

Význam stanovení alfa-defenzinu (DEFa1) ve výpotku u pacientů s kloubní náhradou

The importance of alpha-defensin (DEFa1) determination in synovial fluid in patients with joint replacement.

VERONIKA MAIEROVÁ

Centrální laboratoře, pracoviště imunologie, Nemocnice České Budějovice, a. s., České Budějovice

SOUHRN

Infekce kloubních náhrad jsou považovány za jednu z nejzávažnějších komplikací v endoprotetice. Diagnóza těchto infekcí je obtížná. V současnosti neexistuje jediný samostatný test, který by byl považován za zlatý standard a byl dostatečně spolehlivý a přesný s odpovídající senzitivitou a specificitou, vyžadována je kombinace více vyšetřovacích postupů. Účelem tohoto článku je posoudit současné poznatky o užitečnosti biomarkerů stanovených v krvi a synoviální tekutině, které by mohly pomoci při diagnostice infekce kloubní náhrady se zaměřením na synoviální alfa-defenzin.

Klíčová slova: alfa-defenzin, infekce kloubní náhrady, synoviální tekutina

SUMMARY

Joint replacement infections are considered to be one of the most serious complications in endoprosthesis. The diagnosis of these infections is challenging. There is no individual gold-standard test that has robust sensitivity and specificity, and a combination of investigations is required. The purpose of this article is to review the current evidence on the utility of blood and synovial fluid biomarkers to help aid in the diagnosis of joint replacement infection with focusing on synovial fluid alpha-defensin.

Key words: alpha-defensin, joint replacement infection, synovial fluid

Úvod

Zavedení totální kloubní náhrady (TEP – total endoprosthesis) je velmi úspěšný a široce přijímaný standard péče v terapii těžkého degenerativního postižení kloubů. Avšak infekce kolem těchto implantátů – periprotetické kloubní infekce (PJI – periprosthetic joint infection) představují závažnou komplikaci těchto zákroků. Diagnostika těchto infekcí může být často složitá. Použití nákladných zobrazovacích technik není pro diagnostiku PJI příliš přínosné. Základním vyšetřením je odběr kloubní tekutiny (synoviální tekutina) – tzv. punktát. Kultivace synoviální tekutiny s pozitivním výsledkem může diagnostikovat PJI, negativní výsledek ji však nevyloučí. Izolace mikroorganismů, které jsou součástí běžné kožní mikroflóry (koaguláza negativní stafylokoky, *Propionibacterium acnes* aj.), může také zkomplikovat rozhodování o přítomnosti infekce. Většina infekcí kloubních náhrad je způsobena gram pozitivními koky, z nichž asi 50–60 % tvoří stafylokoky, přičemž hlavním původcem infekcí je *Staphylococcus aureus*. Z dat Národního registru kloubních náhrad vyplývá, že se ročně v České republice implantuje přibližně 20 000 náhrad kyčle a 16 000 endoprotéz kolene. V současnosti představují tyto revizní operace, jak celosvětově, tak i u nás, až 20 % z celkového počtu implantovaných endoprotéz. Z dostupných laboratorních testů nebyl žádný vyvinut speciálně pro diagnostiku PJI. Vedou se diskuse ohledně optimálních prahových hodnot a vhodné kombinace testů. Současné laboratorní testy využívané v diagnostice PJI s jejich výhodami i potencionálními nedostatky uvádí tab. 1, dále je prezentována souhrnná senzitivita a specificita jednotlivých metod vycházející z hodnot získaných z odborné literatury; viz tab. 2 (1–4).

Defenziny

Defenziny tvoří součást přirozené imunity. Jedná se o peptidy s výraznou antimikrobiální, antifungální i antivirovou aktivitou. Jsou účinné proti gram negativním i gram pozitivním bakteriím včetně mykobakterií, patogenním houbám i virům – obaleným i neobaleným. Defenziny mají také účinek imunomodulační, působí jako chemoatraktanty pro monocyty/makrofágy, neutrofile, dendritické buňky i T lymfocyty. Jejich exprese je regulována prozánětlivými cytokiny IL-6, IL-1 β , TNF- α , přičemž o IL-6, IL-1 β je známo, že se zvyšují v kontextu infekce kloubní náhrady. Nacházejí se v rostlinách, u bezobratlých i obratlovců. Jsou to malé, pozitivně nabitě, amfipatické peptidy o velikosti 4–5 kDa, bohaté na arginin a cystein. Typicky zaujímají konformaci beta listů, která je stabilizována 3 konzervovanými disulfidickými můstky. Na základě struktury a uspořádání disulfidických můstků je můžeme dělit na alfa, beta a théta defenziny (α , β , θ).

Defenziny α (DEFA) jsou nejhojněji exprimovány v polymorfonukleárních leukocytech a ve sliznici intestinálního traktu. V současnosti je u lidí popsáno 6 α -defenzinů, které mohou být děleny na myeloidní (DEFA1–4) a intestinální (DEFA5–6). DEFA1–3, v menší míře DEFA4, jsou hlavními složkami azurofilních granúl neutrofilů, kde tvoří asi polovinu všech přítomných proteinů a jejich koncentrace je odhadována na více než 10 mg/ml. DEFA5 a 6 jsou produkovány specializovanými epiteliálními buňkami sliznice tenkého střeva – Panethovými buňkami, které se nacházejí v Lieberkühnových kryptách a hrají roli v lokální obraně střeva vůči mikrobům.

Defenziny β jsou produkovány všemi epiteliálními buňkami, nejhojněji pak těmi, které jsou v kontaktu s vnějším prostředím, a dále některými leukocyty.

Tab. 1: Výhody a nevýhody jednotlivých laboratorních testů používaných k diagnostice infekce kloubní náhrady (PJI)

Diagnostická metoda	Zkratka	Výhoda	Nevýhoda	Komentář
C – reaktivní protein	CRP	- Pomáhá v předoperační diagnostice - Rychlý a finančně výhodný - Lze stanovit v séru	- Hodnoty CRP bývají zvýšené pooperačně 3–8 týdnů a také v důsledku současné přítomnosti dalších zánětlivých stavů - Při infekci níže virulentními organizmy jsou často hladiny CRP v normě, v séru i synoviální tekutině, a poskytují falešně negativní výsledky - Prahové hodnoty se liší u akutních a chronických infekcí	- Hladiny CRP v synoviální tekutině se zdají být pro diagnostiku PJI přesnější - Není všeobecná shoda ve stanovených prahových hodnotách CRP - Protein produkovaný hepatocyty
Sedimentace erytrocytů	FW	- Rychlý a finančně výhodný - Stanovováno z krve	- Zvýšené hodnoty FW mohou přetrvávat několik týdnů po operaci, někdy i déle, a to v důsledku řady příčin - Variabilita prahových hodnot	
Počet leukocytů	WBC	- Užitečný parametr pro monitorování rozsahu infekce - Rychlý a finančně výhodný	- Zánětlivé stavy, imunosuprese či podání antibiotik může ovlivnit výsledek - Při infekci menšího rozsahu nemá test takovou diagnostickou váhu - Variabilita prahových hodnot	Stanovováno v séru či synoviální tekutině
Procento polymorfonukleárních leukocytů v punktátu	PMN	Rychlý a finančně výhodný	- Zánětlivá arthropatie a podání antibiotik může ovlivnit výsledek - Variabilita prahových hodnot	
Mikrobiologická kultivace		Konečná diagnostická metoda	- Užívání antibiotik může výrazně snížit senzitivitu testu a vést k falešně negativnímu výsledku - Kultivace níže patogenního organismu může vést k diagnostickým rozpakům - Některé druhy potřebují ke své kultivaci speciální živné půdy a inkubační podmínky - V přítomnosti mikrobiálního biofilmu vychází kultivace často falešně negativní - Delší časový odstup výsledků vyšetření (7–14 dní)	- Pozitivní kulturační test předoperačně odebrané synoviální tekutiny je brán za konečné rozhodovací kritérium - Kultivaci kloubní tekutiny či tkáňové suspenze v hemokultivačních lahvičkách je dosaženo vyšší senzitivity, a také zkrácení doby odezvy, identifikace patogenu je možná do 24h
Histopatologické vyšetření periprotetické tkáně		Vyšetření může při splnění kritérií MSIS celkem spolehlivě určit infekci	Výsledek dostupný až pooperačně	
Leukocytární esteráza	LE	- Test poskytuje okamžitý výsledek - Lze snadno měřit pomocí kolorimetrických testacích proužků - Finančně výhodný	- Interpretace výsledku je subjektivní - Kontaminace synoviální tekutiny krví zkresluje výsledek vyšetření, dochází ke zvýšení stupně zabarvení, a to může vést k falešně pozitivní interpretaci testu, je třeba případná centrifugace vzorku	- Přesnost testování není odstředěním ovlivněna - Vzájemně souvisí s PMN - Enzym, hojně se vyskytující v neutrofilech, je uvolňován po jejich rozpadu
Molekulární metody	PCR	- Detekce patogenu i při jeho nízké koncentraci - Rychlé provedení	- Obtížná standardizace a problematická interpretace - Vysoce citlivé metody, kontaminace vzorku synoviální tekutiny může vést k falešně pozitivnímu výsledku	Využití spíše jako doplňkového testu pro diagnostiku PJI
Interleukin-6	IL-6	- Hladiny se vrací k normálu během 2–3 dnů po nekomplikované artroplastice - Lze hodnotit v séru	Variabilita mezních hodnot a nedostatečná konzistence výsledků	IL-6 produkován aktivovanými monocyty/makrofágy aj.
Prokalcitonin	PCT	- Dobrý biomarker systémové infekce - Lze hodnotit v séru	Stanovení hladiny PCT v séru není ideální pro diagnostiku PJI, nízká senzitivita testu je limitující pro klinické využití	Možný diagnostický přínos při stanovení v synoviální tekutině
Molekula CD64	CD64	- Dobrý biomarker systémové infekce - Užitečný biomarker muskuloskeletálních infekcí - Lze hodnotit v séru	Je třeba více studií pro zhodnocení uplatnění tohoto biomarkeru v diagnostice PJI	- Molekula CD64 je exprimována na neutrofilech po jejich aktivaci vlivem bakteriální infekce - S mírou závažnosti infekce vzrůstá množství exprimovaných molekul - CD64 je vysoce afinní receptor pro IgG (FcγRI)

Tab. 2: Přehled souhrnné senzitivity a specifity jednotlivých laboratorních testů používaných v diagnostice infekce kloubní náhrady

Diagnostická metoda	Senzitivita v séru/krvi	Specifita v séru/krvi	Senzitivita v punktátu	Specifita v punktátu
C – reaktivní protein	85 %	78 %	88 %	90 %
Sedimentace erytrocytů	82 %	74 %		
Počet leukocytů	45 %	87 %	88 %	91 %
Procento polymorfonukleárních leukocytů v punktátu			85 %	82 %
Mikrobiologická kultivace			67 %	96 %
Histopatologické vyšetření periprotetické tkáně	nehodnoceno			
Leukocytární esteráza			75 %	91 %
Molekulární metody			59 %	96 %
Interleukin-6	75 %	89 %	76 %	92 %
Prokalcitonin	44 %	96 %	87 %	94 %
Molekula CD64	70 %	62 %		

Defenziny θ byly popsány pouze u opic. U lidí k jejich produkci nedochází. Nicméně lidské θ defenziny byly vyrobeny synteticky *in vitro* a pojmenovány retrocykliny. Mají výraznou antivirovou aktivitu, úspěšně zabraňují vstupu virových částic do hostitelské buňky a chrání tak buňky před infekcí např. virem HIV-1.

Defenziny mohou být sekretovány a přítomny v cirkulaci, kde při styku s extracelulárními bakteriemi tvoří shluky či jakési koberečkové pásy, které mikroba obklopí a zničí, nebo v případě fagocytózy jsou uvolňovány z granulozomů do fagolysosomu, kde uvnitř těchto útvarů dochází k lýze a usmrcení patogenu.

Defenziny působí přímým destrukčním účinkem na bakteriální membránu. Amfipatická struktura a pozitivní náboj jim umožňují adsorpci k buněčné stěně bakterií, jejichž cytoplazmatické membrány obsahují mnoho aniontových molekul, díky nimž mají negativní náboj. Následně dochází k internalizaci defenzinů do fosfolipidové membrány a tvorbě porů ústící v lýzu bakteriální buňky. Savčí buňky jsou proti působení defenzinů přirozeně chráněny díky neutrálnímu náboji fosfolipidových membrán a přítomnosti cholesterolu. Navíc mají defenziny v antimikrobicidních koncentracích nízkou úroveň cytotoxicity pro normální buňky. Problém nastává, pokud bakterie vytvoří biofilm, který je pozitivně nabitý, a tedy téměř neproniknutelný pro kladně nabitě defenzinové peptidy. Patogeny, které kolonizují místa, kde mohou být defenziny přítomny ve vysokých koncentracích, si vyvinuly unikové mechanismy, které je chrání před jejich antibakteriálními účinky. Gram pozitivní bakterie (např. *Staphylococcus aureus*)

mohou modifikovat svoji membránu tak, aby se snížil její negativní náboj a tím poklesla atraktivita bakterie pro pozitivně nabitě defenziny (5).

Diagnostika infekce kloubní náhrady

V roce 2011 byla standardizována kritéria diagnostiky infekce TEP Myoskeletální společností pro infekci (MSIS – Musculoskeletal Infection Society), která pak byla mírně upravena v roce 2013 mezinárodní konsenzuální skupinou. Tato upravená kritéria jsou v současnosti celosvětově přijímána. Na základě těchto doporučení by měla být diagnostikována infekce kloubní náhrady, pokud je splněno jedno ze dvou „hlavních kritérií“ nebo tři z pěti „malých kritérií“ (viz tab. 3).

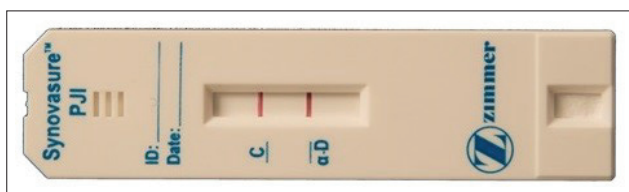
V roce 2018 byla uveřejněna nová doporučení, zahrnující novější diagnostické biomarkery, které je vhodné použít jako pomocné při nejasné diagnostice PJI, mimo jiné také stanovení alfa-defenzinu v kloubním výpotku. Tato doporučení byla akceptována také Českou společností pro ortopedii a traumatologii pohybového ústrojí (ČSOT).

Synoviální alfa-defenzin a jeho využití v diagnostice infekce kloubní náhrady

V diagnostice kloubních infekcí se neuplatňuje jen jeden hodnotící parametr, ale je třeba jich posuzovat více. Správná diagnóza pacientů s infekcí vyžaduje test s vysokou senzitivitou i specifitou. Na scénu přichází nový slibný synoviální biomarker – alfa-defenzin. Jak již bylo řečeno

Tab. 3: Doporučení pro diagnostiku infekce kloubní náhrady dle aktualizovaných kritérií Myoskeletální společnosti pro infekci (MSIS)

MSIS kritéria diagnostiky infekce TEP			
1 hlavní kritérium	Přítomnost píštěle komunikující s endoprotézou		
	Izolace patogenu alespoň ze 2 tkáňových vzorků či punktátů získaných z okolí postižené kloubní náhrady		
Min. 3 menší kritéria		Akutní PJI (<90 dní)	Chronická PJI (>90 dní)
	Elevace C-reaktivního proteinu (CRP) a sedimentace erytrocytů (FW) v séru	FW práh neurčen	FW >30 mm/h
		CRP >100 mg/l	CRP >10 mg/l
	Elevace leukocytů (WBC) nebo leukocyt esterázový test (LE) v punktátu	10 000 buněk/μl	3 000 buněk/μl
		+ nebo ++	+ nebo ++
	Elevace polymorfonukleárních leukocytů v punktátu (PMN)	90 %	80 %
	Histopatologické vyšetření periprotetické tkáně	>5 neutrofilů na zorné pole v 5 zorných polích zjištěných při zvětšení 400×	
	Izolace patogenu v jedné kultivaci z periprotetické tkáně či z punktátu		



Obr. 1: Pozitivní alfa-defenzin lateral flow test

výše, jedná se o malý kationický antimikrobiální peptid uvolňovaný aktivovanými neutrofilními granulocyty v reakci na infekci, který působí jako přirozené antibiotikum a dokáže patogeny zničit díky schopnosti permeabilizovat jejich membrány.

Bylo prokázáno, že alfa-defenzin poskytuje konzistentní výsledky bez ohledu na zánětlivou lokalizaci, typ i virulenci infekčního organismu (6). Nicméně se ukazuje, že v případě infekce kloubní náhrady ramene má test nižší senzitivitu, než je uváděno v předchozích studiích u dolních končetin (4, 7). Alfa-defenzin má své limity v hodnocení low-grade infekcí (8, 9, 10). Početné studie dále uvádějí, že hladina alfa-defenzinu není ovlivněna předchozím podáváním antibiotik ani probíhajícím systémovým zánětlivým onemocněním (11, 12). Stanovení není ovlivněno kontaminací vzorku krve.

Možnosti stanovení synoviálního alfa-defenzinu

Alfa-defenzin test je první specificky navržený a validovaný jako doplňkový pro detekci infekce kloubní náhrady v synoviální tekutině pacientů zvažovaných pro revizní chirurgii. Testem je měřena koncentrace alfa-defenzinu 1-3 u pacientů s totální kloubní náhradou a výše její hladiny je odrazem přítomné infekce. Test není určen ke stanovení specifického typu infekce či jejího původu, rozsahu a závažnosti. V současnosti jsou k dispozici dvě komerčně dostupné metody pro měření alfa-defenzinu v synoviální tekutině, jedná se o laboratorní imunotest (ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a rychlý test laterálního průtoku konstruovaný jako rapid test pro přímé použití lékaři na operačním sále, Synovasure® Alpha Defensin ELISA test a Alpha Defensin Lateral Flow Test (Zimmer Biomet).

Synovasure® Alpha Defensin ELISA Test využívá schopnosti protilátek rozpoznávat a vázat se na specifické antigeny (v tomto případě alfa-defenzin), dochází k vazbě značené protilátky a následnému stanovení koncentrace analytu ve vzorku. Stabilita alfa-defenzinu v synoviální tekutině je dle výrobce nejméně 48 hodin. Výrobce zkombinoval

v tomto testu vyšetření alfa-defenzinu s vyšetřením synoviálního CRP, což zvýšilo jeho specificitu. V současnosti není ELISA test v ČR dostupný. Kromě USA je v EU nabízen partnerskými laboratořemi pouze v Německu a ve Spojeném království. Tento test je patentovaný firmou Synovasure®.

Synovasure® Alpha Defensin Lateral Flow Test je založen na imunochromatografické technice podélného toku reagentii proužkem porézní membrány. Testovací set zahrnuje kazetu pro jednorázové použití a vše potřebné pro provedení testu. Výsledky lze odečíst za 10 minut. Tento test poskytuje lékaři pozitivní nebo negativní výsledek. Jedná se o test kvalitativní. Obrázek pozitivního testu – viz obr. 1. Tento test je dostupný v mnoha zemích po celém světě včetně ČR. V roce 2019 schválila FDA (US Food and Drug Administration) uvedení tohoto diagnostického testu na trh jako pomůcku pro detekci periprotetické kloubní infekce.

Charakteristika souboru, metodika a výsledky

Celkově bylo hodnoceno 84 pacientů, infekce bakteriální etiologie byla diagnostikována v 28 případech. Nejčastějšími patogeny byly *Staphylococcus aureus* ve 13 případech a koaguláza negativní stafylokoky v 8 případech. V případě falešné negativity se v 6 případech jednalo o infekci způsobenou nízkou virulentními bakteriemi kožní či slizniční mikroflóry. V případě falešné positivity se jednalo v 1 případě o dnovou artritidu kolenního kloubu.

Ve studii byly analyzovány punktáty různé etiologie, získané při zánětlivých postiženích pohybového aparátu. Vzorky byly odebrány do sterilní polypropylenové zkumavky bez příměsí a dodány do laboratoře při pokojové teplotě během 2 hodin po odběru. Vzorky byly následně centrifugovány při 3 706 rpm po dobu 5 min (Centrifuga 5804, Eppendorf, Hamburg, Germany), aby došlo k oddělení veškerých částic a buněčného materiálu. Získaný supernatant byl stažen a uskladněn při –20 °C do doby testování.

Vyšetření alfa-defenzinu získaného ze synoviální tekutiny bylo provedeno za použití testu od firmy Cloud-CloneCorp. (DefensinAlpha 1, Neutrophil (DEFa1), Cloud-CloneCorp.). Jedná se o standardní ELISA test určený pro testování přítomnosti DEFa1 v supernatantu získaného z buněčné kultury či jiné biologické tekutiny. Kvůli chybějícím údajům o cut-off hodnotě tohoto testu při měření DEFa1 v kloubním výpotku byla ve spolupráci s ortopedickým oddělením Nemocnice

Tab. 4: Přehled dat získaných ve studii vycházející z MSIS kritérií a ELISA testu pro alfa-defenzin 1 (DEFa1)

	počet	M/Ž	průměrný věk	koleno (TEP)	kyčel (TEP)	rameno	tíhový váček lokte	absces lýtky
počet pacientů	84	38/46	70 (38–89)	54 (32)	24 (23)	2	3	1
aseptická dg.	56							
septická dg.	28	15/13	70 (39–88)	15 (11)	8 (7)	2	2	1
pozitivní	13			6 (5)	4 (4)	2	0	1
falešně neg.	15			9 (6)	4 (3)	0	2	0
falešně poz.	3			1	2 (2)	0	0	0

V závorkách uveden stav po totální kloubní endoprotéze (TEP).

České Budějovice, a. s., stanovena optimální hodnota cut-off 1 500 µg/l. Tato hodnota se ukázala jako nejlépe vyhovující při rozhodování mezi infekční a neinfekční etiologií výpotku. Při této mezní hodnotě byla dosažená senzitivita vyšetření 50 % a specifická 95 %. Pro samotnou analýzu je vyžadováno 10 µl vzorku. Data z provedené studie, založené na vyhodnocení údajů získaných ELISA testem pro alfa-defenzin a vycházející z kritérií MSIS při rozhodování o přítomnosti infekce bakteriální etiologie, uvádí tab. 4.

Diskuze

Do současné doby bylo provedeno několik studií srovnávajících ELISA test a Lateral flow test pro stanovení alfa-defenzinu. Analýza 11 studií, kterou provedli Marson a kol., prokázala vynikající souhrnnou senzitivitu 95 % a specifickou 97 % ELISA testu při semikvantitativní cut-off hodnotě 5,2 mg/l a lateral flow testu 85 % a 90 % (13). V systematické diagnostické studii Eriksson a kol. prokázali, že laboratorní imunotest má vyšší celkovou diagnostickou přesnost ve srovnání s laterálním průtokovým testem (98 % vs. 75 %), dosáhl také vyšších hodnot sensitivity (96 % vs. 71 %), přičemž specifická byla obdobná (96 % vs. 90 %) (14). Metaanalýza 10 studií Suen a kol. uvádějí vyšší souhrnnou senzitivitu (91 % vs. 77 %) a specifickou (97 % vs. 95 %) testu enzymové imunoanalýzy oproti testu laterálního průtoku (15). Podobně metaanalýza 42 studií Ahmada a kol. uvádí souhrnnou senzitivitu (97 % vs. 80 %) a specifickou (97 % vs. 89 %) ELISA testu jako vyšší ve srovnání s testem laterálního průtoku (2). Prospektivní studie Kleisse a kol. hodnotila diagnostickou přesnost ELISA testu při klinickém zhodnocení bolestivé artroplastiky kolene a kyčle s podezřením na periprotetickou kloubní infekci. Výsledná senzitivita 78 % a specifická 97 % testu ukazují, že v předoperačním zhodnocení symptomatické artroplastiky je tento test k přesné diagnostice PJI nedostatečný. Zvláště v případě nízké virulentních organismů, jako jsou koaguláza negativní stafylokoky, vycházel test falešně negativní (8). Také další nedávná studie ukazuje, že senzitivita ELISA testu (81 %) je nižší, než bylo uváděno v raných studiích publikovaných po uvedení tohoto testu na trh (10).

Doposud existuje pouze několik studií zabývajících se stanovením hladiny alfa-defenzinu u infekce náhrady ramenního kloubu. V této oblasti je dosahováno nižší sensitivity 63 %, 75 % (7, 4), než je tomu v případě kolen a kyčlí 78 %, 81 % (8, 10), což pravděpodobně souvisí s častějším indolentním charakterem infekcí, dosažené hodnoty specifické jsou obdobné 95 %, 96 % (7, 4) vs. 96 %, 97 % (10, 8). Při hodnocení přetrvávající kloubní infekce před reimplantačním chirurgickým zákrokem ukázal test pro alfa-defenzin vysokou specifickou 98 %, avšak poměrně nízkou senzitivitu 71 %. V této problematice tak má pouze omezené uplatnění (16).

Zdá se, že ELISA test má vyšší diagnostický přínos než lateral flow test díky vyšší senzitivě i specifitě a pomáhá lépe rozlišit mezi infekcí a aseptickým uvolněním TEP před revizní operací. Lateral flow test díky relativně vysoké specifitě v kombinaci s výhodou krátké doby odezvy může významně přispět k vyloučení možné PJI již během operačního výkonu. ELISA test

vyžaduje, aby byly vzorky dodány do laboratoře, čímž se prodlouží doba odezvy. Naproti tomu test laterálního průtoku může být proveden jako test point-of-care, velice přitom záleží na správném provedení, tedy na uživateli, a můžeme proto získávat výsledky, které nejsou tak přesné jako exaktní laboratorní metoda.

Při akutním vzplanutí zánětlivé artritidy vzrůstá v synoviální tekutině hladina alfa-defenzinu (17), to samé nastává v kontextu krystaly indukovaných artropatií (17, 18) či nepříznivé lokální tkáňové reakce (ALTR – adverse local tissue reaction) neboli metalózy, charakterizované zánětem periprotetické měkké tkáně (10, 19). Okroj a kol. provedli vyšetření alfa-defenzinu u skupiny pacientů s ALTR a uvedli, že 31 % těchto případů mělo falešně pozitivní test na alfa-defenzin (20). Deirmengian a kol. prokázali, že stanovení synoviálního CRP nebylo přítomností metalózy ovlivněno (11).

V přítomnosti píštěle komunikující s endoprotézou dosahuje hladina alfa-defenzinu v synoviální tekutině nižších hodnot, dochází přitom k odtoku synoviální tekutiny i s leukocyty (neutrofily) a jejich produkty. Podobně je tomu při infekci způsobené organismy s nízkou virulencí, která nevyvolá adekvátní vzestup hladiny alfa-defenzinu. Autoři těchto pozorování navrhuji, aby v přítomnosti píštěle nebo při kultivaci nízké virulentních organismů byla snížena hodnota cut-off alfa-defenzinu (8, 9, 10).

Studie provedená na souboru pacientů se zánětlivým postižením pohybového aparátu měla za cíl zhodnotit přínos vyšetření alfa-defenzinu v diagnostice PJI. Jelikož komerční Synovasure® Alpha Defensin ELISA test není v ČR dostupný, byl pro stanovení alfa-defenzinu použit ELISA test od firmy Cloud-CloneCorp. První z uvedených testů měří koncentraci DEFA1-3, test použitý ve studii stanovuje koncentraci DEFA1.

Tímto testem bylo možné správně určit pacienty s PJI, pokud příčinou byly infekční organismy s dostatečnou patogenitou (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*). V přítomnosti nízké virulentních agens vycházel test falešně negativní, v přítomnosti dnové artritidy falešně pozitivní. Nebylo prokázáno, že by užívání antibiotik v době odběru punktátu nějakým způsobem ovlivnilo hladinu alfa-defenzinu. Testem bylo dosaženo 50 % sensitivity a 95 % specifické.

Závěr

U pacientů, u nichž je diagnóza infekce kloubní náhrady nejasná kvůli nedávnému užití antibiotik, neurčitým laboratorním nálezům nebo podezření na falešně negativní či falešně pozitivní kultivaci, může stanovení alfa-defenzinu v synoviální tekutině poskytnout další údaj, který dokáže pomoci klinickému lékaři v rozhodnutí, zda je infekce přítomna. Hodnoty alfa-defenzinu dobře korelují s MSIS klasifikací infekce kloubní náhrady a je všeobecná shoda na jeho zařazení do diagnostického schématu jako doplňkového testu. Alfa-defenzin ukázal slibné výsledky při stanovení diagnózy akutní infekce kloubní náhrady, avšak v případě vyloučení přetrvávající infekce se ukázal nedostatečně průkazným. Nicméně, ani podle MSIS kritérií nebylo možné v tomto případě jednoznačně rozhodnout. Hladina alfa-defenzinu není ovlivněna předchozím podáváním antibiotik.

Opatrnosti je třeba u infekcí způsobených níže virulentními organismy, kdy často nedochází k výraznému vzestupu hodnot tohoto biomarkeru. Ve srovnání s ostatními standardně prováděnými laboratorními testy v krvi či synoviální tekutině se alfa-defenzin ukazuje jako nejvhodnější doplňkový test pro diagnostiku kloubní infekce.

Prohlášení o střetu zájmů

Autor práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

LITERATURA

- Han X, Xie K, Jiang X, et al. Synovial fluid α -defensin in the diagnosis of periprosthetic joint infection: the lateral flow test is an effective intraoperative detection method. *J Orthop Surg Res* 2019; 14: 274.
- Ahmad SS, Hirschmann MT, Becker R, et al. A meta-analysis of synovial biomarkers in periprosthetic joint infection: Synovasure™ is less effective than the ELISA-based alpha-defensin test. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2018; 26: 3039-3047.
- Vaishya R, Sardana R, Butta H, et al. Laboratory diagnosis of Prosthetic Joint Infections: Current concepts and present status. *J Clin Orthop Trauma* 2019; 10: 560-565.
- Unter Ecker N, Koniker A, Gehrke T, et al. What Is the Diagnostic Accuracy of Alpha-Defensin and Leukocyte Esterase Test in Periprosthetic Shoulder Infection? *Clin Orthop Relat Res* 2019; 477: 1712-1718.
- Dong H, Lv Y, Zhao D, et al. Defensins: The Case for Their Use against Mycobacterial Infections. *J Immunol Res* 2016; 2016: 1-9.
- Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, et al. The Alpha-defensin Test for Periprosthetic Joint Infection Responds to a Wide Spectrum of Organisms. *Clin Orthop Relat Res* 2015; 473: 2229-2235.
- Frangiamore SJ, Saleh A, Grosso MJ, et al. α -Defensin as a predictor of periprosthetic shoulder infection. *J Shoulder Elbow Surg* 2015; 24: 1021-1027.
- Kleiss S, Jandl NM, Novo de Oliveira A, et al. Diagnostic accuracy of alpha-defensin enzyme-linked immunosorbent assay in the clinical evaluation of painful hip and knee arthroplasty with possible prosthetic joint infection: a prospective study of 202 cases. *Bone Joint J* 2019; 101-B: 970-977.
- Adams JR, Schwartz AJ. False-negative synovial alpha-defensin. *Arthroplast Today* 2017; 3: 239-241.
- Stone WZ, Gray CF, Parvataneni HK, et al. Clinical Evaluation of Synovial Alpha Defensin and Synovial C-Reactive Protein in the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. *J Bone Joint Surg Am* 2018; 100: 1184-1190.
- Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, et al. Combined measurement of synovial fluid α -Defensin and C-reactive protein levels: highly accurate for diagnosing periprosthetic joint infection. *J Bone Joint Surg Am* 2014; 96: 1439-1445.
- Shahi A, Parvizi J, Kazarian GS, et al. The Alpha-defensin Test for Periprosthetic Joint Infections Is Not Affected by Prior Antibiotic Administration. *Clin Orthop Relat Res* 2016; 474: 1610-1615.
- Marson BA, Deshmukh SR, Grindlay DJC, et al. Alpha-defensin and the Synovasure lateral flow device for the diagnosis of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *Bone Joint J* 2018; 100-B: 703-711.
- Eriksson HK, Nordström J, Gabrysch K, et al. Does the Alpha-defensin Immunoassay or the Lateral Flow Test Have Better Diagnostic Value for Periprosthetic Joint Infection? A Meta-analysis. *Clin Orthop Relat Res* 2018; 476: 1065-1072.
- Suen K, Keeka M, Ailabouni R, et al. Synovasure (quick test) is not as accurate as the laboratory-based α -defensin immunoassay: a systematic review and meta-analysis. *Bone Joint J* 2018; 100-B: 66-72.
- Stone WZ, Gray CF, Parvataneni HK, et al. Clinical Evaluation of Alpha Defensin Test Following Staged Treatment of Prosthetic Joint Infections. *J Arthroplasty* 2019; 34: 1446-1451.
- Partridge DG, Gordon A, Townsend R. False-positive synovial fluid alpha-defensin test in a patient with acute gout affecting a prosthetic knee. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 2017; 27: 549-551.
- Plate A, Stadler L, Sutter R, et al. Inflammatory disorders mimicking periprosthetic joint infections may result in false-positive α -defensin. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24: 1212.
- Bonanzinga T, Zahar A, Dütsch M, et al. How Reliable Is the Alpha-defensin Immunoassay Test for Diagnosing Periprosthetic Joint Infection? A Prospective Study. *Clin Orthop Relat Res* 2017; 475: 408-415.
- Okroj KT, Calkins TE, Kayupov E, et al. The Alpha-Defensin Test for Diagnosing Periprosthetic Joint Infection in the Setting of an Adverse Local Tissue Reaction Secondary to a Failed Metal-on-Metal Bearing or Corrosion at the Head-Neck Junction. *J Arthroplasty* 2018; 33: 1896-1898.

Mgr. Veronika Maierová

Centrální laboratoře, pracoviště imunologie

Nemocnice České Budějovice, a.s.

B. Němcové 585/54

370 01 České Budějovice

e-mail: maierova.veronika@nemcb.cz

Obdrženo: 31. 01. 2020

Revidováno: 02. 03. 2020

Přijato k tisku: 17. 03. 2020