di arricchimento consente di aumentare la sensibilità diagnostica, recuperare microrganismi difficili da coltivare e ottenere isolati idonei alle analisi successive di identificazione e determinazione della suscettibilità antimicrobica che avviene attraverso l'utilizzo del sistema Vitek 2 Compact, una piattaforma automatizzata che consente di identificare rapidamente i microrganismi e di determinare il loro profilo di sensibilità a diversi antibiotici. (27)

Il funzionamento del Vitek si basa sull'utilizzo di schede contenenti diversi substrati e antibiotici, che vengono inoculate con la sospensione batterica ottenuta dai campioni coltivati. Il sistema monitora in modo continuo la crescita microbica e confronta i risultati con database interni, fornendo sia l'identificazione del microrganismo sia la concentrazione minima inibente (MIC) per ciascun antibiotico testato. Questo approccio permette al microbiologo di fornire in tempi rapidi informazioni essenziali al clinico, facilitando la scelta di una terapia mirata e più efficace. (27)

1.7 EUCAST E STANDARDIZZAZIONE DELLA SUSCETTIBILITÀ ANTIMICROBICA

L'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) fornisce linee guida standardizzate e aggiornate per l'interpretazione dei risultati dei test di sensibilità antimicrobica.

Ha il compito di sviluppare linee guida pratiche per l'individuazione di specifici meccanismi di resistenza antimicrobica di importanza clinica e / o epidemiologica. EUCAST è stato sviluppato principalmente per l'uso di routine nei laboratori clinici. (28)

EUCAST è un comitato organizzato congiuntamente dalla ESCMID (Società Europea di Microbiologia Clinica e Malattie Infettive), dall'ECDC (Centro europeo per la prevenzione e controllo delle malattie) e dai sei comitati nazionali attivi in passato. Ad oggi, i breakpoint clinici definiti da EUCAST sono gli unici ad essere ufficialmente riconosciuti dall'EMA (European Medicines Agency), organismo che autorizza l'immissione in commercio dei farmaci nei paesi dell'Unione Europea. I laboratori di microbiologia italiani hanno adottato le linee guida EUCAST dal 2011 (in precedenza avevano adottato gli standard statunitensi del CLSI). (28)

1.7.1 BREAKPOINT CLINICI

I breakpoint clinici vengono stabiliti valutando diversi parametri: microbiologici, farmacologici (rapporto tra PK/PD e risposta al trattamento) e clinici (evidenze dalla letteratura). I breakpoint sono usati per definire la categoria clinica di suscettibilità: il microorganismo può risultare sensibile (quando la crescita ceppo batterico è inibita in vitro da una concentrazione di antibiotico che è associata con un'alta probabilità di successo terapeutico), intermedio (sensibile a dosaggio modificato), o resistente (elevata probabilità di fallimento terapeutico) ad una determinata molecola. (28) Per ogni combinazione organismo-antibiotico sono impostati due cut-off (in questo caso ci sono 3 categorie di interpretazione: sensibile, intermedio, resistente) o, semplicemente, un cut-off (stabilendo due categorie di interpretazione: suscettibile o resistente). Lo scopo di stabilire dei breakpoint clinici è quello di valutare i valori di MIC per i quali possiamo separare i ceppi in cui vi è un'alta probabilità di successo del trattamento in vivo, da quelli il cui trattamento è più probabilmente fallimentare, a causa di un meccanismo di resistenza. Per questo motivo vengono definiti breakpoint "clinici". I breakpoint EUCAST sono disponibili e consultabili gratuitamente, sia per il metodo Kirby-Bauer che per la micro-diluizione in brodo (<https://www.eucast.org/>).

1.7.2 INTERPRETAZIONE DELL'ANTIBIOGRAMMA

L'interpretazione dell'antibiogramma è molto più che la semplice categorizzazione della suscettibilità di un microorganismo a vari antimicrobici e dovrebbe prevedere un tentativo di interpretazione "fenotipica" dei meccanismi di resistenza che possono essersi sviluppati.

La lettura e la comprensione dell'antibiogramma, e quindi la sua interpretazione, si basa sul riconoscimento del possibile meccanismo che sta alla base della resistenza, che può essere esteso ai farmaci non testati (come, ad esempio, la presenza di stafilococchi oxacillina-resistenti determina la resistenza a tutti i beta-lattamici, tranne alcune nuove cefalosporine Ceftarolina o Ceftobiprolo). È importante, nella pratica clinica, essere aggiornati sulla resistenza agli antibiotici, ed avere la possibilità di riconoscere i fenotipi eccezionali di resistenza, le resistenze naturali e le combinazioni di antibiotici-organismi per le quali c'è un'elevata probabilità di sviluppare una resistenza per mutazione semplice (<https://www.eucast.org/>).

La correlazione tra i dati ottenuti in vitro (MIC o aloni di inibizione) e la reale efficacia clinica del farmaco dipende da un complesso di fattori, che comprende anche la capacità di tale farmaco di raggiungere concentrazioni adeguate nel sito di infezione. Per utilizzare correttamente di antibiotici, oltre alle caratteristiche di microbiologiche (susceptibilità del microrganismo, fenotipo di resistenza etc.), dovrebbero essere, infatti, considerate anche la farmacocinetica e la farmacodinamica di quel farmaco. Ad esempio, è molto importante conoscere l'attività batteriostatica (antibiotici che inibiscono la crescita) e l'attività battericida (antibiotici che uccidono i batteri); lo stesso farmaco può essere sia battericida, sia batteriostatico per germi diversi. Il valore assoluto delle MIC riportato sugli antibiogrammi non può essere analizzato solo "verticalmente" tra i diversi farmaci testati, andando a scegliere, ad esempio, il valore di MIC minore. Infatti, se vi è un antibiotico X con una MIC di 0,5 mg/l e il breakpoint clinico è 2 mg/l, e un antibiotico Y con una MIC di 2 mg/l ma ha un breakpoint di 16 mg/l, il farmaco con una MIC più favorevole è l'antibiotico Y. Questo rapporto, questa "distanza" tra la MIC ed il breakpoint, è molto importante nella scelta della terapia e sarebbe utile avere i valori di breakpoint clinici sugli antibiogrammi (non tutti i laboratori li riportano durante la refertazione). (<https://www.eucast.org/>)

Dopo l'isolamento dei microrganismi dai campioni clinici, ottenuto mediante piastre e brodi di arricchimento è essenziale per guidare la terapia e massimizzare le probabilità di eradicare l'infezione.

L'applicazione dei criteri EUCAST è particolarmente rilevante nelle infezioni periprotetiche e osteoarticolari. Una corretta interpretazione dei breakpoint permette di scegliere il farmaco giusto e, se necessario, ottimizzare la dose o la durata della terapia per superare le barriere difensive del biofilm. Ad esempio, stafilococchi coagulasi negativi, *Staphylococcus aureus* o *Cutibacterium acnes*, possono presentare una susceptibilità ridotta in condizioni standard; EUCAST fornisce quindi parametri aggiornati per guidare decisioni terapeutiche efficaci. (28)

In laboratorio, i dati provenienti da sistemi automatizzati come Vitek, oppure dai test manuali di diffusione su disco o su strisce di gradiente, vengono sempre interpretati alla luce delle tabelle EUCAST più recenti, che vengono aggiornate regolarmente per includere nuovi antibiotici, resistenze emergenti e adattamenti basati sull'esperienza clinica. (28)

Un esempio di test manuale utilizzato in laboratorio è l'utilizzo dell'e-test della Cefoxitina (FOX) che viene impiegata per la valutazione della conferma della resistenza meticillino-mediata negli stafilococchi. La strip contiene un gradiente continuo e scalare di antibiotico e, dopo l'inoculo del microorganismo su terreno adatto standardizzato, si osserva la posizione lungo la striscia in cui la crescita batterica viene inibita. Questo permette di ottenere una stima quantitativa della MIC, confrontata con i breakpoint EUCAST, complementare ai dati forniti dai sistemi automatizzati come Vitek. (29)

L'utilizzo combinato di piastre e brodi selettivi e non selettivi, sistemi di identificazione automatizzati e linee guida EUCAST costituisce così il fondamento di una diagnosi microbiologica affidabile e di una scelta terapeutica ottimale, capace di massimizzare le probabilità di eradicazione dell'infezione protesica o dei mezzi di osteosintesi. (29)

Oltre a definire i breakpoint, EUCAST stabilisce raccomandazioni per la standardizzazione dei metodi di laboratorio, compresi inoculo, tempi di incubazione, composizione dei terreni e condizioni di crescita, garantendo che i risultati siano riproducibili e clinicamente significativi.

1.8 BIOLOGIA MOLECOLARE NELLE INFEZIONI OSTEOARTICOLARI E PERIPROTESICHE

Negli ultimi anni la biologia molecolare sta assumendo un ruolo sempre più rilevante nella diagnosi delle infezioni osteoarticolari e periprotetiche, pur non sostituendo la coltura, che rimane il gold standard. L'esperienza clinica mostra, tuttavia, che in un numero non trascurabile di casi, soprattutto nelle infezioni croniche, in pazienti pretrattati con antibiotici o quando i microrganismi in causa sono fastidiosi o a lenta crescita, l'approccio colturale tradizionale può risultare insufficiente. Proprio per colmare queste lacune, diversi protocolli diagnostici tra cui le recenti linee guida AMCLI (Associazione Microbiologi Clinici Italiani) del 2023, prevedono l'utilizzo di metodiche molecolari come supporto in contesti selezionati. (30)

Secondo le indicazioni riportate nei protocolli italiani e internazionali, la biologia molecolare può trovare applicazione in diversi scenari clinici. Viene utilizzata, ad esempio, quando le colture

risultano negative nonostante un fondato sospetto clinico di infezione, come nei casi di dolore persistente, instabilità delle protesi o presenza di segni sistemici non spiegabili diversamente. (31)

Risulta inoltre utile nei pazienti che hanno ricevuto in precedenza, o per un periodo prolungato, una terapia antibiotica, condizione che può compromettere la crescita batterica rendendo falsamente negative le colture. (31)

Un ulteriore ambito di impiego riguarda le infezioni sospette da microrganismi a crescita lenta o anaerobi, come *Cutibacterium acnes*, *Kingella kingae*, micobatteri o altri patogeni che richiedono tempi lunghi o terreni specifici per essere isolati. Infine, le tecniche molecolari possono essere impiegate quando è necessario ridurre i tempi diagnostici, al fine di orientare più rapidamente le decisioni cliniche e terapeutiche. (31)

La tecnica di riferimento alla base dei principali test molecolari è la PCR (Reazione a Catena della Polimerasi), ovvero una metodica che consente di amplificare in tempi rapidi quantità minime di DNA batterico fino a renderle rilevabili. Sfrutta il meccanismo naturale di replicazione del DNA, riproducendolo in vitro attraverso cicli termici ripetuti all'interno di un termociclatore. Ogni ciclo comprende tre fasi: la prima, chiamata denaturazione, avviene ad alta temperatura e determina la separazione dei due filamenti del DNA; segue la fase di annealing, in cui la temperatura viene abbassata per permettere a due brevi sequenze artificiali, i primer, di appaiarsi in modo specifico alle regioni terminali del tratto di DNA da amplificare. Infine, nella fase di estensione, la DNA polimerasi sintetizza un nuovo filamento complementare utilizzando il primer come punto di innesco. Ripetendo questo processo per 25–35 cicli, la quantità di DNA target aumenta in modo esponenziale, passando da poche copie iniziali a milioni o miliardi. (32)

Nella versione real-time, utilizzata nei moderni sistemi diagnostici, l'amplificazione viene monitorata in tempo reale attraverso la misurazione della fluorescenza emessa da specifici marcatori mediante sonde fluorescenti, permettendo non solo di rilevare la presenza del microrganismo ma anche di ottenere informazioni quantitative e di abbreviare ulteriormente i tempi analitici. (32)

Le metodiche più frequentemente utilizzate sono:

- PCR broad-range (16S rRNA)

Un primo approccio consiste nel rilevamento del DNA batterico mediante PCR mirata al gene 16S rRNA. Il vantaggio principale è la capacità di identificare batteri di qualunque specie, inclusi quelli

non coltivabili o presenti in quantità minime. Dopo l'amplificazione, il prodotto può essere sequenziato per determinare il microrganismo responsabile.

Tuttavia, questa tecnica è particolarmente esposta al rischio di falsi positivi, soprattutto per contaminazione del DNA ambientale o del processo analitico. Inoltre, non permette di distinguere batteri vivi da batteri morti. (33)

- PCR specifica o real-time

Le PCR mirate a specie o geni particolari sono più sensibili e specifiche rispetto alla PCR broad-range. Possono essere eseguite con metodiche convenzionali o in real-time e consentono di rilevare rapidamente patogeni selezionati. Questo approccio è utile quando il sospetto clinico o l'epidemiologia suggeriscono una particolare origine infettiva. (34)

- Metodi avanzati come NGS, metagenomica e shotgun sequencing

Negli ultimi anni si stanno diffondendo tecniche di sequenziamento ad alta profondità (Next Generation Sequencing, NGS), che permettono di analizzare l'intero repertorio microbico presente nel campione (metagenomica); identificare anche infezioni polimicrobiche; rilevare determinanti genetici di resistenza, come quelli coinvolti nella resistenza alla rifampicina (un antibiotico che blocca la sintesi dell'RNA batterico legandosi all'enzima RNA polimerasi dipendente dal DNA impedendo la trascrizione), ai fluorochinoloni (antibiotici che agiscono bloccando due enzimi essenziali per il DNA batterico, la DNA girasi e la topoisomerasi IV, impedendo la replicazione del DNA) o alle penicilline; studiare fattori di virulenza, biofilm e geni indotti in vivo (metatrascrittomica). (35)

Queste tecniche sono estremamente promettenti e hanno mostrato, in studi recenti, una sensibilità superiore alle PCR broad-range in numerosi contesti diagnostici. Tuttavia, al momento rimangono limitate dalla complessità analitica, dai costi elevati e dalla mancanza di protocolli standardizzati per la routine. (35)

Sebbene progettato per l'uso su emocolture positive, il sistema è stato impiegato su colture positive di *S. aureus*, per dimostrare come le metodiche molecolari possano essere adattate nei contesti di ricerca per migliorare la rapidità diagnostica e la caratterizzazione degli isolati. (36)

Le tecniche molecolari, pur molto utili, presentano alcuni limiti non trascurabili come l'impossibilità di distinguere batteri vivi da batteri morti, un problema rilevante in pazienti già trattati con antibiotici; rischio di contaminazione del DNA, specialmente nelle PCR broad-range; sensibilità variabile a

seconda del tipo di campione (liquido sinoviale, eluato da sonicazione, tessuto periprotetico) e necessità di integrare sempre il dato molecolare con quello clinico, istologico e colturale. (36)

1.9 RUOLO DELL'IGIENE DELLE MANI NELLA PREVENZIONE DELLE INFEZIONI

Il lavaggio delle mani rappresenta la misura più efficace per prevenire la trasmissione delle infezioni ospedaliere, poiché le mani degli operatori sanitari costituiscono il principale veicolo di trasferimento dei patogeni da un paziente all'altro e viceversa.

La superficie epidermica della cute, e in particolare quella delle mani, non è uniforme né impermeabile: microrganismi stazionano sia sulla superficie sia negli strati più profondi della pelle, inclusi follicoli piliferi, ghiandole sebacee e sudoripare. (37; 38)

La popolazione microbica cutanea può essere suddivisa in due categorie principali: transitoria e residente.

I microrganismi transitori si trovano negli strati più superficiali della cute e sopravvivono generalmente meno di 24 ore. Essi possono essere facilmente rimossi mediante un corretto lavaggio e costituiscono la quota più numerosa e variabile del microbiota cutaneo, rappresentando circa l'80–90% della popolazione totale. Questi batteri e funghi transitori vengono spesso acquisiti tramite contatto diretto con pazienti o superfici contaminate e sono i principali responsabili delle Infezioni Correlate all'Assistenza sanitaria (ICA). La loro trasmissibilità dipende dal numero di microrganismi presenti, dalla specie e dall'umidità della pelle. (39)

Al contrario, i microrganismi residenti vivono e si moltiplicano negli annessi cutanei, come follicoli e ghiandole, e non sono facilmente rimovibili con la detersione ordinaria. Rappresentano una percentuale più ridotta della popolazione microbica totale (circa il 10–20%) e sono prevalentemente cocchi Gram-positivi. Pur essendo più stabili e difficilmente eliminabili, i batteri residenti raramente causano patologie nei soggetti sani, ma possono diventare problematici in contesti ospedalieri se associati a pazienti immunocompromessi o procedure invasive. (39)

Queste caratteristiche biologiche sottolineano l'importanza critica dell'igiene delle mani come strumento di prevenzione delle infezioni, sia per ridurre la trasmissione dei microrganismi transitori sia per limitare i rischi associati ai patogeni che possono colonizzare temporaneamente le mani degli operatori, come *S. aureus*, bacilli Gram-negativi o lieviti (Figura 7). Il controllo microbiologico pre- e post-lavaggio delle mani degli operatori rappresenta quindi un indicatore di corretto comportamento igienico e un passaggio fondamentale per la sicurezza dei pazienti e del personale sanitario. (40)



Figura 7: Immagine stilizzata rappresentativa dei batteri presenti abitualmente sulle mani

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è analizzare in maniera approfondita l'intero processo diagnostico delle infezioni periprotetichiche ortopediche, con particolare attenzione alle metodiche microbiologiche convenzionali e all'integrazione con le tecniche di biologia molecolare. L'obiettivo generale è valutare se l'approccio combinato tra coltura tradizionale, sonicazione dei dispositivi protesici e sistemi molecolari rapidi possa migliorare la sensibilità, specificità e tempi diagnostici in un ambito clinico in cui il riconoscimento precoce dell'agente eziologico condiziona in modo determinante l'esito terapeutico.

In particolare, l'elaborato si propone di approfondire l'utilizzo off-label di un test di biologia molecolare per la rilevazione di *Staphylococcus aureus* MSSA ed MRSA, al fine di verificarne l'accuratezza diagnostica ed il potenziale contributo nel ridurre i tempi di identificazione del patogeno responsabile.

L'obiettivo finale è valutare se l'integrazione di metodiche molecolari al percorso diagnostico convenzionale possa rappresentare uno strumento utile per il miglioramento della gestione clinica delle infezioni periprotetichiche, favorendo una diagnosi più rapida ed un'impostazione terapeutica più tempestiva ed efficace.

Infine, il lavoro include una riflessione sull'importanza delle corrette pratiche di igiene delle mani da parte degli operatori sanitari, con l'obiettivo di sensibilizzare sulla prevenzione delle contaminazioni durante le fasi di campionamento e di manipolazione dei materiali biologici, elementi fondamentali per garantire l'affidabilità dell'intero processo diagnostico.

3. MATERIALI E METODI

3.1 FASE PRE-ANALITICA: MODALITÀ DI RACCOLTA, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Nel periodo compreso tra il 15 ottobre 2025 e il 27 febbraio 2026 sono stati analizzati un totale di 556 campioni provenienti da 94 pazienti con sospetta infezione protesica. I campioni provenivano da diversi Centri appartenenti al Policlinico di Monza, in particolare dalla Clinica Lavialarda di Biella, dalla Clinica Eporediese di Ivrea e dalla Clinica Città di Alessandria. Come da Linee Guida per ogni paziente sono stati prelevati da 3 a 7 campioni, a volte anche 10. I campioni sono stati tutti trasportati presso il Laboratorio Analisi della Clinica Città di Alessandria dove sono stati processati.

Le componenti protesiche rimosse chirurgicamente, i mezzi di osteosintesi e i biomateriali associati rappresentano campioni di particolare rilevanza nella diagnosi delle infezioni osteoarticolari, in quanto potenzialmente sede di microrganismi organizzati in biofilm. Tra questi rientrano ad esempio: steli femorali e omerali, cotili, inserti in polietilene, placche, viti, chiodi endomidollari, cemento di fissazione e sostituti ossei.

La raccolta dei campioni è stata effettuata prestando particolare attenzione alla prevenzione delle contaminazioni. Le componenti che, durante la rimozione, siano venute a contatto diretto con la cute del paziente o che siano state manipolate con strumenti o mani potenzialmente contaminati sono state escluse dalla raccolta microbiologica, al fine di ridurre il rischio di falsi positivi.



Figura 8: Spacer di protesi d'anca

Le componenti protesiche e i mezzi di osteosintesi sono stati collocati singolarmente in contenitori sterili, non perforabili, a tenuta ermetica e di dimensioni adeguate. (Figura 8 e figura 9).



Figura 9: Piatto tibiale

Per quanto riguarda il trasporto e la conservazione, i campioni sono stati consegnati al laboratorio nel più breve tempo possibile. Qualora non fosse stato possibile un invio immediato, i campioni di tessuto, le componenti protesiche o i mezzi di osteosintesi sono stati conservati a una temperatura di 4° C fino alla lavorazione. Nel caso di campioni di piccole dimensioni, è stata aggiunta una minima quantità di soluzione fisiologica sterile per prevenire l'essiccamento, mentre i campioni inoculati con liquido articolare sono stati invece mantenuti a temperatura ambiente e analizzati entro le 48 ore dal prelievo.

Ogni campione è stato accompagnato da una richiesta clinica completa, contenente data e ora del prelievo, la sede anatomica, informazioni cliniche rilevanti, eventuale terapia antibiotica in corso o pregressa, la presenza di eventuali infettivologici precedenti e richieste di indagini microbiologiche mirate come la ricerca di micobatteri.

3.2 RICHIESTA, ACCETTAZIONE E TRACCIABILITÀ DEI CAMPIONI

Tutti i campioni biologici inclusi nello studio sono stati sottoposti a una procedura standardizzata di accettazione al momento dell'arrivo in laboratorio. Ogni campione è stato identificato mediante un codice a barre generato dal sistema informatico di laboratorio, che ha consentito la completa tracciabilità lungo tutte le fasi del processo analitico.

Durante la fase di accettazione, chiamata check-in, è stata verificata la corrispondenza tra la richiesta clinica compilata dal medico richiedente, la tipologia dei campioni ricevuti, la corretta identificazione anagrafica del paziente e l'idoneità dei contenitori utilizzati per il prelievo del materiale biologico.

A seguito della registrazione del campione nel sistema informatico di laboratorio, sono state generate e stampate le etichette identificative riportanti il codice univoco del campione, il numero della richiesta, nome e cognome e reparto di provenienza del paziente. Tali etichette sono state applicate sia sui contenitori dei campioni biologici sia sulle piastre dei terreni di coltura utilizzati nelle successive fasi di lavorazione, al fine di garantire la completa tracciabilità del materiale analizzato.

Successivamente, è stata effettuata la stampa del piano di lavoro (PDL), sul quale vengono annotate manualmente informazioni aggiuntive del campione, tra cui la tipologia del pezzo chirurgico analizzato (ad esempio la componente protesica, espansore, femore distale o prossimale, cono inferiore dell'acetabolo) e un numero identificativo, generalmente compreso tra 1 e 7, riportato anche sul contenitore corrispondente, al fine di garantire una corretta correlazione tra materiale biologico e risultati analitici.

Sul PDL sono state inoltre registrate le date di apertura e di lettura delle piastre incubate sia in atmosfera anaerobia che in atmosfera arricchita in CO₂. Analogamente, sono state annotate le tempistiche di controllo delle piastre con la semina dei brodi di arricchimento incubati sia in anaerobiosi che in CO₂, consentendo un monitoraggio sistematico dell'andamento culturale nel tempo.

3.3 FASE ANALITICA: PROCESSAMENTO MICROBIOLOGICO DEI CAMPIONI

Tutte le procedure analitiche sono state eseguite nel rispetto delle norme di biosicurezza e delle raccomandazioni previste per la manipolazione di materiali potenzialmente infetti.

I materiali biologici sono stati processati all'interno di una cappa di sicurezza biologica di classe II, al fine di ridurre il rischio di contaminazione ambientale e garantire la protezione dell'operatore. Durante le fasi di lavorazione, come raccomandato dalle linee guida internazionali, è stato minimizzato il numero di manipolazioni e di aperture dei contenitori. Sono stati utilizzati i dispositivi di protezione individuale (DPI) comprendenti camice e guanti monouso, sostituiti in caso di lavorazioni prolungate o di potenziale contaminazione.

I campioni chirurgici rappresentati dai tessuti sono stati processati sotto cappa a flusso laminare mediante frammentazione meccanica con bisturi sterile, ottenendo piccoli frammenti successivamente seminati direttamente sui terreni di coltura Agar sangue (COS) (Figura 10) ed Agar Schedler (SCS) (Figura 11), della ditta BioMérieux, utilizzando un'ansa sterile.



Figura 10: Terreno di coltura Agar sangue (COS)
BioMérieux



Figura 11: Terreno di coltura Agar Schedler (SCS)
BioMérieux

Per i campioni di tessuto osseo, la semina è stata effettuata prelevando 2/3 gocce di fisiologica in cui era stato immerso il campione per premetterne la reidratazione. La soluzione fisiologica presente nel campione è stata quindi distribuita sulle superfici dei terreni di coltura solidi, garantendo una semina uniforme e riducendo al minimo il rischio di contaminazione.

3.4 SONICAZIONE DEI MEZZI DI OSTEOSINTESI

La sonicazione è stata adottata come metodica per il trattamento dei mezzi di osteosintesi, in quanto consente il distacco dei microrganismi organizzati in biofilm dalle superfici dei dispositivi, preservandone la vitalità.

I batteri vengono trasferiti da una superficie protetta e difficilmente analizzabile (come il biofilm presente sulle protesi) a un liquido facilmente coltivabile, aumentando così la probabilità di isolamento e identificazione dei microrganismi responsabili dell'infezione. (41)

L'utilizzo del sonicatore (Figura 12) segue una sequenza di fasi operative volte a garantire la massima efficacia nell'isolamento dei microrganismi. I mezzi di osteosintesi, nei contenitori di trasporto ermetici e sterili, sono stati ricoperti per almeno il 90% del loro volume con soluzione fisiologica sterile e successivamente sottoposti a una fase iniziale di agitazione su vortex per 30 secondi. (42)

Questa fase è fondamentale per eliminare residui che potrebbero interferire con la successiva sonicazione e per aumentare la resa microbiologica.

Successivamente il sonicatore deve essere riempito con acqua sterile, assicurandosi che sia pulito e pronto all'uso, posizionando il contenitore con il campione all'interno della vasca del sonicatore. (43)

La sonicazione è stata eseguita in un bagno a ultrasuoni applicando una frequenza di 40 kHz, impostando il timer a 5 minuti. Le onde ultrasoniche generano microbolle che, implodendo, staccano i batteri dal biofilm presente, senza ucciderli.

Al termine della sonicazione, i campioni sono stati nuovamente vortexati per 30 secondi, per mettere in sospensione nel liquido tutti i batteri che sono stati staccati durante la sonicazione, assicurandosi che siano distribuiti uniformemente e pronti per la semina.

Il liquido di sonicazione è stato quindi utilizzato per l'allestimento delle colture microbiologiche. Dal sonificato sono state inoculate 0,5 ml su terreni solidi non selettivi, comprendenti agar sangue e agar cioccolato (COS), incubati in atmosfera arricchita con il 5% di CO₂ per almeno 5 giorni e 0,5 ml in piastre di SCS (Scaedler Agar sangue) incubate in condizioni di anaerobiosi per 7-10 giorni. (43)



Figura 12: Sonicatore

3.5 TEMPI DI INCUBAZIONE E LETTURA DELLE COLTURE

Le condizioni e i tempi di incubazione delle piastre e dei brodi di arricchimento rivestono un ruolo principale per la crescita e la successiva identificazione dei microrganismi.

Le colture su terreno solido, in una piastra di agar sangue (COS), sono state incubate per almeno 5 giorni in CO₂, mentre quelle per anaerobi fino a 7 giorni in anaerobiosi in piastra SCS (Schaedler Agar sangue).

La lettura delle piastre è stata programmata quindi per la CO₂ dopo 5 giorni e per l'anaerobiosi dopo 7 giorni. Inoltre, dopo 7 giorni sono stati riseminati i campioni che erano stati precedentemente arricchiti con brodo Thio-T, sempre su Agar sangue (COS) in CO₂ con lettura a 5 giorni ed Agar Schedler (SCS) con lettura a 7 giorni in anaerobiosi.

L'incubazione totale è quindi di circa 14 giorni, questo per permettere ad eventuali microrganismi a lenta crescita di potersi sviluppare.

3.6 IDENTIFICAZIONE MICROBIOLOGICA E ANTIBIOGRAMMA

Al termine dei tempi di incubazione previsti, le piastre sono state esaminate quotidianamente per valutare l'eventuale crescita microbica. L'osservazione ha incluso la valutazione della morfologia delle colonie, del tipo di emolisi su agar sangue, della pigmentazione, della dimensione e dell'odore caratteristico, nonché la correlazione con il tipo di campione clinico e il contesto clinico del paziente.

In presenza di crescita batterica, sono state selezionate colonie isolate e morfologicamente rappresentative, evitando aree di possibile contaminazione o crescita mista non interpretabile. Qualora necessario, sono state effettuate subcolture su terreni appropriati per ottenere colture pure idonee alla successiva identificazione e all'esecuzione dell'antibiogramma.

Prima dell'allestimento dei test automatizzati, le colonie selezionate sono state sottoposte a colorazione di Gram, al fine di orientare la scelta della card di identificazione più appropriata e verificare la purezza della coltura.

3.6.1 VITEK

L'identificazione dei microrganismi isolati e la determinazione della loro sensibilità agli antibiotici sono state eseguite mediante il sistema automatizzato VITEK 2, utilizzato routinariamente nel laboratorio di microbiologia. Lo strumento consente l'identificazione batterica e micotica e l'esecuzione dell'antibiogramma attraverso card monouso contenenti substrati biochimici e antibiotici in concentrazioni predeterminate. (44)

Il sistema è costituito da due unità funzionali indipendenti: una sezione dedicata alla dispensazione dell'inoculo all'interno delle card tramite un sistema a vuoto e un'unità incubatore/lettore che mantiene le card a temperatura controllata e ne effettua la lettura automatica a intervalli regolari mediante sensori fotometrici. Le variazioni di torbidità e di colore rilevate vengono elaborate dal software, che fornisce l'identificazione del microrganismo e i profili di suscettibilità antimicrobica.

Per l'allestimento dei test, le colonie selezionate sono state sospese in soluzione fisiologica sterile fino al raggiungimento di una torbidità standardizzata, misurata mediante lo strumento DensiCHEK Plus (Figura 13) ed espressa in unità McFarland. La concentrazione dell'inoculo è stata adattata in base al tipo di card utilizzata. (44)

In particolare:

- per le card di identificazione di batteri Gram-positivi (GP) e Gram-negativi (GN) l'inoculo è stato regolato a 0,5–0,7 McFarland;
- per le card destinate all'identificazione di lieviti (YST) l'inoculo è stato portato a 1,8–2,2 McFarland;
- per le card dedicate a *Neisseria*, *Haemophilus* e microrganismi affini (NH) e per anaerobi e microaerofili (ANC) l'inoculo è stato regolato a 2,7–3,3 McFarland.



Figura 13: DensiCHEK Plus, strumento utilizzato per misurare la torbidità dell'inoculo

L'inoculo preparato è stato successivamente dispensato nelle card di identificazione e nelle card per l'antibiogramma utilizzando le pipette dedicate, secondo le procedure operative standard del laboratorio. (44)

La selezione delle card di identificazione è stata effettuata sulla base dei risultati della colorazione di Gram e delle caratteristiche morfologiche delle colonie. Sono state utilizzate card specifiche per:

- batteri Gram-positivi;
- batteri Gram-negativi;
- lieviti;
- microrganismi esigenti (*Neisseria*, *Haemophilus*);
- anaerobi e microaerofili, previa verifica dell'aerotolleranza e conferma microscopica.

Per la determinazione della sensibilità agli antibiotici sono state impiegate card di antibiogramma (AST) differenti in funzione del gruppo microbico identificato e del contesto clinico (pazienti ambulatoriali, ricoverati, critici o sospetta multiresistenza). La scelta della card AST è stata effettuata in accordo con le procedure interne del laboratorio e con le indicazioni cliniche. (45)

Le card inoculate sono state caricate nell'incubatore/lettore del sistema VITEK 2 (Figura 14), che ha provveduto automaticamente all'incubazione e alla lettura periodica dei test. Il software ha elaborato i dati ottenuti, fornendo un'identificazione microbiologica e i valori di MIC (Minimum Inhibitory Concentration) per ciascun antibiotico testato. (46; 48)



Figura 14: Incubatore Vitek2

I risultati dell'antibiogramma sono stati interpretati secondo i criteri EUCAST vigenti al momento dell'analisi, consentendo la classificazione dei microrganismi come sensibili, intermedi o resistenti agli antibiotici testati. (47)

Per quanto riguarda i microrganismi Gram-negativi si considera principalmente la sensibilità ai carbapenemi, in particolare per *Escherichia coli* si valuta il meccanismo di resistenza verso il meropenem, considerato resistente a una MIC > 0,25. (47)

Per gli stafilococchi, si ha una particolare attenzione della sensibilità verso oxacillina e cefoxitina (test di screening per la resistenza alla meticillina), nonché verso gli antibiotici di riferimento per il trattamento delle infezioni gravi, quali linezolid, daptomicina, vancomicina e teicoplanina. Per *S. aureus* è stata inoltre considerata sistematicamente la cefoxitina come marker fenotipico di resistenza. (48)

In particolare, nei casi di isolamento di *Staphylococcus aureus*, l'interpretazione della resistenza agli antibiotici β -lattamici è stata integrata con metodiche fenotipiche specifiche raccomandate da EUCAST, come il test alla cefoxitina (FOX), eseguito sul terreno Mueller-Hinton agar (Figura 15), inoculato con una sospensione batterica standardizzata pari a 0,5 McFarland e finalizzato alla determinazione della MIC e all'identificazione affidabile dei ceppi meticillino-resistenti. (47)

Dopo incubazione a 35 ± 1 °C per 18–24 ore, la MIC della cefoxitina è stata determinata come il valore corrispondente al punto di intersezione tra l'ellisse di inibizione della crescita batterica e la

scala graduata riportata sulla strip. Secondo i criteri interpretativi EUCAST, una MIC ≤ 4 mg/L è indicativa di ceppo meticillino-sensibile (MSSA), mentre una MIC > 4 mg/L identifica un ceppo meticillino-resistente (MRSA). (47; 48)

Tutti i dati ottenuti sono stati tracciati e validati dal personale autorizzato prima della refertazione finale.

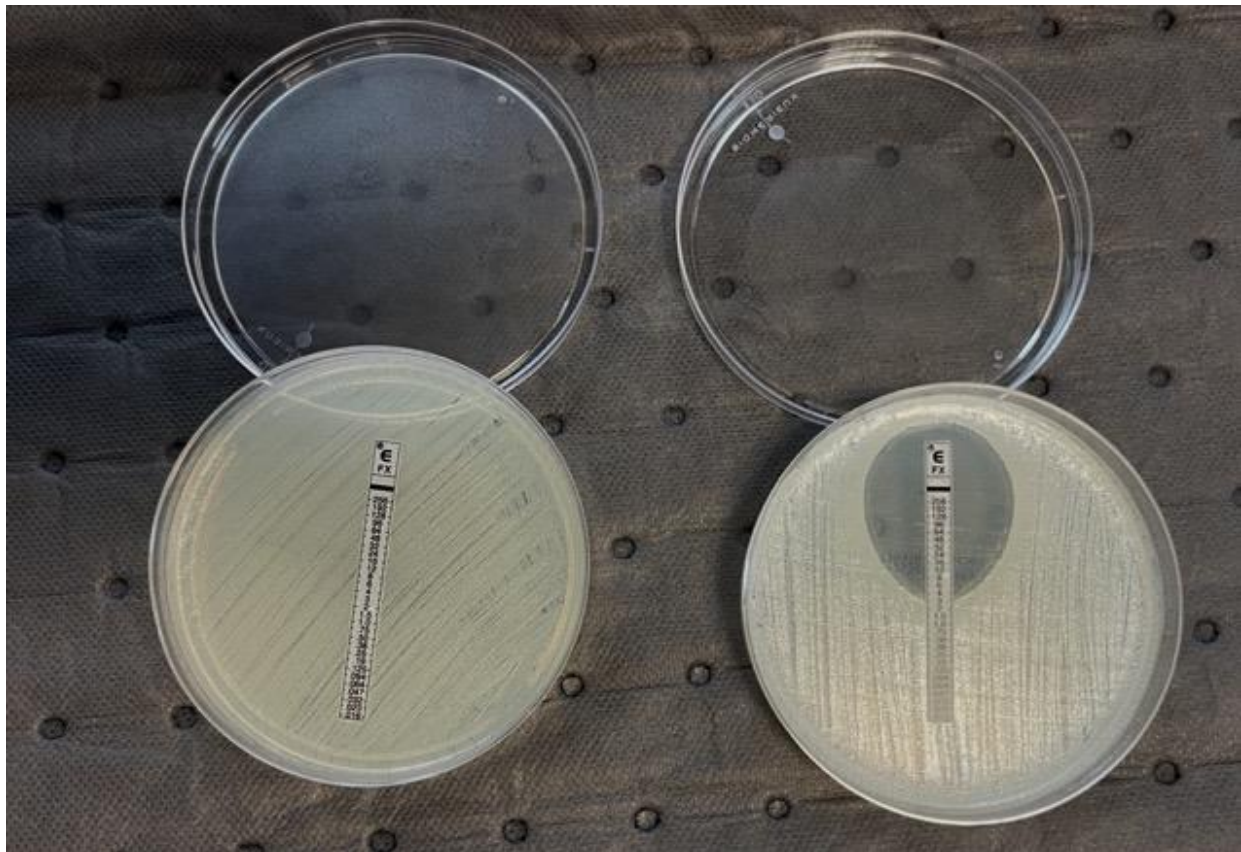


Figura 15: Distinzione fenotipica tra ceppi MRSA e MSSA mediante test della cefoxitina (FOX). Ceppo MRSA (a sinistra), caratterizzato da MIC > 4 mg/L e assente zona di inibizione. Ceppo MSSA (a destra) con MIC < 4 mg/L e zona di inibizione compatibile con sensibilità secondo i criteri EUCAST.

3.7 METODICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE, SISTEMA XPERT PER L'IDENTIFICAZIONE DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E MRSA

Nella pratica di laboratorio, un esempio applicativo rilevante è rappresentato dal Gene Xpert MRSA/SA Blood Culture, basato su PCR real-time completamente automatizzata. Il sistema GeneXpert integra estrazione, purificazione, amplificazione e rilevazione all'interno di una cartuccia monouso, riducendo al minimo il rischio di contaminazione. (36)

Il test identifica *S. aureus* tramite gene *spa* e *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA, stafilococco resistente alla meticillina) tramite rilevamento combinato di *mecA* e delle cassette chromosome *SCCmec*.

Il software interno confronta i valori soglia (Ct) dei tre bersagli: *spa*, che codifica per la proteina A dello *S. aureus*; il gene *mecA*, responsabile della resistenza alla meticillina; e la regione di giunzione cromosomica *SSCmec*, che contiene *mecA* inserita nel cromosoma di *S. aureus*. Sulla base di algoritmi preimpostati, il sistema determina se il DNA dei tre target provenga dallo stesso microrganismo, permettendo di distinguere MRSA da altri stafilococchi *mecA*-positivi. Se viene rilevato soltanto *spa*, in assenza di *mecA* e *SCCmec*, il risultato viene interpretato come MSSA (meticillino-sensibile). (36)

Sebbene progettato per l'uso su emocolture positive, il sistema è stato impiegato off-label su tutti i campioni protesici prelevati per sospetta infezione protesica, come approccio diagnostico preliminare, in modo da verificare se il sistema rilevasse l'eventuale presenza di *S.aures* e se potesse esserne utile il suo utilizzo per velocizzare la diagnosi.

Il sistema utilizza cartucce sigillate contenenti tutti i reagenti necessari all'analisi ed è dotato di controlli interni integrati, in particolare il Sample Processing Control (SPC) per la verifica dell'efficienza di estrazione e amplificazione e il Probe Check Control (PCC) per il controllo dell'integrità dei reagenti e del corretto riempimento delle camere di reazione.

L'impiego del sistema Xpert risulta particolarmente vantaggioso nel contesto delle infezioni protesiche, frequentemente caratterizzate da bassa carica batterica, crescita lenta e formazione di biofilm, condizioni che possono determinare risultati falsamente negativi con le metodiche colturali tradizionali. Inoltre, la possibilità di ottenere un risultato in circa un'ora rappresenta un importante supporto per l'impostazione tempestiva della terapia antibiotica mirata. (36)

Per ciascun campione è stata utilizzata una pipetta di trasferimento sterile da 50 µL, fornita in dotazione con il kit, per dispensare l'aliquota nel flaconcino contenente il reagente di eluizione. Il flaconcino è stato quindi chiuso e sottoposto a miscelazione mediante vortex ad alta velocità per 10 secondi, al fine di garantire un'adeguata dispersione del materiale biologico nel reagente. (36)

Successivamente, l'intero contenuto del flaconcino di eluizione è stato trasferito nella camera della cartuccia Xpert riservata al campione. La cartuccia è stata quindi chiusa e inserita nel modulo analitico del sistema GeneXpert, avviando il saggio.

Il sistema ha eseguito automaticamente le fasi di:

- lisi cellulare,
- purificazione degli acidi nucleici,
- amplificazione mediante PCR real-time,
- rilevazione del segnale fluorescente.

I risultati sono stati elaborati dal software dedicato e classificati come:

- MRSA positivo / SA positivo;
- MRSA negativo / SA positivo;
- MRSA negativo / SA negativo;
- non valido, errore o nessun risultato in caso di anomalie tecniche o fallimento dei controlli interni.

Un risultato è stato considerato valido esclusivamente in presenza del superamento dei controlli SPC e PCC integrati nella cartuccia. In caso di risultato non valido o di errore di sistema, l'analisi è stata ripetuta utilizzando una nuova cartuccia e una nuova aliquota del campione, secondo le indicazioni del produttore. (36)

I dati ottenuti mediante metodica molecolare sono stati infine confrontati con quelli derivanti dalle colture microbiologiche tradizionali, al fine di valutare la concordanza diagnostica e il contributo del sistema Xpert nella rilevazione di *S. aureus*, in particolare nei casi di infezione protesica associata a biofilm o in pazienti sottoposti a terapia antibiotica.

I risultati dell'analisi molecolare sono stati forniti automaticamente dal software GeneXpert sotto forma di referto diagnostico, riportante l'esito dell'analisi, lo stato dei controlli interni e i parametri di validità del test. (50)

A titolo esemplificativo, le Figure 16 e 17 riportano due referti rappresentativi generati dal sistema Gene Xpert durante lo svolgimento dello studio, relativi a un campione negativo e a un campione positivo per *S. aureus*.

Rapporto di analisi

ID paziente:
 ID campione*: ██████████
 Tipo di analisi: Campione
 Tipo di campione:

Informazioni esame

Esame	Versione esame	Tipo di esame
Xpert MRSA_SA_BC_CE	1	Diagnostico in vitro

Risultato: **MRSA NEGATIVO;
SA NEGATIVO**

Risultato analita

Nome analita	Ct	Punto finale	Risultato analita	Risultato del controllo sonda	Delta Ct bersaglio
SPC	31,4	170	AMMESSO	AMMESSO	
SPA	0,0	-1	NEG	AMMESSO	
mec	0,0	3	NEG	AMMESSO	
SCC	0,0	0	NEG	AMMESSO	

Utente: <Nessuno>
 Stato: Fine
 Versione S/W: 6.5
 Data di scadenza*: 22/11/26
 N/S cartuccia*: 545130677
 ID lotto reagente*: 22203
 Note:
 Stato errore: OK

Ora di inizio: 23/11/25 10:25:55
 Ora di fine: 23/11/25 11:28:02
 N/S strumento: 110023783
 N/S modulo: 210122676
 Nome modulo: A2

Figura 16: Esempio di referto GeneXpert negativo

ID paziente:
 ID campione*: ██████████
 Tipo di analisi: Campione
 Tipo di campione:

Informazioni esame

Esame	Versione esame	Tipo di esame
Xpert MRSA_SA_BC_CE	1	Diagnostico in vitro

Risultato: **MRSA POSITIVO;
SA POSITIVO**

Risultato analita

Nome analita	Ct	Punto finale	Risultato analita	Risultato del controllo sonda	Delta Ct bersaglio
SPC	0,0	-16	NA	AMMESSO	
SPA	13,4	426	POS	AMMESSO	
mec	14,6	449	POS	AMMESSO	
SCC	15,3	476	POS	AMMESSO	

Utente: <Nessuno>
 Stato: Fine
 Versione S/W: 6.5
 Data di scadenza*: 22/11/26
 N/S cartuccia*: 545130674
 ID lotto reagente*: 22203
 Note:
 Stato errore: OK

Ora di inizio: 14/11/25 10:38:59
 Ora di fine: 14/11/25 11:41:36
 N/S strumento: 110023783
 N/S modulo: 210122675
 Nome modulo: A1

Errori
 <Nessuno>

Figura 17: Esempio di referto GeneXpert MRSA/SA positivo per MRSA

3.8 CONTROLLO MICROBIOLOGICO DELLE MANI DEGLI OPERATORI SANITARI

Il controllo microbiologico delle mani del personale sanitario è stato effettuato con finalità di monitoraggio e sensibilizzazione sull'importanza dell'igiene delle mani nella prevenzione delle infezioni correlate all'assistenza sanitaria. Il campionamento è stato eseguito su operatori appartenenti a diverse categorie professionali (medici, infermieri, operatori socio-sanitari), prima e dopo il lavaggio sociale.

Il prelievo dei microrganismi presenti sulla superficie cutanea è stato eseguito mediante campionamento diretto su piastra.

Nel primo caso, è stata utilizzata una piastra non selettiva contenente agar sangue, sulla quale l'operatore ha appoggiato progressivamente il palmo della mano (prima la parte inferiore e successivamente quella superiore), le dita, i polpastrelli e infine il dorso della mano, esercitando una lieve pressione per garantire un adeguato trasferimento della flora microbica cutanea. Le piastre sono state incubate in aerobiosi a 37 °C per 24 ore; al termine dell'incubazione è stata valutata la crescita batterica in termini qualitativi e semi-quantitativi.

Le colonie sviluppatesi sono state valutate morfologicamente e sottoposte a colorazione di Gram per una prima caratterizzazione microscopica. Quando necessario, l'identificazione batterica è stata approfondita mediante sistema automatizzato Vitek2 (bioMérieux).

Il campionamento è stato effettuato sia prima sia dopo il lavaggio delle mani, al fine di valutare la variazione della carica microbica e l'efficacia delle procedure di igiene.

L'analisi microbiologica è stata orientata alla valutazione di alcuni indicatori principali, tra cui la carica batterica totale, quale parametro rappresentativo del livello complessivo di contaminazione cutanea, la presenza di batteri Gram-negativi e coliformi come possibili indicatori di contaminazione ambientale o fecale, e l'eventuale rilevazione di microrganismi patogeni di interesse clinico, in particolare *Staphylococcus aureus* e ceppi meticillino-resistenti (MRSA).

I dati microbiologici ottenuti sono stati registrati e organizzati mediante foglio di calcolo Microsoft Excel, utilizzato per l'elaborazione descrittiva dei risultati e la costruzione delle tabelle riassuntive.

Un estratto del database utilizzato per la raccolta dei dati è riportato in figura 18 a titolo esemplificativo.

PROTOCOLLO MANI OPERATORI SANITARI CDA						
Personale Sanitario	Reparto	Ruolo	Pre-lavaggio	Post-lavaggio	Microrganismi	Esito
BI	EMODINAMICA	CAPOSALA	✓		Stafilo +++ b-7 Rn	Stafilo coag. Neg +++ Bacillus +
BI	EMODINAMICA	CAPOSALA		✓	Stafilo +	Stafilo coag. Neg +
DA	S.O. CARDIO	MEDICO	✓		Stafilo +	Stafilo coag Neg +
DA	S.O. CARDIO	MEDICO		✓	A.C.	ASSENZA CRESCITA
BG	S.O. ORTO	MEDICO SPEC	✓		Stafilo ++	Stafilo coag Neg ++
BG	S.O. ORTO	MEDICO SPEC		✓	A.C.	ASSENZA CRESCITA
IM	T.I.P.O.	ANESTESISTA	✓		Stafilo + + +	Stafilo coag Neg + + +
IM	T.I.P.O.	ANESTESISTA		✓	Stafilo +	Stafilo coag Neg +
PB	REPARTO ORTOPEDIA	COORDINATRICE	✓		Stafilo ++	Stafilo coag neg ++ S.aureus HSSA +
PB	REPARTO ORTOPEDIA	COORDINATRICE		✓	Stafilo +	Stafilo coag neg +
PD	REPARTO CARDIO	AUSILIARIA	✓		Stafilo +	Stafilo coag neg +
PD	REPARTO CARDIO	AUSILIARIA		✓	Stafilo ++	Stafilo coag neg ++

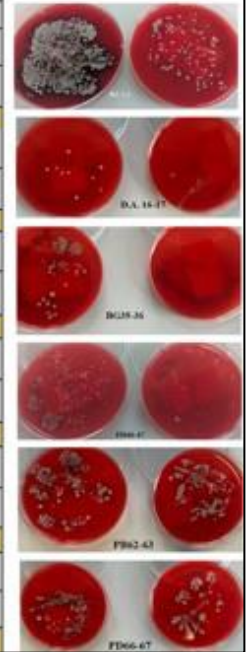


Figura 18: Estratto del foglio di calcolo utilizzato per la raccolta e l'organizzazione dei dati relativi al controllo microbiologico delle mani degli operatori sanitari, riportato a titolo esemplificativo.

3.9 RACCOLTA E ANALISI DEI DATI

Lo studio è stato condotto su campioni protesici prelevati da pazienti sottoposti a intervento chirurgico presso quattro strutture appartenenti al Policlinico di Monza nel periodo compreso tra il 15 ottobre 2025 e il 27 febbraio 2025.

I pazienti sono stati sottoposti a due tipi di interventi: quello di debridement con mantenimento della protesi (DYER), che generalmente viene eseguito quando l'infezione è precoce (<30 giorni dall'impianto della protesi). Oppure a rimozione della protesi con posizionamento di spacer antibiotato (dopo 30 giorni dall'impianto della protesi). In entrambi i casi sono stati prelevati da tre a sette campioni periprotetici per l'analisi microbiologica.

In tutti i pazienti che hanno inserito lo spacer antibiotato, dopo terapia antibiotica mirata è stata ripetuta l'operazione per inserire la protesi e contestualmente sono stati prelevati altri campioni per analisi microbiologiche per verificare l'effettiva sterilità dei tessuti. Per questo motivo lo stesso paziente può risultare associato a più interventi chirurgici ed a più set di campioni microbiologici, registrati come osservazioni distinte nel database ma ricondotti al medesimo soggetto.

Per ciascun paziente sono stati raccolti dati relativi al numero di campioni analizzati, all'esito microbiologico, al microrganismo isolato e al profilo di sensibilità agli antibiotici tramite antibiogramma.

Tutti i dati clinici e microbiologici sono stati registrati e organizzati in un database mediante foglio di calcolo Microsoft Excel, includendo:

- clinica di provenienza del campione,
- data dell'intervento chirurgico,
- numero di pezzi protesici analizzati per ciascun paziente,
- risultato delle colture microbiologiche,
- identificazione del microrganismo isolato,
- classificazione del microrganismo come patogeno o contaminante,
- risultati degli antibiogrammi,
- esito delle analisi di biologia molecolare.

I dati relativi all'identificazione batterica sono stati ricavati dall'archivio informatico del sistema automatizzato Vitek2 (bioMérieux) (49), mentre i risultati delle analisi molecolari per la rilevazione di *S. aureus* e MRSA sono stati ottenuti dall'archivio software del sistema GeneXpert (Cepheid). (50)

I dati sono stati successivamente sottoposti ad analisi descrittiva mediante calcolo di frequenze assolute e in percentuali, al fine di valutare la proporzione di campioni positivi e negativi, la frequenza dei microrganismi isolati e la concordanza tra le metodiche microbiologiche e molecolari.

4. RISULTATI

4.1 ANALISI DEI CAMPIONI CLINICI: DISTINZIONE TRA INFEZIONI ACCERTATE E CONTAMINAZIONI

Nel periodo di osservazione sono stati analizzati complessivamente 556 campioni clinici appartenenti a 94 pazienti, una media di 5,9 pezzi chirurgici per paziente, sottoposti a intervento chirurgico per sospetta infezione osteo-articolare e/o periprotetica, con esecuzione di indagini colturali su campioni chirurgici.

Dei 94 casi esaminati, come rappresentato nella Tabella 1 e nel Grafico 1, 40 pazienti (il 42,6%), a cui corrispondono 240 campioni positivi, 2,55 pezzi positivi per paziente in media, hanno presentato colture microbiologiche positive, compatibile con infezione clinica accertata; 46 pazienti (il 48,9%) hanno mostrato esito colturale negativo e 8 pazienti (il 8,5%) hanno presentato positività microbiologiche interpretate come contaminazioni, sulla base dei criteri clinici e microbiologici adottati. Come definito dalle linee guida AMCLI, si considera infezione periprotetica quando, dal totale dei pezzi chirurgici prelevati (da 3 a 7 per paziente), viene isolato lo stesso microrganismo con profilo di sensibilità sovrapponibile ad almeno due campioni.

Le contaminazioni, non essendo indicative di reale infezione, sono state considerate ai fini dell'analisi statistica come risultati negativi. Pertanto, includendo tali casi nel gruppo dei negativi, il numero complessivo di pazienti senza infezione accertata risulta pari a 53 su 94 (57,4%).

Tabella 1: Classificazione dei pazienti secondo l'esito microbiologico

Pazienti	Numero	%
Positivi	40	42,6
Negativi	46	48,9
Contaminazione	8	8,5
Totale	94	100

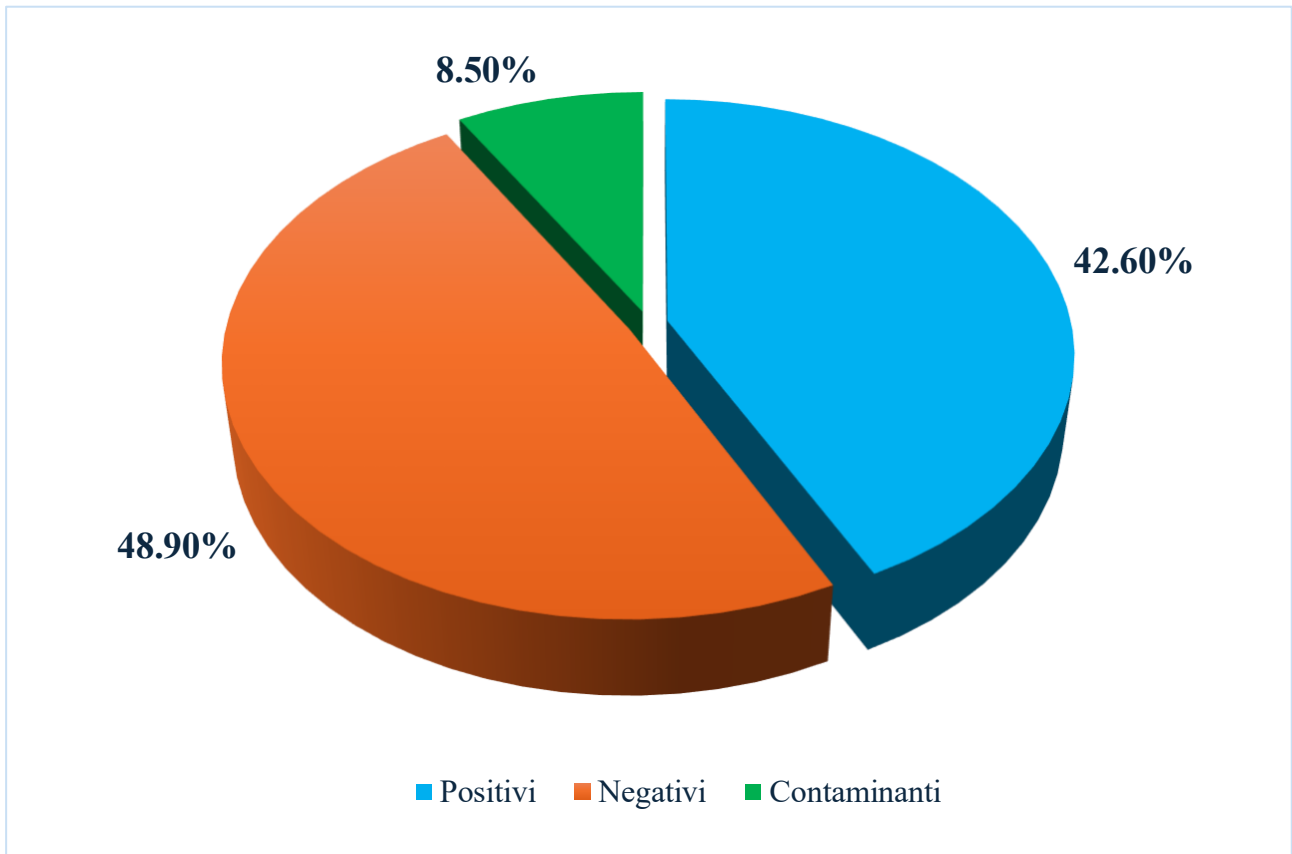


Grafico 1: Rappresentazione grafica della classificazione dei pazienti secondo l'esito microbiologico

4.2 DISTRIBUZIONE DEI MICRORGANISMI ISOLATI

Nei 40 casi di infezione microbiologicamente accertata, l'analisi culturale ha evidenziato una netta prevalenza di microrganismi Gram-positivi, in particolare appartenenti al genere *Staphylococcus* spp.

In dettaglio, come si può osservare dal Grafico 2 e dalla Tabella 2, i microrganismi isolati risultano così distribuiti:

- *Staphylococcus aureus*: 17 casi (42,5%)
- *Staphylococcus epidermidis*: 11 casi (27,5%)
- *Staphylococcus hominis*: 3 casi (7,5%)
- *Staphylococcus warneri*: 2 casi (5,0%)
- *Staphylococcus caprae*: 1 caso (2,5%)
- *Staphylococcus haemolyticus*: 1 caso (2,5%)
- *Streptococcus mitis*: 2 casi (5,0%)
- *Escherichia coli*: 1 caso (2,5%)
- *Pseudomonas aeruginosa*: 1 caso (2,5%)

- *Cutibacterium* spp: 1 caso (2,5%)

Nel complesso, le infezioni sostenute da stafilococchi rappresentano 35 casi su 40 (87,5%), confermando il ruolo predominante di questo genere batterico nelle infezioni osteo-articolari e periprotetiche osservate nella popolazione in studio.

Tabella 2: Distribuzione dei microrganismi isolati nello studio

Microrganismo	Numero	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	17	42,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11	27,5
<i>Staphylococcus hominis</i>	3	7,5
<i>Staphylococcus caprae</i>	1	2,5
<i>Staphylooccus haemolyticus</i>	1	2,5
<i>Staphylococcus warneri</i>	2	5,0
<i>Escherichia coli</i>	1	2,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	2,5
<i>Cutibacterium</i> spp.	1	2,5
<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	2	5,0
Totale	40	100

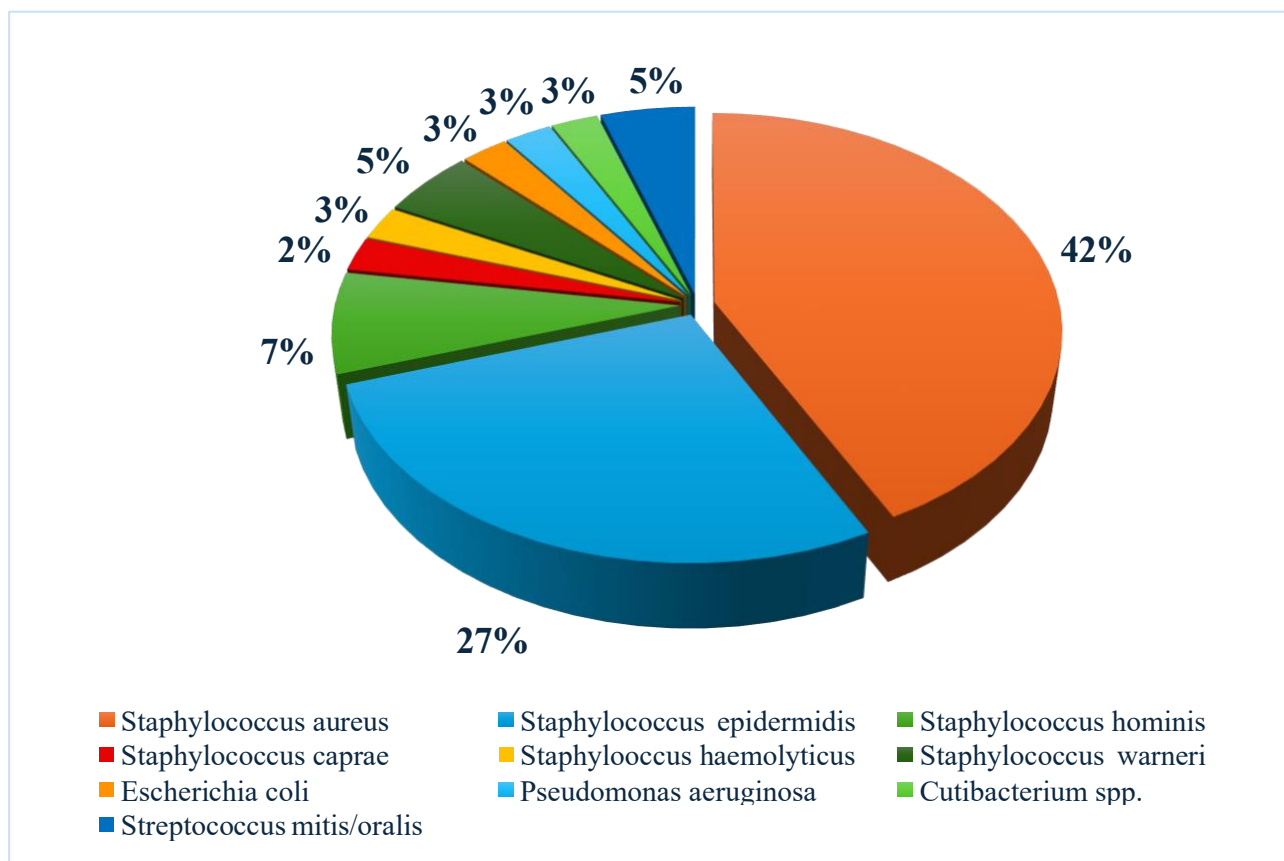


Grafico 2: Rappresentazione grafica della distribuzione dei microrganismi isolati

4.3 INFEZIONI DA STAPHYLOCOCCUS AUREUS: DISTINZIONE TRA MRSA E MSSA E RUOLO DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE

Nei 40 casi di infezione microbiologicamente accertata, *Staphylococcus aureus* è risultato il microrganismo più frequentemente isolato, con 17 riscontri (42,5%).

Tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi mediante biologia molecolare con sistema Xpert Cepheid e con utilizzo off-label del kit per emocolture *S.aureus*/MRSA, al fine di ottenere una eventuale rapida identificazione del ceppo di *S.aureus* con distinzione tra ceppi meticillino-resistenti (MRSA) o meticillino-sensibili (MSSA), con un tempo di risposta di circa 60 minuti.

La distribuzione dei ceppi, descritto dalla Tabella 3 e dal Grafico 3, è risultata la seguente:

- 12 casi di *S. aureus* meticillino-sensibile (70,6%);
- 5 casi di *S. aureus* meticillino-resistente (29,4%).

Tabella 3: Distribuzione dei ceppi meticillino-sensibili (MSSA) e meticillino-resistenti (MRSA)

Resistenza	Numero	%
MSSA	12	70,59
MRSA	5	29,41
Totale	17	100

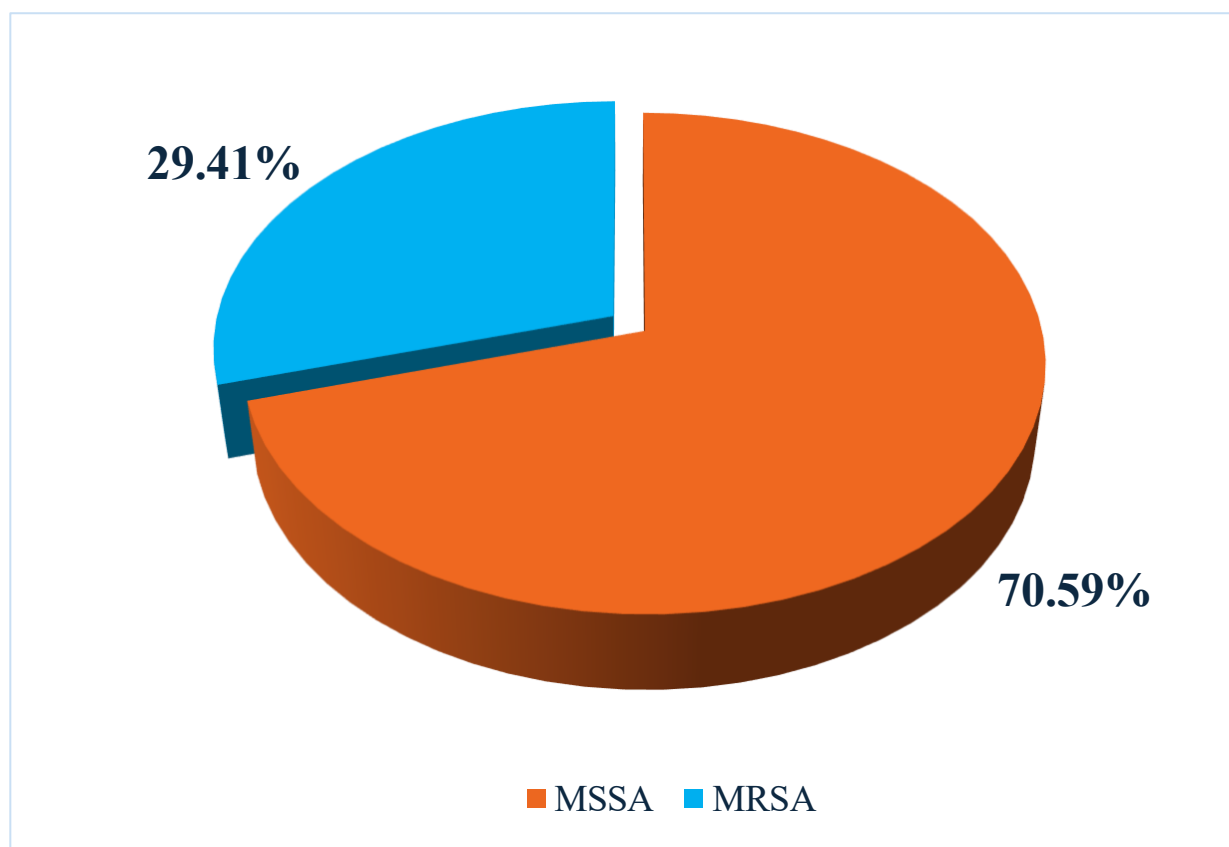


Grafico 3: Areogramma dei ceppi meticillino-sensibili (MSSA) e meticillino-resistenti (MRSA)

In caso di positività per *S.aureus*, si procede ad allertare il medico di reparto e le colture vengono monitorate per verificare se effettivamente il microrganismo era isolato anche a livello culturale. I risultati ottenuti con la metodica molecolare sono stati successivamente confrontati con l'antibiogramma tradizionale eseguito secondo le linee guida EUCAST, mostrando una concordanza del 100% tra le due tecniche diagnostiche (tutti gli MRSA e gli MSSA sono stati rilevati da entrambe le metodiche). Inoltre, come definito dalle Linee Guida EUCAST, ogni volta che veniva isolato uno *S.aureus* MRSA, la resistenza alla Cefoxitina veniva confermata con test di diffusione in agar.

4.4 RISULTATI DELL'ANTIBIOGRAMMA NEI MICRORGANISMI ISOLATI

Per tutti i microrganismi isolati nei casi di infezione accertata è stato eseguito l'antibiogramma secondo le linee guida EUCAST. A titolo dimostrativo, in Figura 19 è riportato un referto di antibiogramma rappresentativo.

CITTA' DI ALESSANDRIA POLICL. DI MONZA
Rapporto grafico Microbiologia

Cliente bioMérieux:

Nome paziente:

Posizione: ORT Medico:
ID lab.: Numero di isolato: 1

Quantità organismo:
Organismo selezionato: *Staphylococcus aureus* Prelevato: 31-gen-2025
Origine: PEZZO CHIRURGICO

Commenti:	A PARITA' DI FARMACOCINETICA E FARMACODINAMICA TRA LE MOLECOLE SENSIBILI SI CONSIGLIA DI UTILIZZARE LA MOLECOLA CON MIC PIU' DISTANTE DAL BREAKPOINT (LIMITE DI SENSIBILITA'). Ceppo di <i>Staphylococcus aureus</i> meticillino-resistente (MRSA), la terapia con beta-lattamici risulta inefficace.
------------------	---

Informazioni sull'antibiogramma	Tempo di analisi: 18,02 ore	Stato: Finale
--	-----------------------------	---------------

Antimicrobico	MIC	Interpretazione	Antimicrobico	MIC	Interpretazione
Cefoxitina screening	POS	+	Linezolid	2	S
Benzilpenicillina	$\geq 0,5$	R	Daptomicina	0,25	S
Oxacillina	≥ 4	R	Teicoplanina	$\leq 0,5$	S
Ceftarolina	0,25	S	Vancomicina	$\leq 0,5$	S
Gentamicina	$\leq 0,5$	S	Tetraciclina	≤ 1	S
Levofloxacina	4	R	Tigeciclina	$\leq 0,12$	S
Resistenza inducibile alla Clindamicina	NEG	-	Acido fusidico	$\leq 0,5$	S
Eritromicina	0,5	S	Rifampicina	$\leq 0,03$	S
Clindamicina	0,25	S	Trimetoprim/Sulfametossazolo	≤ 10	S

Conclusioni di AES	
Affidabilità:	Coerente

Figura 19: Referto di antibiogramma di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente.

Nei 5 ceppi di MRSA isolati è emerso un profilo di resistenza uniforme:

- cefoxitina: positiva in tutti i casi (100%)
- oxacillina: resistente in tutti i casi (100%)
- linezolid, daptomicina, vancomicina e teicoplanina: sensibili in tutti i casi (100%)

Nei 12 ceppi di MSSA:

- cefoxitina: negativa in tutti i casi (100%)
- oxacillina: sensibile in tutti i casi (100%)
- linezolid, daptomicina, vancomicina e teicoplanina: sensibili in tutti i casi (100%)

Per le altre specie di stafilococchi coagulasi-negativi sono stati osservati i seguenti profili:

- *Staphylococcus epidermidis* (11 casi):
 - 9 ceppi resistenti all'oxacillina (81,8%)
 - 2 ceppi sensibili all'oxacillina (18,2%)
 - tutti sensibili a linezolid, daptomicina, vancomicina e teicoplanina (100%)
- *Staphylococcus hominis* (3 casi):
 - tutti sensibili a oxacillina, linezolid, daptomicina, vancomicina e teicoplanina (100%)
- *Staphylococcus haemolyticus* (1 caso):
 - resistente all'oxacillina
 - sensibile agli altri antibiotici testati
- *Staphylococcus warneri* (2 casi):
 - entrambi sensibili a tutti gli antibiotici valutati

Per quanto riguarda i microrganismi Gram-negativi, l'isolato di *Pseudomonas aeruginosa* è risultato sensibile ai carbapenemi testati, in particolare a meropenem ed ertapenem. Analogamente, il ceppo di *Escherichia coli* isolato ha mostrato sensibilità completa, inclusi i carbapenemi, senza evidenza di valori di MIC indicativi di resistenza.

Nel complesso, i dati degli antibiogrammi confermano una buona attività degli antibiotici di ultima linea nei confronti degli stafilococchi isolati, inclusi i ceppi MRSA, e l'assenza di ceppi multiresistenti tra i Gram-negativi osservati nella popolazione in studio.

4.5 RISULTATI DEL CONTROLLO MICROBIOLOGICO DELLE MANI DEGLI OPERATORI SANITARI

Il controllo microbiologico delle mani è stato effettuato su un totale di 43 operatori sanitari, comprendenti diverse figure professionali, tra cui medici chirurghi, personale infermieristico, operatori sociosanitari e personale ausiliario.

Gli operatori appartenevano a differenti unità operative e aree assistenziali, tra cui sala operatoria di cardiologia, emodinamica, sala operatoria di ortopedia, terapia intensiva post-operatoria, reparti di ortopedia e cardiocirurgia, nonché ambulatori e area pre-ricoveri.

Il campionamento è stato eseguito prima e dopo il lavaggio sociale delle mani, al fine di valutare la carica microbica cutanea e l'efficacia delle procedure di igiene delle mani. (Figura 20)

Nel campionamento effettuato prima del lavaggio delle mani, tutti i 43 operatori sanitari (100%) hanno mostrato crescita microbica sulle piastre di agar sangue.

I microrganismi isolati erano prevalentemente rappresentati da stafilococchi coagulasi negativi, compatibili con la flora cutanea residente. In associazione agli stafilococchi coagulasi negativi, in 9 casi è stata inoltre riscontrata la presenza di *Bacillus* spp. 2 casi presentavano concomitante isolamento di *Micrococcus luteus*, mentre in un caso è stata rilevata anche la presenza di *Escherichia coli*. Tra i campioni pre-lavaggio 5 operatori sono risultati positivi anche per *Staphylococcus aureus*, di cui 3 MRSA e due MSSA.

Nel campionamento effettuato dopo il lavaggio sociale delle mani, 9 operatori sanitari hanno mostrato assenza di crescita microbica. Di questi, 7 operavano in sala operatoria, 1 in emodinamica e 1 in terapia intensiva post-operatoria.

I restanti 34 operatori presentavano ancora crescita batterica, seppur con riduzione significativa della carica microbica rispetto al campionamento pre-lavaggio.

Tra i campioni positivi post-lavaggio, 29 mostravano la presenza di stafilococchi coagulasi negativi, con cariche batteriche ridotte (valutate come “+”) rispetto alle cariche elevate (“+++”) osservate nel pre-lavaggio. In 3 casi è stato isolato *Micrococcus luteus*, mentre 2 operatori risultavano positivi per *Staphylococcus aureus* meticillino-sensibile (MSSA).

Non sono stati riscontrati ceppi di MRSA nel campionamento post-lavaggio.

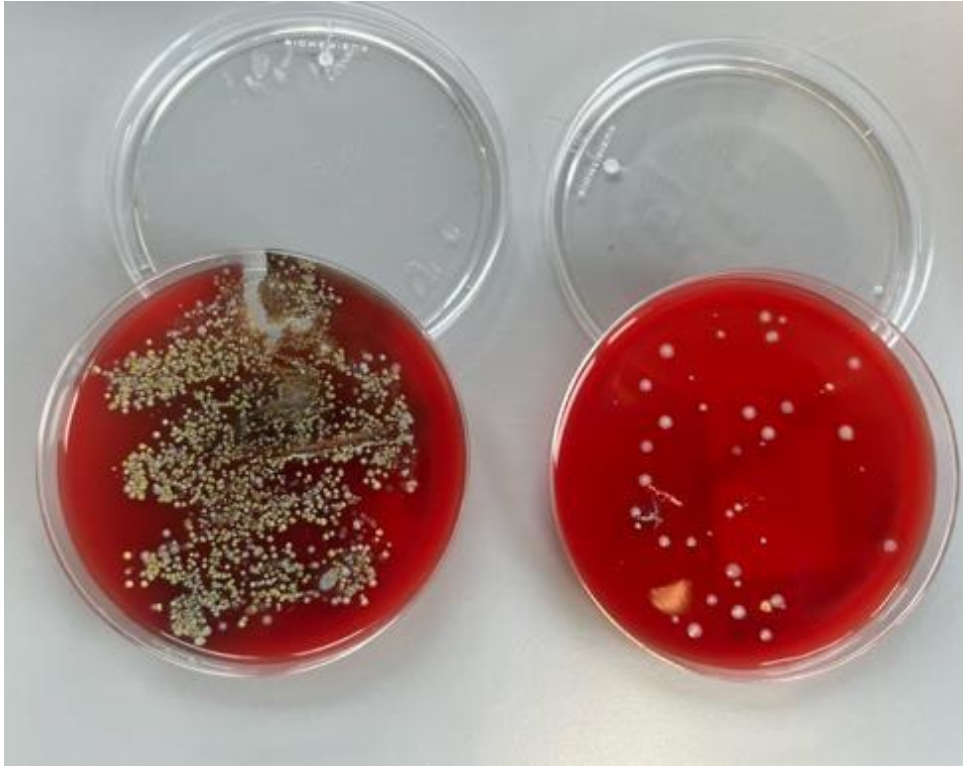


Figura 20: Crescita microbica su agar sangue da campionamento diretto di un operatore sanitario prima del lavaggio (a sinistra) e dopo il lavaggio sociale (a destra)

5. DISCUSSIONE

Le infezioni osteo-articolari e periprotetiche rappresentano una delle complicanze più rilevanti in ambito ortopedico, con un impatto significativo sulla qualità di vita dei pazienti. Come evidenziato in letteratura, l'incidenza delle infezioni periprotetiche varia dallo 0,3% all'1,9% in funzione della sede articolare e del tipo di impianto, e tali percentuali sono destinate ad aumentare parallelamente al crescente numero di interventi protesici eseguiti nella popolazione. (1) La gestione di queste infezioni richiede un approccio multidisciplinare che integri diagnosi microbiologica, strategia chirurgica e terapia antibiotica mirata, rendendo fondamentale il ruolo del laboratorio di microbiologia come punto essenziale dell'intero percorso diagnostico-terapeutico. (1)

Il presente studio, condotto su 556 campioni clinici provenienti da 94 pazienti nel periodo compreso tra ottobre 2025 e febbraio 2026, ha permesso di valutare l'efficacia dell'iter diagnostico microbiologico convenzionale integrato con metodiche di biologia molecolare nella diagnosi delle infezioni periprotetiche ortopediche. I risultati ottenuti offrono diversi spunti di riflessione che meritano di essere analizzati alla luce della letteratura scientifica disponibile.

5.1 DISTRIBUZIONE DEGLI ESITI MICROBIOLOGICI E CRITERI DI INTERPRETAZIONE

L'analisi dei 94 pazienti inclusi nello studio ha evidenziato che il 42,6% dei casi (40 pazienti) presentava un'infezione microbiologicamente accertata, il 48,9% (46 pazienti) ha mostrato colture negative e l'8,5% (8 pazienti) è stato classificato come contaminazione. Tali proporzioni risultano coerenti con quanto riportato dalla letteratura internazionale, secondo cui circa il 40-50% dei pazienti sottoposti a revisione protesica per sospetta infezione presenta effettivamente un'eziologia infettiva confermata (5, 12). La percentuale di contaminazioni osservata nel nostro studio (8,5%) appare contenuta e riflette l'adozione di rigorosi criteri interpretativi, in linea con le raccomandazioni AMCLI, che definiscono l'infezione periprotetica sulla base dell'isolamento dello stesso microrganismo con profilo di sensibilità sovrapponibile in almeno due campioni su un totale di 3-7 pezzi chirurgici prelevati per paziente (30).

La media di 5,9 campioni per paziente riscontrata nel presente studio è in accordo con le indicazioni delle linee guida WAIOT (World Association against Infection in Orthopaedics and Trauma), che raccomandano il prelievo di almeno 3-5 campioni tissutali periprotetici intraoperatori per massimizzare la sensibilità diagnostica e ridurre il rischio di risultati falsamente negativi o falsamente positivi (14). L'importanza del campionamento multiplo è stata ulteriormente sottolineata da Corvec et al. (2012), i quali hanno dimostrato che la probabilità di identificare correttamente il patogeno

responsabile aumenta proporzionalmente al numero di campioni analizzati, fino a raggiungere un plateau con 5-6 prelievi (5).

5.2 PREVALENZA DEI MICRORGANISMI ISOLATI E CONFRONTO CON LA LETTERATURA

I risultati del presente studio confermano la netta predominanza dei microrganismi Gram-positivi, in particolare degli stafilococchi, nelle infezioni periprotetiche. Il genere *Staphylococcus* spp. è stato isolato in 35 casi su 40 infezioni accertate (87,5%), con *S. aureus* quale microrganismo più frequente (42,5%), seguito da *S. epidermidis* (27,5%). Questi dati sono in linea con quanto ampiamente documentato nella letteratura, dove gli stafilococchi rappresentano complessivamente il 60-80% degli agenti eziologici delle infezioni periprotetiche (1, 19, 20). In particolare, *S. aureus* è riconosciuto come il principale responsabile delle infezioni acute e precoci, caratterizzate da un esordio clinico più evidente e da una maggiore aggressività del quadro infettivo, mentre gli stafilococchi coagulasi-negativi, tra cui *S. epidermidis*, predominano nelle infezioni croniche e tardive, spesso associate alla formazione di biofilm sulla superficie dell'impianto (19, 22).

La presenza, seppur minoritaria, di microrganismi Gram-negativi quali *Pseudomonas aeruginosa* (2,5%) ed *Escherichia coli* (2,5%) è anch'essa coerente con i dati epidemiologici riportati in letteratura, dove i Gram-negativi rappresentano circa il 5-15% dei casi di infezione periprotetica (1, 16). L'isolamento di *Cutibacterium* spp. in un caso (2,5%) merita una menzione particolare: questo microrganismo anaerobio a crescita lenta è spesso coinvolto nelle infezioni protesiche della spalla ed è frequentemente sottostimato a causa della necessità di tempi di incubazione prolungati, fino a 14 giorni, per il suo rilevamento colturale (26). La sua identificazione nel nostro studio sottolinea l'importanza di adottare protocolli di incubazione estesa, come effettivamente applicato.

L'isolamento di *Streptococcus mitis/oralis* in 2 casi (5,0%) è un dato di interesse clinico, in quanto questo microrganismo, tipicamente commensale del cavo orale, può raggiungere le sedi protesiche per via ematogena, configurando un quadro di infezione ematogena tardiva. Questo meccanismo patogenetico sottolinea la necessità di una valutazione clinica completa del paziente, inclusa l'anamnesi odontoiatrica, nella gestione diagnostica delle infezioni periprotetiche (16, 20).

5.3 RUOLO DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE: SISTEMA XPERT CEPHEID E UTILIZZO OFF-LABEL

Uno degli aspetti più innovativi del presente studio è rappresentato dall'utilizzo off-label del sistema Xpert Cepheid, originariamente sviluppato per le emocolture, applicato direttamente ai campioni chirurgici periprotetici per la rapida identificazione di *S. aureus* e la discriminazione tra ceppi meticillino-sensibili (MSSA) e meticillino-resistenti (MRSA). I risultati ottenuti sono particolarmente

significativi: la concordanza del 100% tra la metodica molecolare e l'antibiogramma tradizionale eseguito secondo le linee guida EUCAST dimostra l'elevata affidabilità diagnostica di questo approccio, confermando quanto già suggerito da studi precedenti sull'applicazione di metodiche molecolari rapide nella diagnostica delle infezioni osteo-articolari (31, 33, 34).

Il vantaggio clinico principale della diagnostica molecolare risiede nella drastica riduzione dei tempi di refertazione: mentre le metodiche colturali tradizionali richiedono tipicamente 24-72 ore per l'identificazione del microrganismo e ulteriori 24-48 ore per l'antibiogramma, il sistema Xpert Cepheid consente di ottenere un risultato in circa 60 minuti dal caricamento del campione. Questa tempestività si traduce in un beneficio clinico concreto per il paziente, poiché consente di impostare fin dalle prime ore una terapia antibiotica mirata anziché empirica (31). Tale aspetto è particolarmente rilevante nel contesto delle infezioni periprotetichiche, dove il ritardo nell'avvio di una terapia appropriata è stato correlato a una riduzione delle probabilità di eradicazione dell'infezione e al rischio di dover ricorrere a interventi chirurgici più demolitivi (17).

Nel nostro studio, l'identificazione rapida dei 5 ceppi di MRSA (29,4% degli *S. aureus* isolati) ha consentito di evitare la prosecuzione di una terapia empirica con beta-lattamici, notoriamente inefficaci sui ceppi meticillino-resistenti, orientando tempestivamente il clinico verso l'impiego di molecole attive quali la vancomicina. Analogamente, nei 12 casi di MSSA (70,6%), la conferma molecolare della meticillino-sensibilità ha permesso di mantenere una terapia mirata con antibiotici beta-lattamici, evitando il ricorso non necessario ad antibiotici a più ampio spettro. Questo approccio contribuisce significativamente alla riduzione della pressione selettiva per lo sviluppo di ceppi multiresistenti, in linea con i principi dell'antimicrobial stewardship sempre più evidenziati dalle linee guida internazionali (28, 29).

La percentuale di MRSA osservata nel nostro studio (29,4%) risulta leggermente superiore rispetto a quanto riportato da alcuni studi europei, che collocano la prevalenza di MRSA nelle infezioni periprotetichiche intorno al 15-25% (16, 20). Tale dato potrebbe riflettere differenze epidemiologiche locali o caratteristiche specifiche della popolazione in studio, e merita di essere monitorato nel tempo per valutare eventuali tendenze evolutive nella resistenza antimicrobica a livello regionale.

5.4 PROFILI DI RESISTENZA ANTIBIOTICA

I risultati degli antibiogrammi eseguiti sui microrganismi isolati forniscono informazioni rassicuranti per quanto riguarda la sensibilità agli antibiotici di ultima linea. Tutti i ceppi di *S. aureus*, sia MSSA che MRSA, hanno mostrato piena sensibilità a linezolid, daptomicina, vancomicina e teicoplanina, confermando la conservata efficacia di queste molecole nel trattamento delle infezioni stafilococciche gravi (28, 29). Analogamente, l'assenza di resistenza ai carbapenemi nei Gram-negativi isolati (*P.*

aeruginosa ed *E. coli*) rappresenta un dato favorevole nel contesto dell'attuale scenario globale di diffusione delle resistenze ai carbapenemi.

Di particolare interesse è il profilo di resistenza osservato in *S. epidermidis*, dove 9 ceppi su 11 (81,8%) sono risultati resistenti all'oxacillina. Questa elevata percentuale di meticillino-resistenza tra gli stafilococchi coagulasi-negativi è in linea con i dati della letteratura, che riportano tassi di resistenza alla meticillina superiori al 70-80% in questa specie, soprattutto nei microrganismi associati a infezioni ospedaliere (19). Tale dato sottolinea l'importanza di non sottovalutare il ruolo di *S. epidermidis* nelle infezioni periprotetiche e di eseguire sistematicamente l'antibiogramma per guidare la scelta terapeutica, evitando l'impiego empirico di beta-lattamici che risulterebbero inefficaci nella maggior parte dei casi.

5.5 IL RUOLO DELLA SONICAZIONE NELL'ITER DIAGNOSTICO

Nel presente studio, la sonicazione è stata adottata come metodica standard per il trattamento dei mezzi di osteosintesi, consentendo il distacco dei microrganismi organizzati in biofilm dalle superfici dei dispositivi. Questo approccio si è dimostrato fondamentale per incrementare la sensibilità diagnostica, in accordo con i risultati dello studio di Sambri et al. (2018) (51), che ha evidenziato come la sonicazione migliori significativamente il rilevamento microbico rispetto alle sole colture di tessuto, soprattutto nei casi di infezioni sostenute da stafilococchi coagulasi-negativi (51). La capacità del biofilm di proteggere i microrganismi dall'azione degli antibiotici e dalle difese immunitarie dell'ospite rappresenta una delle principali sfide nella diagnosi e nel trattamento delle infezioni periprotetiche (22, 23). La disgregazione meccanica ottenuta mediante sonicazione consente di liberare i batteri sessili dal biofilm, rendendoli accessibili alle metodiche colturali e molecolari e aumentando così la probabilità di una corretta identificazione eziologica (4, 24, 41, 42).

5.6 IGIENE DELLE MANI E PREVENZIONE DELLE INFEZIONI CORRELATE ALL'ASSISTENZA

Accanto alla componente diagnostica, il presente studio ha incluso una valutazione del controllo microbiologico delle mani degli operatori sanitari, aspetto trasversale ma di fondamentale importanza nella prevenzione delle infezioni correlate all'assistenza. I risultati hanno evidenziato come il lavaggio sociale delle mani sia efficace nel ridurre significativamente la carica microbica cutanea, con risultati particolarmente soddisfacenti tra gli operatori delle sale operatorie, dove 7 su 9 campioni negativi post-lavaggio provenivano da questo setting. Tale osservazione è coerente con la maggiore attenzione alle procedure di antisepsi tipica degli ambienti chirurgici, dove la percezione del rischio infettivo è generalmente più elevata (37, 38).

Nei reparti di degenza, la riduzione della carica microbica post-lavaggio è risultata meno marcata, con persistenza di microbiota cutaneo residente in 34 operatori su 43. Questo dato, pur atteso dal punto di vista microbiologico, suggerisce la necessità di rafforzare i programmi di formazione e sensibilizzazione sull'igiene delle mani, con particolare attenzione alla corretta tecnica di lavaggio, alla durata della procedura e all'utilizzo sistematico di soluzioni antisettiche a base alcolica o di clorexidina (39, 40). Il riscontro di 5 operatori positivi per *Staphylococcus aureus* nel campionamento pre-lavaggio, di cui 3 MRSA, rappresenta un dato particolarmente significativo dal punto di vista epidemiologico, in quanto la colonizzazione transitoria o persistente delle mani degli operatori sanitari da parte di *S. aureus*, specialmente ceppi meticillino-resistenti, costituisce un potenziale veicolo di trasmissione crociata dell'infezione ai pazienti. L'assenza di ceppi MRSA nel campionamento post-lavaggio conferma l'efficacia del lavaggio sociale nell'eliminare la flora microbica transitoria, inclusi i ceppi potenzialmente patogeni (40).

È importante sottolineare che questa indagine sulle mani degli operatori sanitari non ha avuto esclusivamente una finalità valutativa, ma ha rappresentato anche un'occasione formativa, contribuendo a sensibilizzare tutto il personale sull'importanza dell'igiene delle mani come misura fondamentale di prevenzione delle infezioni correlate all'assistenza. L'Organizzazione Mondiale della Sanità identifica infatti il lavaggio delle mani come la singola misura più efficace nella prevenzione della trasmissione di microrganismi in ambito sanitario (40).

5.7 LIMITI DELLO STUDIO E PROSPETTIVE FUTURE

Il presente studio mostra alcune limitazioni che è opportuno considerare. In primo luogo, la dimensione campionaria, pur essendo adeguata per uno studio prospettico monocentrico, non consente di generalizzare i risultati a contesti epidemiologici differenti. In secondo luogo, l'utilizzo off-label del sistema Xpert Cepheid, pur avendo dimostrato un'eccellente concordanza con le metodiche tradizionali, necessita di ulteriori validazioni su casistiche più ampie per consolidarne l'applicabilità clinica routinaria. Inoltre, lo studio si è focalizzato prevalentemente sulla rilevazione di *S. aureus* e sulla distinzione MRSA/MSSA, non includendo la ricerca molecolare di altri patogeni potenzialmente rilevanti nelle infezioni periprotesiche.

In prospettiva futura, sarebbe auspicabile ampliare il pannello molecolare a disposizione, includendo la PCR per il gene 16S rRNA e le tecniche di sequenziamento metagenomico di nuova generazione (NGS), che consentirebbero l'identificazione simultanea di un ampio spettro di microrganismi, inclusi quelli difficilmente coltivabili con le metodiche tradizionali (33, 34, 35). L'integrazione di queste tecnologie avanzate nell'iter diagnostico delle infezioni periprotesiche potrebbe rappresentare un

significativo progresso nella gestione di questi pazienti, contribuendo a ridurre ulteriormente i tempi diagnostici e a migliorare l'appropriatezza terapeutica.

6. CONCLUSIONI

Il presente studio ha analizzato in maniera prospettica l'intero percorso diagnostico delle infezioni periprotetichiche ortopediche, dalla fase pre-analitica di raccolta e trasporto dei campioni fino all'identificazione microbiologica e alla caratterizzazione del profilo di resistenza antibiotica, integrando le metodiche colturali convenzionali con tecniche di biologia molecolare rapida. L'analisi complessiva di 556 campioni clinici provenienti da 94 pazienti ha consentito di ottenere un quadro dettagliato dell'epidemiologia microbiologica locale e di valutare il contributo delle diverse metodiche diagnostiche impiegate.

I risultati hanno confermato la predominanza del genere *Staphylococcus* spp. nelle infezioni periprotetichiche, con una prevalenza complessiva dell'87,5% tra i microrganismi isolati. *Staphylococcus aureus* si è confermato l'agente eziologico più frequente (42,5%), seguito da *Staphylococcus epidermidis* (27,5%), in linea con i dati ampiamente riportati dalla letteratura scientifica internazionale. (19, 20) Il riconoscimento della netta predominanza stafilococcica nelle infezioni periprotetichiche ha importanti implicazioni sia diagnostiche che terapeutiche, orientando la scelta dei protocolli di laboratorio e delle strategie antibiotiche empiriche iniziali.

Uno dei contributi più significativi del presente lavoro è rappresentato dalla validazione dell'utilizzo off-label del sistema Xpert Cepheid per emocolture *S. aureus*/MRSA, applicato direttamente ai campioni chirurgici periprotetichici. La concordanza del 100% tra i risultati della metodica molecolare e quelli dell'antibiogramma tradizionale eseguito secondo le linee guida EUCAST rappresenta un dato di notevole rilevanza, che conferma l'affidabilità di questo approccio innovativo nella pratica clinica. La possibilità di ottenere in circa 60 minuti l'identificazione di *S. aureus* e la contemporanea discriminazione tra ceppi MSSA e MRSA costituisce un vantaggio clinico sostanziale, consentendo al clinico di impostare fin dalle prime ore una terapia antibiotica mirata e riducendo significativamente la finestra temporale in cui il paziente è esposto a una terapia empirica potenzialmente inappropriata.

L'impatto clinico di questa tempestività diagnostica è stato particolarmente evidente nei 5 casi di MRSA identificati nel nostro studio (29,4% degli *S. aureus* isolati), dove la diagnosi molecolare rapida ha permesso di abbandonare precocemente la terapia con beta-lattamici, risultata inefficace, a favore di molecole attive sui ceppi meticillino-resistenti come la vancomicina. Nei 12 casi di MSSA, la conferma molecolare della meticillino-sensibilità ha invece consentito di mantenere una terapia mirata con beta-lattamici, evitando il ricorso superfluo ad antibiotici a più ampio spettro. Questo duplice beneficio si inserisce pienamente nei principi dell'antimicrobial stewardship, contribuendo a

un uso più razionale e responsabile degli antibiotici e alla riduzione della pressione selettiva per lo sviluppo di resistenze. (28, 29)

I profili di resistenza antibiotica emersi dallo studio offrono un quadro complessivamente rassicurante: tutti i ceppi di *S. aureus* hanno mantenuto piena sensibilità agli antibiotici come linezolid, daptomicina, vancomicina e teicoplanina, ed i microrganismi Gram-negativi isolati non hanno mostrato resistenza ai carbapenemi. Tuttavia, l'elevata percentuale di meticillino-resistenza osservata in *Staphylococcus epidermidis* (81,8%) rappresenta un dato epidemiologico che richiede attenzione costante e che sottolinea la necessità di eseguire sistematicamente l'antibiogramma su tutti gli isolati, senza assumere una sensibilità empirica per gli stafilococchi coagulasi-negativi.

La sonicazione dei mezzi di osteosintesi si è confermata una metodica imprescindibile nell'iter diagnostico delle infezioni periprotetichiche, in quanto consente il distacco dei microrganismi organizzati in biofilm dalle superfici degli impianti, incrementando la sensibilità diagnostica delle colture microbiologiche. La capacità del biofilm di proteggere i batteri dall'azione degli antibiotici e dalle difese immunitarie dell'ospite rende indispensabile la sua disgregazione prima delle analisi colturali, come raccomandato dalle linee guida internazionali e confermato dai risultati della letteratura. Il trattamento mediante sonicazione si dimostra pertanto un passaggio critico che ogni laboratorio di microbiologia clinica impegnato nella diagnostica delle infezioni associate agli impianti dovrebbe adottare come pratica routinaria.

Un ulteriore aspetto di rilievo emerso dal presente studio riguarda l'indagine microbiologica delle mani degli operatori sanitari. Il controllo effettuato su 43 operatori ha dimostrato l'efficacia del lavaggio sociale nel ridurre la carica microbica cutanea, con risultati particolarmente soddisfacenti negli operatori delle sale operatorie. Il riscontro di 5 operatori portatori di *Staphylococcus aureus* nel campionamento pre-lavaggio, di cui 3 MRSA, e l'assenza completa di ceppi meticillino-resistenti dopo il lavaggio, confermano il ruolo chiave dell'igiene delle mani come prima barriera contro la trasmissione crociata di patogeni in ambito ospedaliero. Questa indagine ha avuto anche una importante valenza formativa, contribuendo a rafforzare la consapevolezza di tutto il personale sanitario sull'importanza delle corrette pratiche di antisepsi nella tutela del paziente e nella prevenzione delle infezioni correlate all'assistenza.

In sintesi, il presente lavoro evidenzia come l'integrazione tra diagnostica molecolare rapida e metodiche microbiologiche tradizionali, associata all'impiego della sonicazione per il trattamento dei dispositivi impiantabili, rappresenti un approccio diagnostico efficace e affidabile per la gestione delle infezioni periprotetichiche ortopediche. La tempestività diagnostica offerta dalla biologia molecolare, unita all'accuratezza delle metodiche colturali convenzionali, consente di ottimizzare il

percorso diagnostico-terapeutico a beneficio del paziente, riducendo i tempi di identificazione del patogeno e migliorando l'appropriatezza della terapia antibiotica.

Parallelamente, lo studio evidenzia l'importanza delle misure di prevenzione, ed in particolare dell'igiene delle mani, come strumento fondamentale per il contenimento del rischio infettivo in ambito ospedaliero. La formazione continua del personale sanitario e il monitoraggio microbiologico rappresentano elementi essenziali per mantenere elevati standard di sicurezza e per garantire la protezione dei pazienti, soprattutto in contesti ad alto rischio come la chirurgia ortopedica protesica.

In prospettiva futura, l'ampliamento del pannello di indagini molecolari, con l'introduzione di tecnologie quali la PCR per il gene 16S rRNA e il sequenziamento metagenomico di nuova generazione, potrà ulteriormente affinare la capacità diagnostica nei confronti delle infezioni periprotetiche, consentendo l'identificazione di microrganismi difficilmente coltivabili e l'analisi simultanea di comunità microbiche complesse. L'evoluzione delle tecniche diagnostiche, unita a un approccio multidisciplinare che coinvolga ortopedici, infettivologi e microbiologi, rappresenta la strada più promettente per migliorare gli esiti clinici e la qualità di vita dei pazienti affetti da questa complicanza della chirurgia protesica.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Del Pozo JL, Patel R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *N Engl J Med*. 2009 Aug 20;361(8):787-94. doi: 10.1056/NEJMcp0905029. PMID: 19692690; PMCID: PMC2850113.
2. Wildeman P, Rolfson O, Söderquist B, Wretenberg P, Lindgren V. What Are the Long-term Outcomes of Mortality, Quality of Life, and Hip Function after Prosthetic Joint Infection of the Hip? A 10-year Follow-up from Sweden. *Clin Orthop Relat Res*. 2021 Oct 1;479(10):2203-2213. doi: 10.1097/CORR.0000000000001838. PMID: 34061486; PMCID: PMC8445574.
3. Zimmerli W, Sendi P. Pathogenesis of implant-associated infection: the role of the host. *Semin Immunopathol*. 2011 May;33(3):295-306. doi: 10.1007/s00281-011-0275-7. Epub 2011 May 21. PMID: 21603890.
4. Drago L, De Vecchi E. Microbiological Diagnosis of Implant-Related Infections: Scientific Evidence and Cost/Benefit Analysis of Routine Antibiofilm Processing. *Adv Exp Med Biol*. 2017;971:51-67. doi: 10.1007/5584_2016_154. Erratum in: *Adv Exp Med Biol*. 2017;971:113. doi: 10.1007/5584_2017_21. PMID: 27815925.
5. Corvec S, Portillo ME, Pasticci BM, Borens O, Trampuz A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int J Artif Organs*. 2012 Oct;35(10):923-34. doi: 10.5301/ijao.5000168. PMID: 23138706.
6. Parvizi J, Zmistowski B, Berbari EF, Bauer TW, Springer BD, Della Valle CJ, Garvin KL, Mont MA, Wongworawat MD, Zalavras CG. New definition for periprosthetic joint infection: from the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. *Clin Orthop Relat Res*. 2011 Nov;469(11):2992-4. doi: 10.1007/s11999-011-2102-9. PMID: 21938532; PMCID: PMC3183178.
7. Schinsky MF, Della Valle CJ, Sporer SM, Paprosky WG. Perioperative testing for joint infection in patients undergoing revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Sep;90(9):1869-75. doi: 10.2106/JBJS.G.01255. Erratum in: *J Bone Joint Surg Am*. 2010 Mar;92(3):707. PMID: 18762646.
8. Dinneen A, Guyot A, Clements J, Bradley N. Synovial fluid white cell and differential count in the diagnosis or exclusion of prosthetic joint infection. *Bone Joint J*. 2013 Apr;95-B(4):554-7. doi: 10.1302/0301-620X.95B4.30388. PMID: 23539710.
9. Aggarwal VK, Tischler E, Ghanem E, Parvizi J. Leukocyte esterase from synovial fluid aspirate: a technical note. *J Arthroplasty*. 2013 Jan;28(1):193-5. doi: 10.1016/j.arth.2012.06.023. Epub 2012 Aug 3. PMID: 22868070.

10. Berbari E, Mabry T, Tsaras G, Spangehl M, Erwin PJ, Murad MH, Steckelberg J, Osmon D. Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 2010 Sep 1;92(11):2102-9. doi: 10.2106/JBJS.I.01199. PMID: 20810860.
11. Mikhael MM, Hanssen AD, Sierra RJ. Failure of metal-on-metal total hip arthroplasty mimicking hip infection. A report of two cases. *J Bone Joint Surg Am.* 2009 Feb;91(2):443-6. doi: 10.2106/JBJS.H.00603. PMID: 19181991.
12. Zmistowski B, Della Valle C, Bauer TW, Malizos KN, Alavi A, Bedair H, Booth RE, Choong P, Deirmengian C, Ehrlich GD, Gambir A, Huang R, Kissin Y, Kobayashi H, Kobayashi N, Krenn V, Lorenzo D, Marston SB, Meermans G, Perez J, Ploegmakers JJ, Rosenberg A, C Simpfendorfer, Thomas P, Tohtz S, Villafuerte JA, Wahl P, Wagenaar FC, Witzo E. Diagnosis of periprosthetic joint infection. *J Orthop Res.* 2014 Jan;32 Suppl 1:S98-107. doi: 10.1002/jor.22553. PMID: 24464903.
13. Tsaras G, Maduka-Ezeh A, Inwards CY, Mabry T, Erwin PJ, Murad MH, Montori VM, West CP, Osmon DR, Berbari EF. 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 Sep 19;94(18):1700-11. doi: 10.2106/JBJS.J.00756. PMID: 22992880.
14. Drago L, Clerici P, Morelli I, Ashok J, Benzakour T, Bozhkova S, Alizadeh C, Del Sel H, Sharma HK, Peel T, Mattina R, Romanò CL. 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 Jun 28;8(7):933. doi: 10.3390/jcm8070933. PMID: 31261744; PMCID: PMC6678965.
15. Bozhkova S, Suardi V, Sharma HK, Tsuchiya H, Del Sel H, Hafez MA, Benzakour T, Drago L, Romanò CL. The W.A.I.O.T. Definition of Peri-Prosthetic Joint Infection: A Multi-center, Retrospective Validation Study. *J Clin Med.* 2020 Jun 23;9(6):1965. doi: 10.3390/jcm9061965. PMID: 32585959; PMCID: PMC7356190.
16. Moran E, Byren I, Atkins BL. The diagnosis and management of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Nov;65 Suppl 3:iii45-54. doi: 10.1093/jac/dkq305. PMID: 20876628.
17. Davis JS, Metcalf S, Clark B, Robinson JO, Huggan P, Luey C, McBride S, Aboltins C, Nelson R, Campbell D, Solomon LB, Schneider K, Loewenthal MR, Yates P, Athan E, Cooper D, Rad B, Allworth T, Reid A, Read K, Leung P, Sud A, Nagendra V, Chean R, Lemoh C, Mutalima N, Tran T, Grimwade K, Sehu M, Looke D, Torda A, Aung T, Graves S, Paterson DL, Manning L. Predictors of Treatment Success After Periprosthetic Joint Infection: 24-Month Follow up

- From a Multicenter Prospective Observational Cohort Study of 653 Patients. *Open Forum Infect Dis.* 2022 Feb 2;9(3):ofac048. doi: 10.1093/ofid/ofac048. PMID: 35233433; PMCID: PMC8882242.
18. Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury.* 2006 May;37 Suppl 2:S59-66. doi: 10.1016/j.injury.2006.04.010. PMID: 16651073.
 19. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Oct;27(4):870-926. doi: 10.1128/CMR.00109-13. PMID: 25278577; PMCID: PMC4187637.
 20. Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly.* 2005 Apr 30;135(17-18):243-51. doi: 10.4414/smw.2005.10934. PMID: 15965826.
 21. PHE 2016 Public Health England. (2016). Investigation of Orthopaedic implant associated infections. UK Standards for Microbiology Investigations. B 44 Emissione n°2 del 23 febbraio 2016. https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/504319/B_44_i2.pdf.
 22. McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirtliff M, Kathju S, Stoodley P. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol.* 2014;9(8):987-1007. doi: 10.2217/fmb.14.64. Erratum in: *Future Microbiol.* 2014;9(10):1234. PMID: 25302955; PMCID: PMC4407677.
 23. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):167-93. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002. PMID: 11932229; PMCID: PMC118068.
 24. Portillo ME, Salvadó M, Alier A, Martínez S, Sorli L, Horcajada JP, Puig L. Advantages of sonication fluid culture for the diagnosis of prosthetic joint infection. *J Infect.* 2014 Jul;69(1):35-41. doi: 10.1016/j.jinf.2014.03.002. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24631778.
 25. <https://theory.labster.com/it/differential-selective-media>
 26. Butler-Wu SM, Burns EM, Pottinger PS, Magaret AS, Rakeman JL, Matsen FA 3rd, Cookson BT. Optimization of periprosthetic culture for diagnosis of *Propionibacterium acnes* prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* 2011 Jul;49(7):2490-5. doi: 10.1128/JCM.00450-11. Epub 2011 May 4. PMID: 21543562; PMCID: PMC3147880.
 27. bioMérieux. *VITEK® 2 System User Manual*. bioMérieux, 2021.

28. EUCAST. *Breakpoints and Guidance Documents*. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Version 13.0, 2023. <https://www.eucast.org>
29. EUCAST. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Version 13.0, 2023. <https://www.eucast.org>
30. <https://amcli.it>
31. Zhang Y, Feng S, Chen W, Zhang QC, Shi SF, Chen XY. Vantaggi della PCR 16S rRNA per la diagnosi di infezione protesica dell'articolazione. *Exp Ther Med*. 2020 Ott;20(4):3104-3113. doi: 10.3892/etm.2020.9082. Epub 2020 29 luglio. PMID: 32855678; PMCID: PMC7444347.
32. A.V. slide “Tecniche Biomolecolari” del corso di Biochimica Applicata 2024/25 <https://www.dir.uniupo.it/mod/folder/view.php?id=649880>
33. Marín M, Garcia-Lechuz JM, Alonso P, Villanueva M, Alcalá L, Gimeno M, Cercenado E, Sánchez-Somolinos M, Radice C, Bouza E. Role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol*. 2012 Mar;50(3):583-9. doi: 10.1128/JCM.00170-11. Epub 2011 Dec 14. PMID: 22170934; PMCID: PMC3295163.
34. Lee MS, Chang WH, Chen SC, Hsieh PH, Shih HN, Ueng SW, Lee GB. Molecular diagnosis of periprosthetic joint infection by quantitative RT-PCR of bacterial 16S ribosomal RNA. *ScientificWorldJournal*. 2013 Dec 17;2013:950548. doi: 10.1155/2013/950548. PMID: 24453929; PMCID: PMC3877643.
35. Olearo F, Zein SE, Portillo ME, Zapf A, Rohde H, Berbari EF, Wouthuyzen-Bakker M; gruppo di studio ESCMID sulle infezioni associate agli impianti (ESGIAI) e il gruppo di lavoro molecolare per la task force di definizione PJI unificata. Accuratezza diagnostica di 16S rDNA PCR, multiplex PCR e sequenziamento metagenomico di nuova generazione nelle infezioni articolari periprotetiche: una revisione sistematica e una meta-analisi. *Clin Microbiol Infettare*. 2025 Lug;31(7):1115-1125. doi: 10.1016/j.cmi.2025.02.022. Epub 2025 27 febbraio. PMID: 40023316.
36. Cepheid – Xpert MRSA/SA Blood Culture CE-IVD – Foglio illustrativo (IFU)
“Xpert MRSA/SA Blood Culture CE-IVD – Instructions For Use, Cod. 302-0493 (Rev. C)”.
37. Hosseini P, Mundis GM Jr, Eastlack R, Nourian A, Pawelek J, Nguyen S, Akbarnia BA. Do Longer Surgical Procedures Result in Greater Contamination of Surgeons' Hands? *Clin Orthop Relat Res*. 2016 Jul;474(7):1707-13. doi: 10.1007/s11999-016-4832-1. Epub 2016 Apr 18. PMID: 27090260; PMCID: PMC4887375.

38. Pegu KD, Perrie H, Scribante J, Fourtounas M. Microbial contamination of the hands of healthcare providers in the operating theatre of a central hospital. *S Afr J Infect Dis*. 2021 Apr 8;36(1):221. doi: 10.4102/sajid.v36i1.221. PMID: 34485495; PMCID: PMC8378170.
39. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Core Infection Prevention and Control Practices, 2024
40. Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS): Linee guida OMS sull'igiene delle mani nell'assistenza sanitaria, 2007
41. Holinka J, Bauer L, Hirschl AM, Graninger W, Windhager R, Presterl E. Sonication cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological diagnostics improve pathogen detection. *J Orthop Res*. 2011 Apr;29(4):617-22. doi: 10.1002/jor.21286. Epub 2010 Dec 7. PMID: 21337398.
42. Kamineni S, Huang C. The antibacterial effect of sonication and its potential medical application. *SICOT J*. 2019;5:19. doi: 10.1051/sicotj/2019017. Epub 2019 Jun 17. PMID: 31204648; PMCID: PMC6572995.
43. IL713.05.4_Vasca ad ultrasuoni SONICA serie S3 modello MH 3300
44. bioMérieux – VITEK 2 System: User Manual. bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia.
45. bioMérieux – DensiCHEK Plus: Manuale d'uso. bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia.
46. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) – Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100, Wayne, PA, USA.
47. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) – Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Versione aggiornata.
48. Ministero della Salute (Italia) – Linee guida per la sicurezza nei laboratori di microbiologia.
49. Archivio informatico del sistema automatizzato Vitek2 (bioMérieux)
50. Archivio software del sistema GeneXpert (Cepheid).
51. Sambri A, Cadossi M, Giannini S, et al., Is Treatment With Dithiothreitol More Effective Than Sonication for the Diagnosis of Prosthetic Joint Infection? *Clin Orthop Relat Res*. 2018 Jan; 476(1): 137–145.

8. RINGRAZIAMENTI

Arrivata alla fine di questo percorso, desidero ringraziare chi lo ha reso possibile.

Vorrei esprimere la mia sincera gratitudine alla mia relatrice, la Prof.ssa Elisa Gamalero, per la guida e il supporto costante durante la stesura di questo lavoro. La sua professionalità e i suoi consigli sono stati fondamentali per la realizzazione di questa tesi.

Un immenso grazie alla mia tutor di tirocinio, la Dott.ssa Samantha Sottotetti, per la sua pazienza, gentilezza, disponibilità e per tutto ciò che mi ha insegnato durante questa esperienza.

Ringrazio tutto il Laboratorio Analisi della Clinica Città di Alessandria, Francesca, Simona, Morena, Lucia, Luca e Marco per avermi accolta e fatta sentire parte del gruppo fin dal primo giorno.

Ringrazio il mio fidanzato, Fede, per non aver mai smesso di credere in me, anche nei momenti in cui io stessa facevo fatica a farlo. Grazie per avermi sempre sostenuta e per aver camminato accanto a me lungo questo percorso, così come in tutti quelli che affronteremo e sceglieremo insieme.

Alla mia migliore amica, Ceci, grazie per esserci sempre stata: per l'ascolto, per le parole dette al momento giusto e per quelle che non avevano bisogno di spiegazioni. Sapere che, ovunque saremo, resteremo un punto fermo l'una per l'altra è una certezza che porto con me in tutto ciò che faccio.

Il ringraziamento più grande va a mamma, papà, ai miei nonni e a tutta la mia famiglia. Ci sono stati momenti in cui la strada si è fatta più ripida di quanto immaginassimo, momenti che ci hanno spaventati, fermati e messi alla prova. Sono stati però anche gli stessi che ci hanno uniti ancora di più e ci hanno insegnato a ripartire insieme. Se oggi scrivo queste parole è perché non ho mai dovuto essere forte da sola: la forza me l'avete donata voi, con la vostra presenza costante, con le attese silenziose e con quegli sguardi che dicevano semplicemente: "noi siamo qui". Questo traguardo non racconta soltanto anni di studio e sacrifici, ma parla anche di tutto ciò che siamo stati capaci di attraversare restando uniti. Per questo non è solo mio, è nostro.