



CAT voorstelling:

Nieuwe biomerkers in de
diagnostiek van
periprothetische infecties

SIEN OMBELET

PROMOTOR: PROF. DR. JAN VERHAEGEN

Clinical diagnostic scenario

- ▶ Infectie van een gewrichtsprothese komt voor bij 0,5-2% van alle geplaatste protheses (knie > heup > schouder).
- ▶ Toenemende incidentie omwille van toenemend aantal implantaten (veroudering, obesitas...)
- ▶ Drie types:
 - ▶ Early onset infection
 - ▶ Delayed onset infection
 - ▶ Late onset infection



Clinical diagnostic scenario

- ▶ Diagnose: geen gouden standaard!
- ▶ Cultuur? Doch sensitiviteit 39-95%, afhankelijk van chroniciteit en antibioticagebruik
- ▶ IDSA en MSIS definities

IDSA definitie

- ▶ Sinustraject in communicatie met de prothese
- ▶ Acute ontsteking zichtbaar bij histopathologisch onderzoek
- ▶ Purulentie rond de prothese.
- ▶ Twee of meer culturen (van gewrichtsvocht en/of weefselbiopsie) die hetzelfde micro-organisme tonen.
- ▶ De aanwezigheid van een periprothetische infectie is niet uitgesloten indien de hierboven vermelde criteria niet vervuld zijn

MSIS definitie

- ▶ Sinustraject in communicatie met de prothese
- ▶ Twee of meer culturen die hetzelfde micro-organisme tonen
- ▶ Aanwezigheid van minstens drie van de volgende criteria:
 - ▶ Gestegen ESR (>30 mm/uur) EN CRP (>10 mg/L)
 - ▶ Gestegen synoviale witte bloedcel telling (> 3000/ μ l) (*OF ++ lezing op leukocyt esterase test*)
 - ▶ Gestegen synoviaal percentage neutrofielen (PMN%) (>80%),
 - ▶ Isolatie van een micro-organisme in een enkele cultuur
 - ▶ Positief histopathologisch onderzoek van periprothetisch weefsel

Voor- en nadelen van deze definities

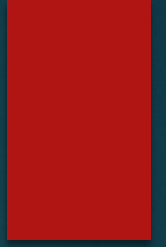
- ▶ Voordeel:

- ▶ Bruikbaar in klinische besluitvorming
- ▶ Uniforme diagnose: noodzakelijk om bv studies onderling te vergelijken

- ▶ Nadeel:

- ▶ Expert consensus
- ▶ Infectie niet uitgesloten indien niet aan criteria is voldaan → geen gouden standaard!
- ▶ Vrij omslachtig om tot diagnose te komen
- ▶ Niet alle onderzoeken overal beschikbaar (bv pathologie)
- ▶ Sommige onderzoeken (bv cultuur) nemen veel tijd in beslag: laattijdige diagnose!

Perfekte biomarker?



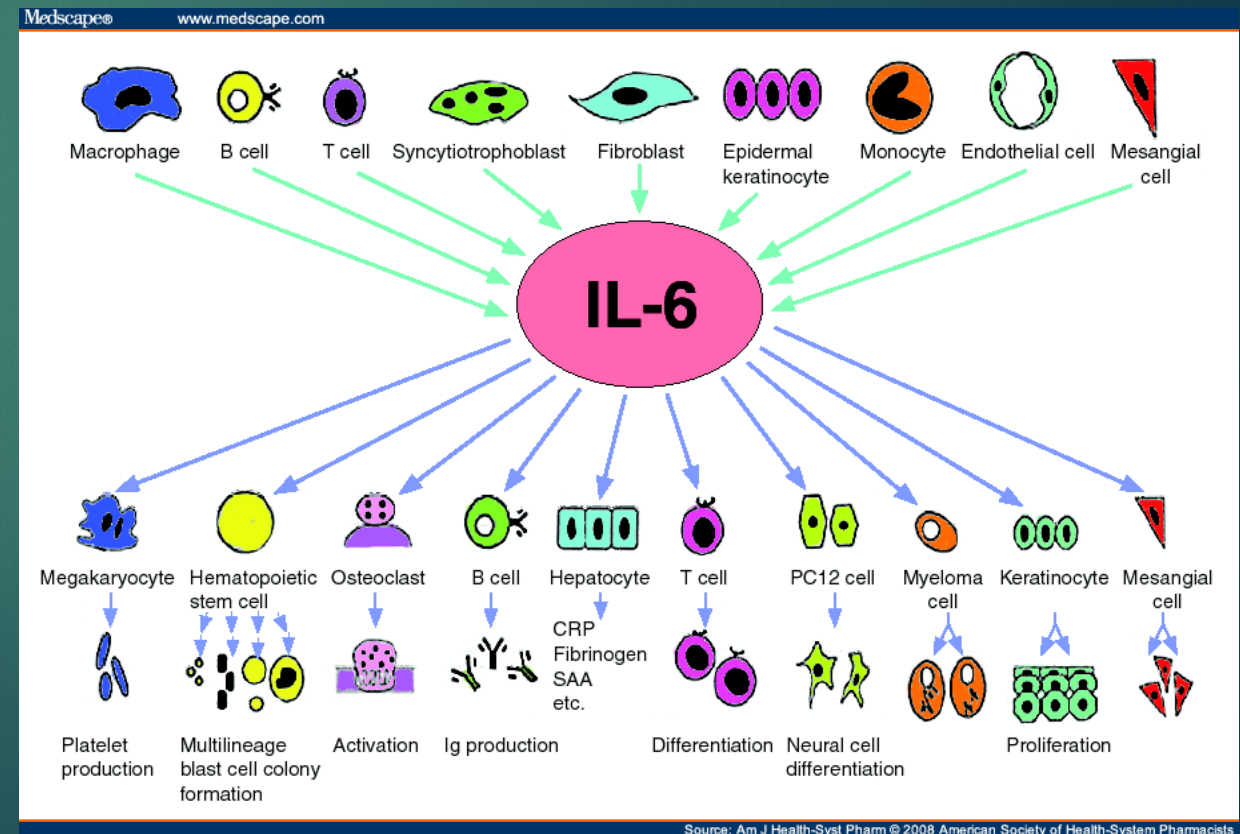
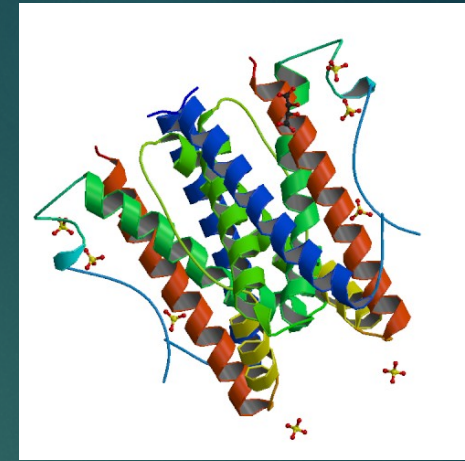
- ▶ Snel resultaat
- ▶ Niet invasief (serum)
- ▶ Zeer sensitief en specifiek
- ▶ (identificatie causaal micro-organisme)

Potentieel interessante biomerkers

- ▶ Interleukine-6
- ▶ Leukocyt esterase in synoviaal vocht
- ▶ Alfa-defensines in synoviaal vocht
- ▶ Nieuw serologisch assay: BJI Inoplex

Interleukine-6

- Wordt geproduceerd door monocyten, macrofagen, fibroblasten en T2 lymfocyten bij weefselschade
- Stimuleert aanmaak van acute fase proteïnen in de lever
- Immuunmodulatie

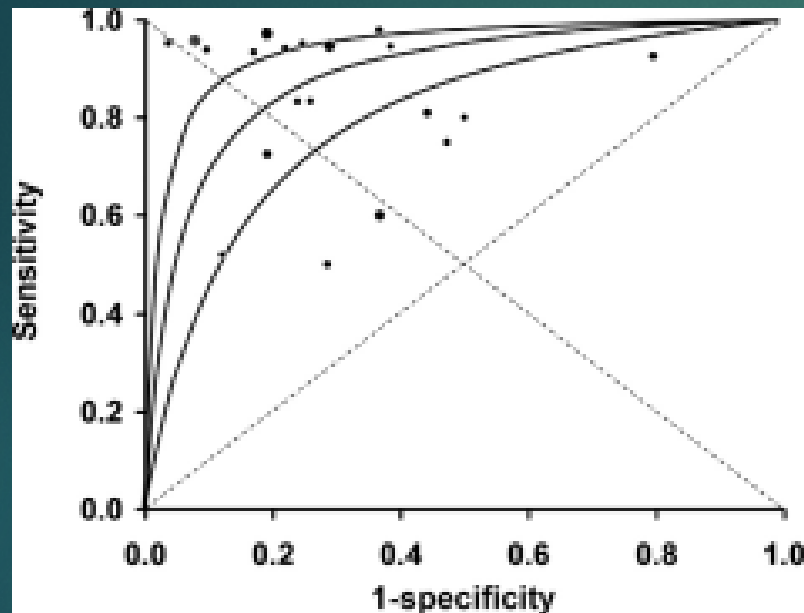


Interleukine-6 in serum als inflammatoire merker

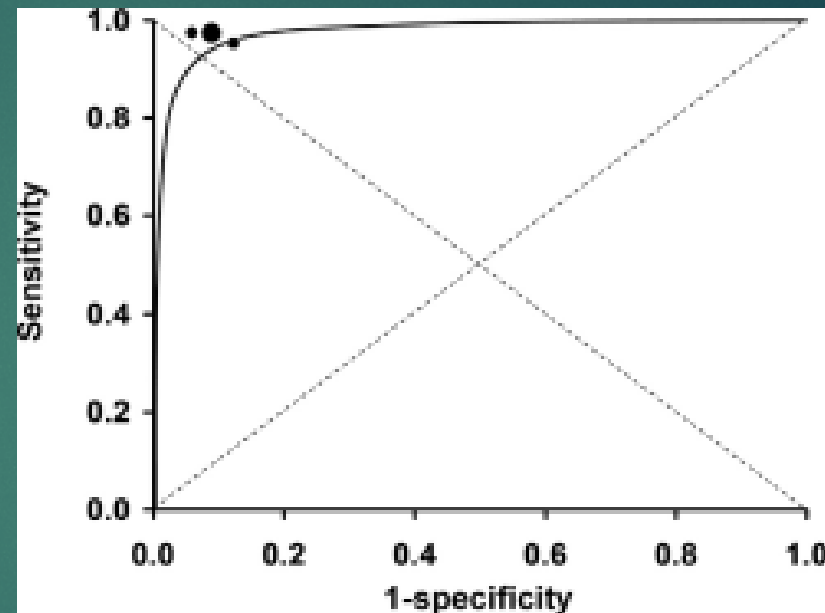
- ▶ Werd reeds onderzocht in kader van sepsis, chirurgie, neonatale infectie
- ▶ Wirtz *et al* publiceren in 2000 dat IL-6 na implantatie orthopedische prothese post-operatief snel weer op normale waarden zit, in tegenstelling tot CRP; suggereert nut als inflammatoire merker¹
- ▶ Meta-analyse van verschillende inflammatoire merkers van 2010 vermeldt IL-6 als zeer veelbelovende merker, met diagnostische OR van 314.7, tov 13.1 voor CRP²

1. Wirtz *et al*, *Int Orthop* 2000
2. Berbari *et al*, *J Bone Joint Surg Am* 2010

Interleukine-6



Summary ROC curve CRP



Summary ROC curve IL-6

Interleukine-6

- ▶ Uitstekende resultaten, doch slechts gebaseerd op beperkt aantal studies
- ▶ Latere studies: uiteenlopende resultaten!
- ▶ Meestal goede specificiteit doch sensitiviteit varieert
- ▶ Zeer lage sensitiviteit voor schouderprotheses
- ▶ Ook gestegen bij inflammatoire gewrichtsaandoeningen, ziekte van Paget, HIV, ...

Interleukine-6 in serum

	Cut-off (pg/ml)	Aantal patiënten	Sensitiviteit	Specificiteit	PPV	NPV	gewrichten
Di Cesare et al, 2005	10	58	100%	95%	89%	100%	Heup/knie
Bottner et al, 2007	12	78	95%	87%	74%	98%	Heup/knie
Buttaro et al, 2010	10	69	36%	94%	57%	88%	Heup
Elgeidi et al, 2014	10.4	40	100%	90.9%	79%	100%	Heup/knie
Glehr et al, 2013	2.6	84	92%	53%	78%	79%	Heup/knie
Randau et al, 2014	2.6	120	79.5%	58.3%	55.9%	80.8%	Heup/knie
Grosso et al, 2014	5	69	12%	93%	50%	67%	Schouder
Villacis et al, 2014	10	34	14%	95%	67%	61%	Schouder

Uitsluiten persisterende infectie in two-stage revision

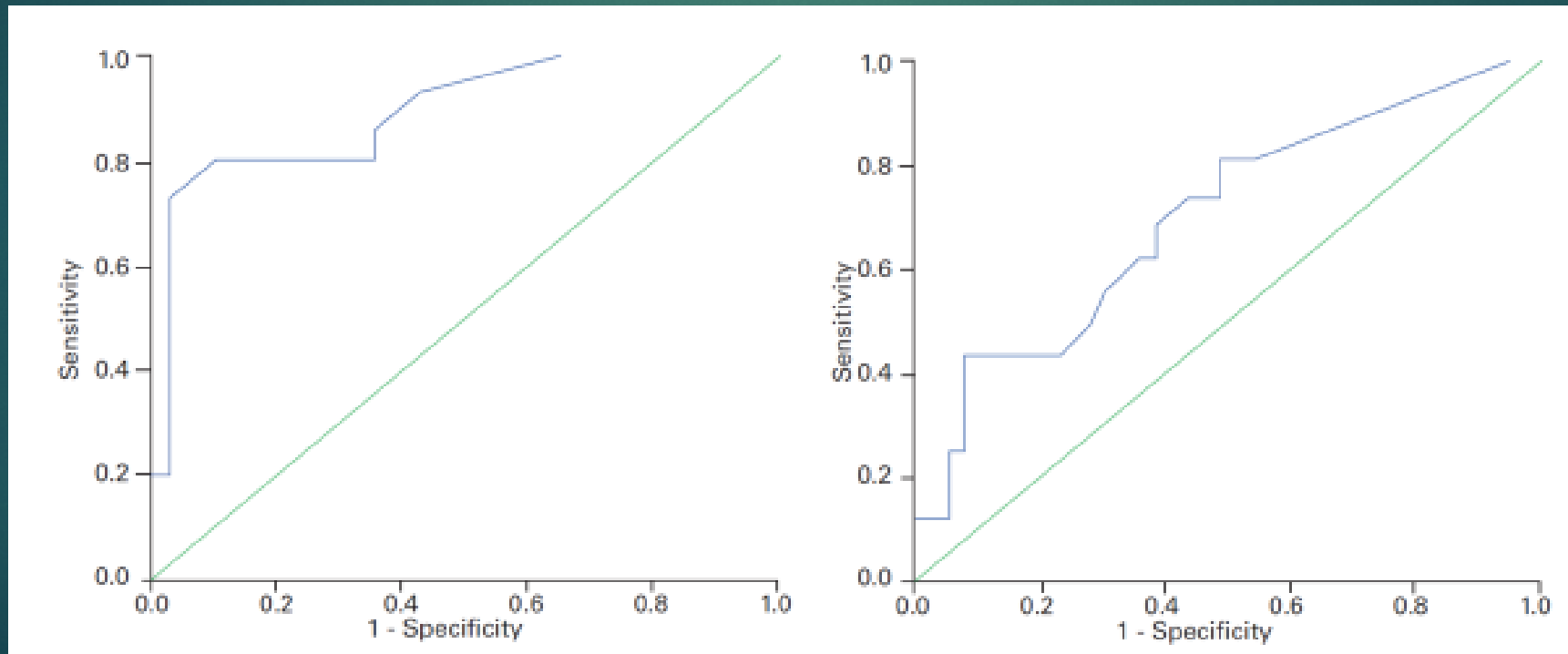
- ▶ Two-stage revision:
 - ▶ Eerste fase: prothese verwijderen, cement spacer plaatsen.
 - ▶ Interimperiode van 6 weken antibioticatherapie, 1 week antibioticavrij interval.
 - ▶ Tweede fase: nieuwe prothese plaatsen
- ▶ Persisterende infectie in gewricht na verwijderen prothese: frequent!
- ▶ Mortazavi *et al* en Kuzuma *et al* vonden geen toegevoegde waarde van CRP of ESR in de diagnostiek van persisterende infectie^{1,2}

1. Mortazavi et al. Clin Orthop Relat Res 2011

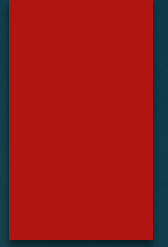
2. Kusuma et al. Clin Orthop Relat Res 2011

Interleukine-6 ter uitsluiting persisterende infectie?

- ▶ Hoell et al vonden bij cut-off van > 13 pg/ml een PPV van 90,9%, en bij cut-off van < 8 pg/ml een NPV van 92,1%



Interleukine-6 bepaling



- ▶ ELISA
- ▶ Geautomatiseerd assay beschikbaar op Cobas (Roche) en Immulite 2000 (Siemens)
- ▶ Voornamelijk in studieverband; nog niet in routine in België
- ▶ Prijs? Geen RIZIV nomenclatuur

Interleukine-6 in synoviaal vocht

- ▶ Lokale productie van interleukine-6 in geïnfecteerde gewricht: sensitiever + specifiek?
- ▶ Goede resultaten in verschillende studies
- ▶ In één studie ook hoopvolle resultaten voor schouderprotheses

Interleukine-6 in synoviaal vocht

	Cut-off (pg/ml)	Aantal patiënten	Sensitiviteit	Specificiteit	PPV	NPV	gewrichten
Nilsdotter-Augustinsson et al, 2007	10000	85	69%	93%	75%	91%	Heup
Deirmengian et al, 2010	13350	51	100%	100%	100%	100%	Heup/knie
Jacovides et al, 2011	4270	74	87.1%	100%	100%	91.5%	Heup/knie
Randau et al, 2014	2100	120	59.4%	85.7%	74.4%	76.5%	Heup/knie
Lenski et al, 2014	30750	69	90%	94.7%	93.3%	92.3%	?
Deirmengian et al, 2014	2300	95	89%	97%	93%	93%	Heup/knie
Frangiamore et al, 2015	359.3	32	87%	90%	87%	90%	Schouder

Interleukine-6 in synoviaal vocht

► Nadelen:

- Indien pre-operatief geen vocht verkregen, laattijdige diagnose
- Verschillende cut-offs in verschillende studies
- Assays niet gevalideerd/bedoeld voor gebruik op synoviaal vocht
- Beter dan WBC telling in synoviaal vocht? CRP in synoviaal vocht?

Leukocyt esterase test

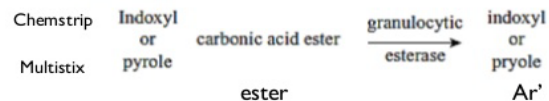
- ▶ Enzyme gesecreteerd door neutrofielen die naar plaats van infectie worden gerecruteerd
- ▶ Wordt gebruikt in urine dipsticks voor aantonen van infectie
- ▶ Esterase katalyseert chemische reactie, waarbij paarse kleur ontstaat

Leukocyte esterase : Reagent strips

▶ Principle : Ester hydrolysis + azo coupling reaction

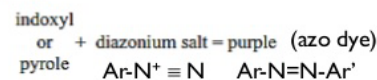
Ester hydrolysis

Reaction A:



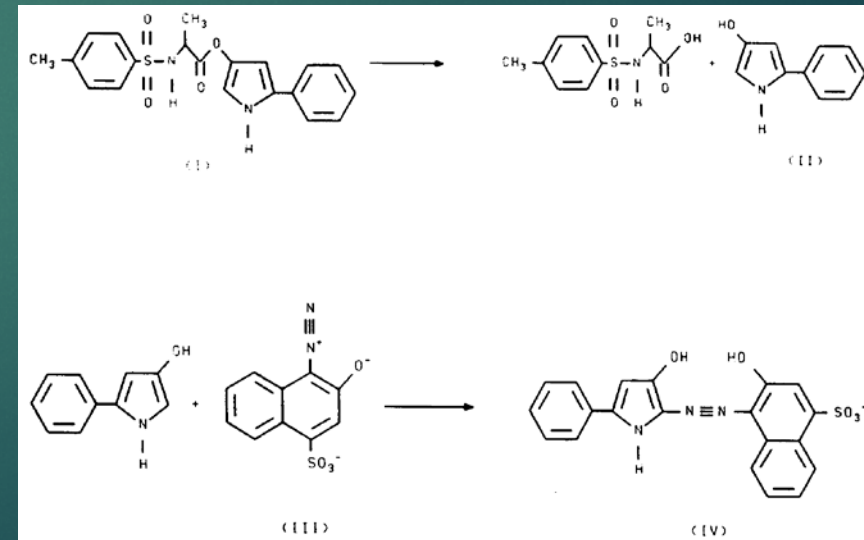
Azo-coupling

Reaction B:



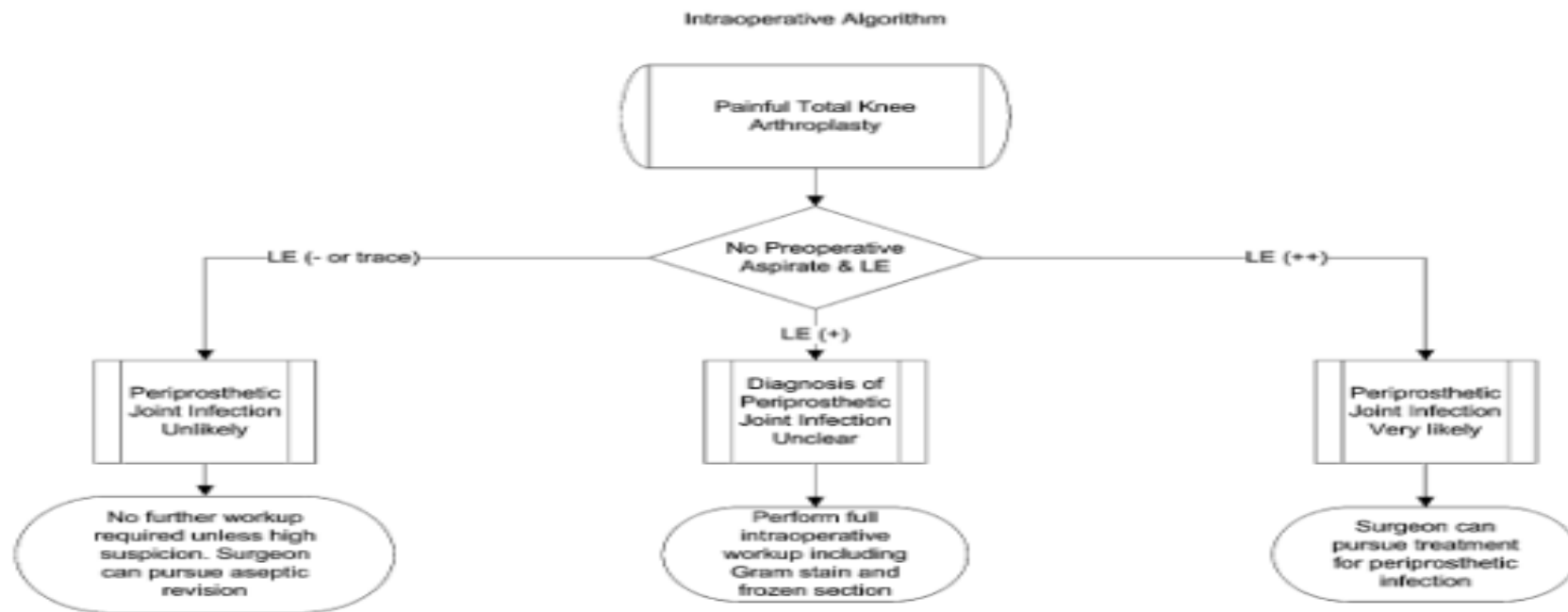
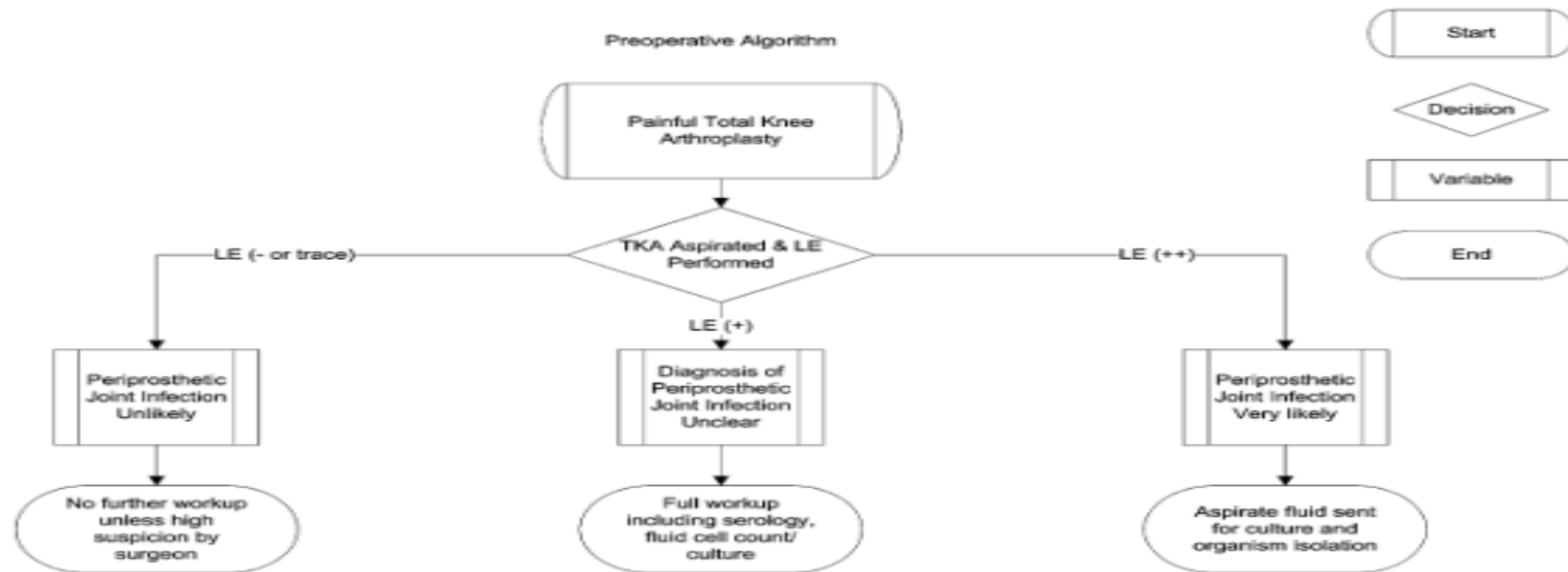
LEUKOCYTES 2 minutes	NEG	Trace	Small	Moderate	Large
-------------------------	-----	-------	-------	----------	-------

▶ requires the longest time of all the reagent strip reactions (2 minutes)



Leukocyt esterase

- ▶ Wordt tegenwoordig ook meer en meer gebruikt in andere vochten om snel en goedkoop infectie aan te tonen, bv BAL, pleuravocht, ...
- ▶ Parvizi et al in 2011: ++ lezing: PPV 100% en +/- lezing: NPV 93,3%
 - ▶ Parvizi liet leukocyt esterase toevoegen aan MSIS “minor” criteria owv goede resultaten!
- ▶ Probleem: bloedbijmenging (in 17-30% van de aspiraten) die lezing bemoeilijkt!
 - ▶ Aggarwal et al: centrifugatie elimineert probleem van bloedbijmenging voor de visuele lezing, terwijl performantie gelijk blijft



Leukocyt esterase

	Cut-off	Aantal	Sensitiviteit	Specificiteit	PPV	NPV	gewrichten
Parvizi et al, 2011	++	108	80.6%	100%	100%	93.3%	Knie
	+/++		93.5%	86.7%	72.5%	97.3%	Knie
Parvizi et al, 2011	++	17	80%	100%	100%	92.3%	Knie
	+/++		100%	41.7%	41.7%	100%	Knie
Wetters et al, 2012	+/++	223	93.3%	77%	37.8%	98.7%	Heup/knie
Tischler et al, 2014	++	189	66%	97.1%	89.7%	88%	Heup/knie
	+/++		79.2%	80.8%	61.8%	90.1%	Heup/knie
Guenther et al, 2014	++/+++	364	100%	96.5%	82%	100%	Heup/knie/ schouder
Shafafy et al, 2015	++/+++	109	81%	93%	74%	95%	Heup/knie
Colvin et al, 2015	++	57	100%	97%	95%	100%	Heup/knie/ elleboog
Deirmengian et al, 2014	++	46	69%	100%	100%	77%	Heup/knie

Beperkingen van leukocyt esterase

- ▶ Inter-observer variabiliteit: automatische lezing
- ▶ Proxy van aantal neutrofielen in gewrichtsvocht!
- ▶ Dus ook verhoogd in situaties waar we verhoogde synoviale leukocytose/linksverschuiving verwachten:
 - ▶ Inflammatoire gewrichtsaandoeningen? Geen evidentie voor hoger aantal WBC!¹
 - ▶ Metal-on-metal protheses: leiden tot vals verhoogde leukocytose in gewrichtsvocht, voorlopig nog niet aangetoond bij leukocyt esterase²
 - ▶ Polyethyleen slijtage: wel vals positieve leukocyt esterase testen beschreven³
 - ▶ Waarschijnlijk niet bruikbaar kort na operatie gezien dan standaard hoger aantal WBC⁴

1. Cipriano et al. J Bone Joint Surg 2012
2. Tischler et al. J Bone Joint Surg 2014
3. Guenther et al. Int Orthop 2014
4. Bedair et al. Clin Orthop Relat Res 2011

Alfa-defensines in synoviaal vocht

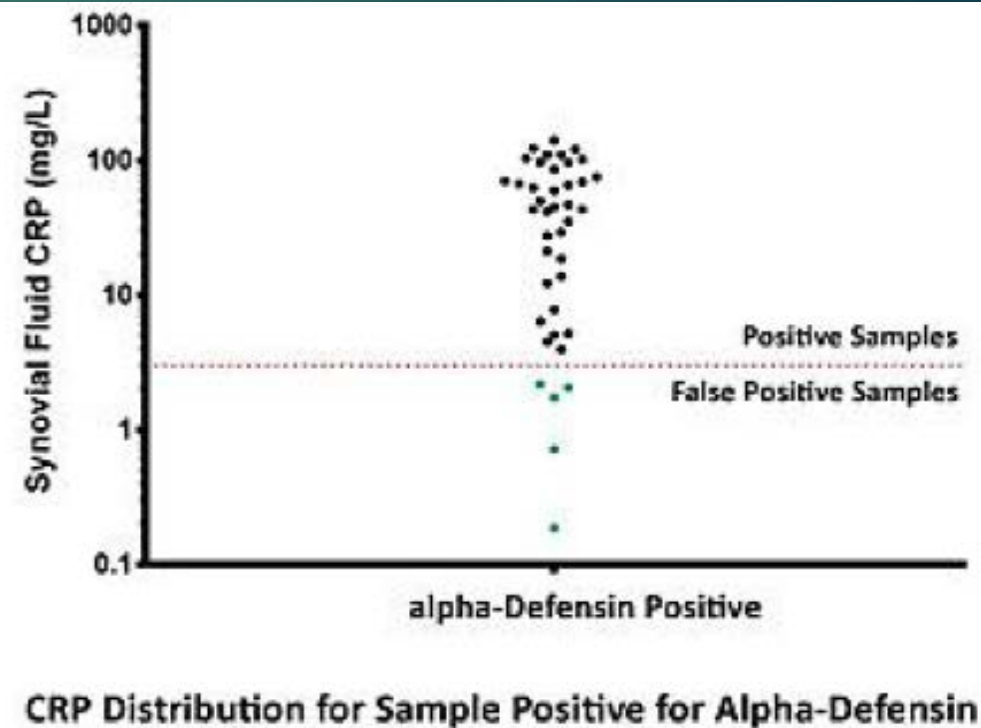
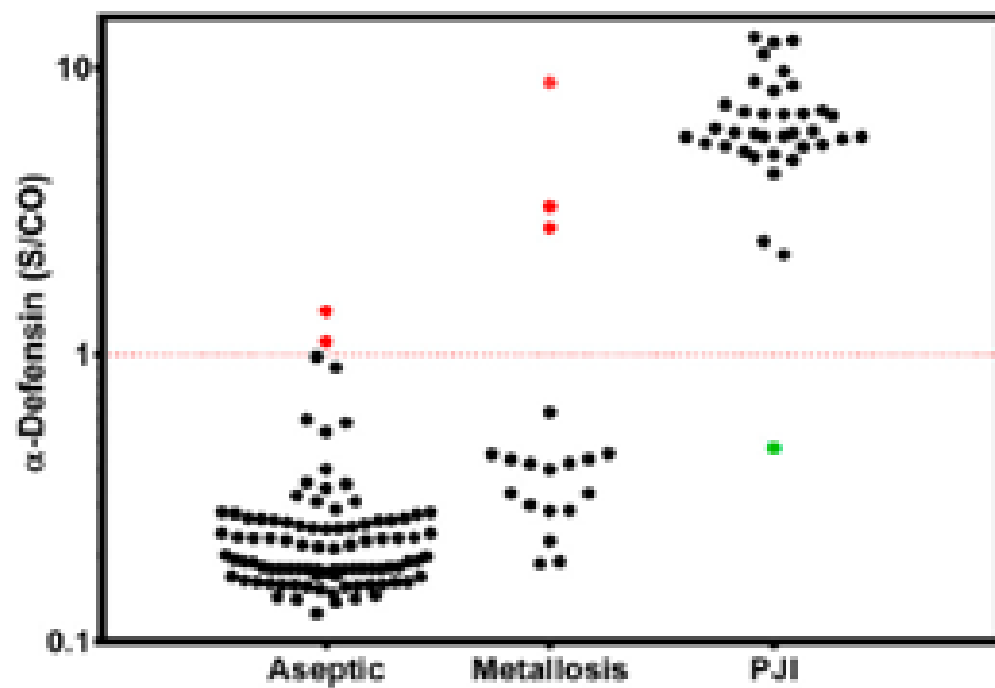
- ▶ Alfa-defensines zijn antimicrobiële peptides, geproduceerd door neutrofielen, macrofagen en andere immuuncellen
- ▶ Kwamen in studie van Deirmengian *et al* in 2014 naar voor als efficiënte parameter bij prothese infecties, met sensitiviteit en specificiteit van 100%
- ▶ Proxy voor neutrofielen? Geen correlatie met WBC telling in synoviaal vocht! ($r=0,08$)



Alfa-defensines

- ▶ Kwalitatieve ELISA ontwikkeld door CD Diagnostics (Zimmer): Synovasure® PJI
- ▶ Wordt uitgevoerd in centraal labo te Baltimore, USA
- ▶ Stalen dienen gecentrifugeerd en ingevroren te worden en dan verstuurd naar Citrano Medical Laboratories
- ▶ Gecombineerd met synoviaal CRP bepaling
- ▶ Recent ook POCT ontwikkeld: lateral flow device

Alfa-defensines



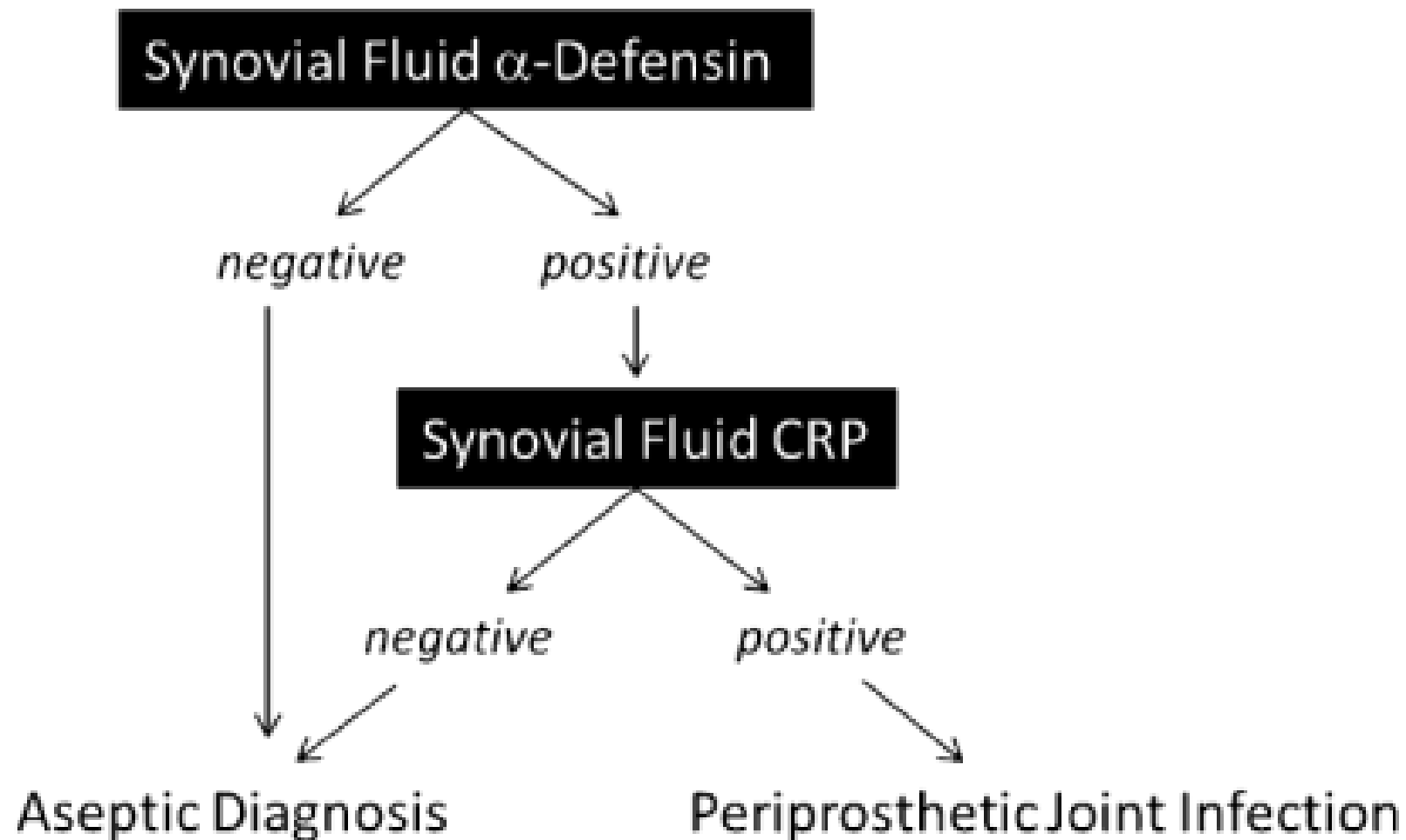


Fig. 4

α -defensin and CRP results are assessed in a combined algorithm. The CRP test is specifically utilized to improve the specificity of the combined algorithm.

Alfa-defensines in synoviaal vocht

	Aantal	Sensitiviteit	Specificiteit	PPV	NPV	Gewrichten
Deirmengian et al, 2014	95	100%	100%	100%	100%	Heup/knie
Deirmengian et al, 2014	149	97%	96%	90%	99%	Heup/knie
Deirmengian et al, 2014	46	100%	100%	100%	100%	Heup/knie
Bingham et al, 2014	61	100%	95%	90%	100%	Heup/knie
Frangiamore et al, 2015	33	63%	95%	88%	88%	Schouder

Alfa-defensine POCT

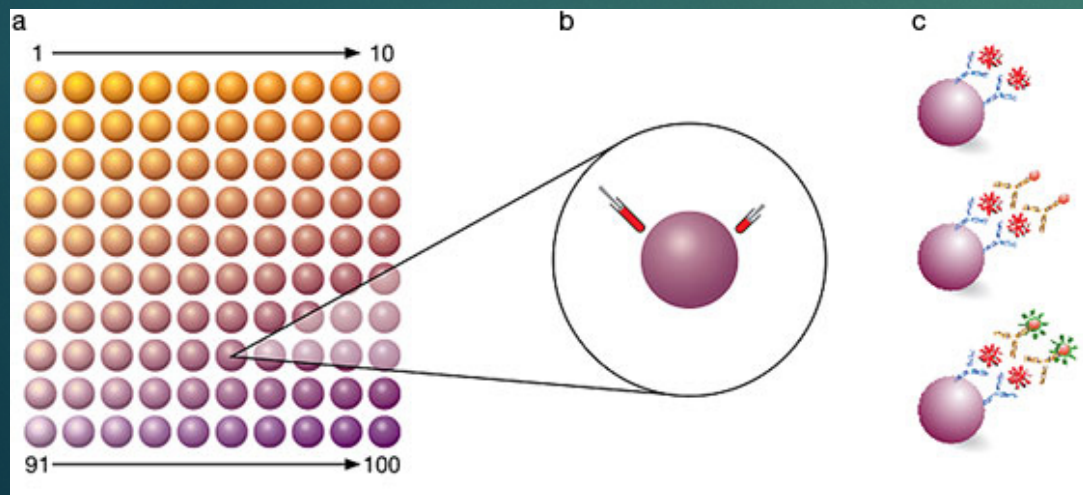


Beperkingen van alfa-defensines

- ▶ Prijs!
- ▶ POCT niet uitgetest in klinische studies
- ▶ POCT: effect bloedbijmenging?
- ▶ Auteurs van huidige gepubliceerde studies ontvingen (bijna) allemaal “aanzienlijke” financiële gunsten van CD Diagnostics

BJI Inoplex[®] (Diaxonhit)

- ▶ Nieuw multiplex immunoassay dat antistoffen opspoot tegen *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *P. acnes* en *S. agalactiae*.
- ▶ Recombinant proteïnen van deze micro-organismen werden gekoppeld aan Magplex[™] beads (Luminex). IgG binding aan deze beads wordt gedetecteerd met fluorescent gelabeld anti-humaan IgG. Fluorescentie wordt geanalyseerd met Magpix toestel.



BJI Inoplex

- ▶ Resultaten worden kwalitatief gerapporteerd per genus (stafylokokken, streptokokken of *P. acnes*)
- ▶ Uitgetest op 455 patiëntenstalen:
 - ▶ Stafylokokken: sensitiviteit 72,3%, specificiteit 80,7%
 - ▶ *S. agalactiae*: sensitiviteit 75%, specificiteit 92,6%
 - ▶ *P. acnes*: sensitiviteit 38,5%, specificiteit 84,8%
- ▶ Sensitiviteit hoger bij chronische infecties (> 3 maanden) dan acute
- ▶ Doch sensitiviteit, vooral voor *P. acnes*, blijft een probleem!

BJI Inoplex: beperkingen

- ▶ Pathogenen geïncubeerd in assay maken slechts ongeveer 60% uit van verwekkers prothese infecties
- ▶ “Indeterminate results”: bij 6% van alle patiëntenstalen in studie
- ▶ Arbeidsintensief → prijs?
- ▶ Specifiek voor *gewrichtsprothese* infectie?
- ▶ Kruisreactiviteit?
- ▶ Klinisch toegevoegde waarde?

	Voordelen	Nadelen
Serum interleukine-6	- Niet-invasieve pre-operatieve diagnose - Hoge specificiteit - In combinatie met CRP beter dan CRP + ESR? - Prijs? - Mogelijk nut in uitsluiten infectie vóór second stage operatie	- Sensitiviteit variabel - Niet nuttig voor schouderprothesen - Niet bruikbaar bij inflammatoire aandoeningen, ziekte van Paget, HIV, ...
Synoviaal interleukine-6	- Sensitief en specifiek - Mogelijk waardevol bij schouderprothesen - Prijs?	- Cut-off? - Beter dan synoviaal CRP/witte bloedcel telling? - Assays meestal niet gevalideerd voor synoviaal vocht - Invasief; geen peroperatieve diagnose mogelijk
Leukocyt esterase	- Universeel beschikbaar - Prijs - Sensitief/specifiek afhankelijk van cut-off - POCT: pre- of peroperatieve diagnose mogelijk	- Bijmenging bloed/debris - Vals-positieven beschreven bij polyethyleen slijtage - Metal-on-metal prothesen? - Inflammatoire aandoeningen?
Alpha-defensine	- Hoge sensitiviteit en specificiteit - Mogelijk waardevol bij schouderprothese - POCT - Goede resultaten bij inflammatoire aandoeningen, voorafgaand antibioticagebruik en cultuur-negatieve infecties	- Prijs! - POCT nog niet uitgetest in gepubliceerde studies - Meer onafhankelijk onderzoek nodig - Vals-positieven bij metal-on-metal prothesen
BJI Inoplex	- Pre-operatief, niet-invasief identificatie kiem op genusniveau mogelijk - Snel resultaat - Aanvullende informatie bij vermoeden prothese-infectie	- Tot 40% van mogelijke verwekkers niet geïncubeerd in assay - Matige sensitiviteit voor stafylokokken/ streptokokken - Zeer lage sensitiviteit P. acnes - Kruisreactiviteit? - Prijs? - Meer onderzoek nodig

To do/actions

- ▶ Prospectieve studie: evaluatie van interleukine-6 op serum, leukocyt esterase op synoviaal vocht en BJI Inoplex bij patiënten met vermoeden prothese infectie in GHB
- ▶ Synoviaal CRP? Wordt in GHB standaard uitgevoerd bij vermoeden prothese infectie! Klinische waarde? Sensitiviteit/specificiteit?
 - ▶ Enkele studies van Parvizi *et al* en Omar *et al* suggereren hoge sensitiviteit en specificiteit (84 tot 95,5% en 85 tot 97% respectievelijk)¹⁻³; echter Vanderstappen *et al* en Tetreault *et al* vonden geen betere resultaten voor synoviaal CRP dan voor serum CRP^{4,5}
 - ▶ Retrospectieve evaluatie van synoviaal CRP in onze cohorte?

1. Parvizi *et al*. J Arthroplasty 2012
2. Parvizi *et al*. Clin Orthop Relat Res 2012
3. Omar *et al*. Bone Joint J 2015
4. Tetreault *et al*. Clin Orthop Relat Res 2014
5. Vanderstappen *et al*. Acta Orthop Belg 2013

Vragen?

