

Aus der
Helios ENDO-Klinik Hamburg

DISSERTATION

**Überprüfung der Aussagekraft eines neuen
quantitativen Alpha-Defensin-Testes zur Detektion von
Infektionen in Gelenkpunktaten**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

in der

Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von Michael Dütsch

aus Würzburg

Hamburg 2021

Angenommen vom Senat am: 10.12.2021

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Michael P. Manns

Betreuer/in der Arbeit: PD Dr. med. Daniel O. Kendoff

1. Referent/in: PD Dr. med. Marcel Winkelmann

2. Referent /in: Prof. Dr. med. Fritz Thorey

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2021

Prüfungsausschuss:

Vorsitz: Prof. Dr. med. Stephan Sehmisch

1. Prüfer/in: Prof. Dr. med. Markus Cornberg

2. Prüfer/in: Prof. Dr. med. vet. Dirk Berens von Rautenfeld

1.	Inhaltsverzeichnis	3
2.	Einleitung	6
2.1.	Infektionen in der Gelenkchirurgie	6
2.2.	MSIS-Kriterien als derzeitiger Goldstandard zur Diagnose von Gelenkinfektionen	7
2.3.	Nachweisverfahren für inflammatorische und infektiöse Prozesse in Gelenken	10
2.3.1.	PCR-Untersuchung der Synovialflüssigkeit	11
2.3.2.	CRP-Bestimmung aus dem Gelenkpunktat	12
2.3.3.	Leukozytenesterasetest	12
2.3.4.	Biomarker im infizierten Gelenk	13
2.4.	Zielsetzung	16
3.	Material und Methodik	16
3.1.	Studiendesign	16
3.2.	Untersuchte Parameter, Probengewinnung und Materialverarbeitung	17
3.3.	Ein- und Ausschlusskriterien	19
3.4.	Statistische Analyse	20
3.4.1	Allgemeine Angaben zur statistischen Auswertung	20
3.4.2	Analyse der „Receiver-Operating-Characteristics“-Kurve	23
3.4.3	Der Testtrennwert (Cutoff) der ROC-Kurve	24
3.4.4	Der Youden-Index	24
4.	Ergebnisse	25
4.1.	Beschreibung der grundlegenden Daten im Gesamtkollektiv	25

4.2.	Verteilung und Korrelation der verglichenen Infektionsparameter zu den MSIS-Kriterien „aseptisch“ und „septisch“	26
4.3.	Diagnostische Güte der untersuchten Parameter	31
4.3.1	Diagnostische Güte von Alpha-Defensin	31
4.3.2	Diagnostische Güte von Serum-CRP	34
4.3.3	Diagnostische Güte von Serum-Leukozyten	35
4.4.	Einzelbetrachtung der falsch positiven und falsch negativen Ergebnisse	36
4.5.	Alpha-Defensin Werte bei Patienten mit chronisch inflammatorischen Grunderkrankungen	37
4.6.	Deskriptive Analyse der Keimbesiedlung	38
5.	Diskussion	39
5.1.	Interpretation der Ergebnisse	39
5.2.	Beeinflussung der Testergebnisse durch Begleiterkrankungen, Probengewinnung und Beobachtungszeitraum	40
5.3.	Kriterien der MSIS-Definition für Gelenkinfektionen im Wandel	43
5.4.	Limitationen der Studie	44
6.	Zusammenfassung	45
7.	Literatur	49
8.	Anhang	57

8.1.	Abbildungsverzeichnis	57
8.2.	Abkürzungsverzeichnis	58
8.3.	Lebenslauf	59
8.4.	Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7 der Promotionsordnung	61
8.5.	Danksagung	52

2. Einleitung

2.1. Infektionen in der Gelenkchirurgie

Im Bereich der Endoprothetik stellen Gelenkinfektionen sowohl bei der endoprothetischen Primärversorgung als auch bei Revisionseingriffen an Endoprothesen eine ernst zu nehmende Komplikation dar. Obwohl seit 1964 das Infektionsrisiko für primäre Endoprothetik von 9% auf 1-2 % gesunken ist und für Revisionsoperationen das derzeitige Infektionsrisiko zwischen 7% und 12% angegeben wird [1-7], bleibt bei insgesamt zunehmender Fallzahl an endoprothetischen Operationen auch die Anzahl der periprothetischen Infekte zunehmend. Periprothetische Infektionen wurden US-amerikanischen Studien zufolge für 25% aller nicht erfolgreichen Kniegelenksprothesen und entsprechend 15% der Hüftgelenksprothesen verantwortlich gemacht [8, 9]. Daraus ergibt sich sowohl medizinisch, im Hinblick auf die Inzidenz dieses oft schweren Krankheitsbildes, als auch auf Grund der ökonomischen Gesamtbelastung des Gesundheitssystems ein zunehmender Handlungsbedarf.

Neben der oft schwierigen und langwierigen Therapie solcher Infektionen gilt es auch im Bereich der Infektionsdiagnostik einige Probleme zu meistern. Gut etablierte Parameter zur Erfassung einer Gelenkinfektion sind serologische Untersuchungen, bildgebende Diagnostik und bakteriologische Untersuchungen der Synovialflüssigkeit. Diese sind seit Jahrzehnten erprobt, international üblich und in vielen Publikationen beschrieben. Einige dieser Infektionsparameter, speziell solche, die im Serum des menschlichen Blutes gemessen werden, sind entweder nicht infektionsspezifisch (C-reaktives Protein) oder reagieren eher träge und erst bei systemischen Infektionen (Serum-Leukozyten) [5, 10-27]. Gerade aber die CRP-Bestimmung fand und findet noch immer hohe Beachtung bei der Diagnostik von Gelenkinfektionen. Dies gilt sowohl für das Serum-CRP, also auch die CRP-Bestimmung direkt aus dem Gelenkpunktat [28, 29]

Der in der Vergangenheit von vielen Klinikern als Goldstandard zur Sicherung der Infektionsdiagnose herangezogene mikrobiologische Punktionsbefund, der im Rahmen des präoperativen Screenings erhoben wird, zeigte sich bei näherer

Betrachtung auch nicht so zuverlässig wie erhofft. So konnten unter anderem Shanmugasundaram et al. mit einer internationalen multizentrischen Studie von 2013 in der präoperativen Punktionsdiagnostik der Synovialflüssigkeit nur in 45,2% der infizierten Kniegelenke und 44,4% der infizierten Hüftgelenke Keime nachweisen [7]. Solche, hinsichtlich der Infektionsdetektion, hohen falsch negativen Ergebnisse der mikrobiologischen Analyse konnten bereits in anderen Studien belegt werden [15, 21, 30, 31]. Als Hauptgründe für falsch negative Ergebnisse werden vor allem eine niedrige Konzentration von Erregern in der Punktionsflüssigkeit, falsch gelagertes oder verzögert transportiertes Material, nicht oder zu wenig gewonnenes Untersuchungsmaterial, sowie durch in einem Biofilm oder einer Zement-Knochen-Interferenz gefangene Erreger mit schwierig zu erfassender Infektion angegeben [15, 30, 31]. Zudem müssen einige langsam wachsende Erreger, wie zum Beispiel *Cutibacterium acnes* (ältere Bezeichnung: *Propionibacterium acnes*), mit bis zu drei Wochen vergleichsweise lange bebrütet werden und können dadurch bei verfrühter Beurteilung mit falsch negativem Ergebnis bewertet werden [32, 33]. Falsch positive Ergebnisse sind den Autoren zufolge vor allem Verunreinigungen durch Hautkeime geschuldet [15, 21].

Auch in den intraoperativ gewonnenen Kulturen von Shanmugasundaram et al. blieben für Hüftrevisionsoperationen bei 15% und für Knieoperationen bei 20,7% der untersuchten Fälle die mikrobiologischen Untersuchungen negativ, obwohl von einer Gelenkinfektion ausgegangen wurde [7]. In vielen, teils auch älteren Studien wurde der Bereich für falsch negative mikrobiologische Befunde zwischen 2% und 18% angegeben, der für falsch positive zwischen 3% und 31,5% [5, 15-17, 19, 20, 23, 27, 34-36].

2.2. MSIS-Kriterien als derzeitiger Goldstandard zur Diagnose von Gelenkinfektionen

Auf Grund der diagnostischen Schwierigkeit, bisher keinen völlig zuverlässigen Einzeltest zur Diagnostik einer Gelenkinfektion zu haben, hat es sich die „Musculoskeletal Infection Society“ (MSIS) zur Aufgabe gemacht, aus den bisher

zur Verfügung stehenden Parametern ein möglichst sicheres Bewertungssystem zur Diagnostik eines Gelenkinfekts zu definieren. Es wurden hierbei zwei Major-Kriterien definiert, die je für sich alleine genommen, die Diagnose „Gelenkinfektion“ begründen. In einer weiteren Gruppe werden fünf schwächer gewichtete diagnostische Kriterien, sogenannte Minor-Kriterien definiert, von denen für eine sichere Infektionsdiagnose drei erfüllt sein müssen. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass auch bei weniger als drei erfüllten Kriterien eine Infektion vorliegen kann [32]. Dieser Kriterienkatalog wurde von Parvizi et. al 2011 publiziert [37] und dient dieser in 2015 und 2016 durchgeführten Studie als Grundlage zur Evaluierung der Ergebnisse. Dieser Kriterienkatalog wurde später im Rahmen des International Consensus Meetings modifiziert und publiziert [38].

Eine Gelenkinfektion liegt vor, wenn eines dieser beiden Major-Kriterien vorliegt:

1. eine mit der Prothese kommunizierende Fistel vorliegt, oder
2. ein phänotypisch identischer Keimnachweis aus mindestens zwei voneinander unabhängig gewonnenen Proben aus Gewebe oder Flüssigkeit des betroffenen Gelenkes vorliegen, oder
drei der folgenden fünf Kriterien erfüllt sind:
 - A) Erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (>30 mm/h) und erhöhtes Serum-CRP (>10mg/L).
 - B) Erhöhte synoviale Leukozytenzahl (>3000/Mikroliter) oder LE-Test ++/+++.
 - C) Erhöhter prozentualer Anteil synovialer neutrophiler Granulozyten.
 - D) Isolation eines Mikroorganismus in einer Kultur von periprothetischem Gewebe oder periprothetischer Flüssigkeit.
 - E) Mehr als fünf neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld bei fünf Gesichtsfeldern einer histologischen Analyse des periprothetischen

Gewebes unter 400-facher Vergrößerung.

Eine Infektion kann vorliegen, wenn weniger als drei dieser Kriterien erfüllt sind.

Von den Autoren wird angemerkt, dass auch für die in dieser Definition genannten Kriterien keine völlige Sicherheit hinsichtlich ihrer Aussagekraft zur Gelenkinfektion besteht. So können beispielsweise international die Standards verschiedener Labore erheblich voneinander abweichen. Auch weisen unterschiedliche Studien teils sehr hohe Schwankungen hinsichtlich der Leukozyten im Gelenkpunktat aus. Insbesondere unterscheiden sich hier „low grade“ Infektionen von akuten Infekten. Die Angaben hierzu reichen von 1100 bis 4000 Zellen pro Mikroliter und einem Anteil von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten „PMN“ zwischen 64% und 69% bei „low grade“ Infektionen [11, 39, 40], bis zu mehr als 20000 Leukozyten pro Mikroliter und einem Anteil von 89% polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten bei akuten Infektionen. Als akut wird eine Infektion definiert, wenn weniger als drei Monate seit dem Zeitpunkt der Operation, beziehungsweise seit Einsetzen der Infektionssymptome vergangen sind [41]. Patienten mit inflammatorischen Arthropathien wurden in den genannten Studien nicht eingeschlossen.

Weiter führen die Autoren an, dass bei Beurteilung histologischer Präparate immer auch die Erfahrung des Untersuchers eine Rolle spielt, da neutrophile Granulozyten nicht nur bei Infektionen, sondern auch bei frischen Frakturen oder anderen inflammatorischen Arthropathien zu finden sind [37].

Ähnliche Einschränkungen werden bei anderen Publikationen bei der Leukozytenzählung gesehen. Neben den bereits erwähnten falsch positiven Ergebnissen auf Grund von inflammatorischen Prozessen werden auch falsch negative Resultate durch Einnahme von Immunsuppressiva, wie zum Beispiel bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis diskutiert [32].

Problematisch bei der Infektionsdefinition durch die MSIS-Kriterien bleibt zudem der subjektive Charakter einiger Kriterien, wie beispielsweise die Beobachtung von Eiter, oder die individuelle Beurteilung einzelner histologischer Befunde.

Auch die späte Diagnosesicherung durch lange Bebrütungszeiten und die relative Komplexität der Definition selbst werden als problematisch erachtet [8].

Die von der MSIS vorgeschlagene Definition für Gelenkinfektionen spiegelt das aktuelle evidenzbasierte und durch Literatur untermauerte Wissen wider. Es wird darauf hingewiesen, dass derzeit viele weitere interessante Diagnostika untersucht werden. Angeführt werden CRP-Messungen in der Synovialflüssigkeit, die Bestimmung der synovialen Leukozytenesterase, Polymerase Chain Reaction (PCR) – Analysen und die Bestimmung molekularer Marker, wie z.B. Interleukin 6 (IL-6). Im Zuge der Etablierung und Validierung dieser Untersuchungsparameter könnte die gegebene Definition für Gelenkinfektionen modifiziert werden müssen [37].

2.3. Nachweisverfahren für inflammatorische und infektiöse Prozesse in Gelenken

Es werden in den letzten Jahren zunehmend Verfahren evaluiert, die Infektionen im Gelenk entweder direkt durch den Nachweis des Pathogens, beziehungsweise dessen Bestandteile diagnostizieren, oder eine Infektion durch die körpereigene Antwort auf das Pathogen erfassen. Hier sind neben der schon länger etablierten Leukozytenzählung in der Punktionsflüssigkeit vor allem die PCR-Analyse, der Leukozytenesterasetest, lokale CRP-Bestimmungen, sowie der Nachweis von Biomarkern in der Synovialflüssigkeit zu nennen. Ihnen gemeinsam ist, dass sie im Gegensatz zu den gängigeren systemischen Inflammationsparametern, wie Blutsenkungsgeschwindigkeit oder CRP im Serum, eine direkte Aussage zur lokalen inflammatorischen Aktivität, im Idealfall die Detektion bakterieller Infektionen im betroffenen Gewebe selbst erlauben.

Einige dieser Testverfahren sollen hier kurz vorgestellt werden.

2.3.1 PCR-Untersuchung der Synovialflüssigkeit

Neben dem direkten Nachweis von Erregern im Gelenkpunktat durch Bebrütung und mikrobiologischer Untersuchung steht auch die Untersuchung von lediglich Teilen der DNA-Sequenz eines Erregers zur Verfügung. Mit der Polymerase Chain Reaction (PCR) können durch Vervielfältigung von eventuell nur minimal vorhandenen Erregerbestandteilen diese sichtbar gemacht werden und ein Erregerbefall nachgewiesen werden [42, 43]. Der Vorteil gegenüber der mit einer hohen falsch negativen Anzahl von Ergebnissen behafteten mikrobiologischen Untersuchung [44] ist die Unabhängigkeit des Verfahrens von lebenden Erregern, sowie einer antibiotischen Vorbehandlung [45].

In einer bereits 2008 von Gallo et al. veröffentlichten Studie [45] wurde bei 115 Patienten mit revisionspflichtigen Endoprothesen eine Untersuchung zum Vergleich der Aussagekraft von PCR und mikrobiologischer Kultur durchgeführt. Hierbei wurde die Synovialflüssigkeit der Patienten präoperativ mit Hilfe der genannten Verfahren untersucht und unter anderem hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität als Infekt-Diagnostikum überprüft. Hierbei fanden sich für die PCR eine Sensitivität von 0,71 und eine Spezifität von 0,88. Für die mikrobiologische Kultur fanden sich analog lediglich eine Sensitivität von 0,44 und eine Spezifität von 0,94. Die Autoren schließen daraus, dass die PCR-Analyse den Nutzen der präoperativen Gelenkpunktion bei Gelenksrevisionsoperationen erhöht.

Allerdings wird in neueren Veröffentlichungen einschränkend festgestellt, dass zwar speziell das Verfahren der BR-PCR („broad range polymerase chain reaction“) sehr gut mit den Kulturergebnissen korreliert [46, 47], aber dennoch eine antibiotische Therapie nur nach Vorliegen von Kultur und Antibiogramm sinnvoll ist [32]. In anderen Publikationen zeigt die PCR eine breite Spanne unterschiedlicher Ergebnisse hinsichtlich ihrer Sensitivität [48-51], so dass sie als Einzelkriterium zur Diagnostik von Gelenkinfekten nicht geeignet zu sein scheint [52].

2.3.2 CRP-Bestimmung aus dem Gelenkpunktat

Eine weitere Möglichkeit inflammatorische Aktivität im Gelenk festzustellen ist die direkte Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP) aus der Synovialflüssigkeit. Im Gegensatz zur etablierten CRP-Messung im Serum des Patienten gibt diese Auskunft über entzündliche Prozesse im untersuchten Gelenk selbst. Es bleibt jedoch die Einschränkung, dass das C-reaktive Protein auch im Gelenkpunktat eher unspezifisch und bei entzündlichen Prozessen unterschiedlicher Genese im betroffenen Gelenk ansteigt. In Studien aus den Jahren 2012 und 2013 wurde das synoviale CRP dennoch als brauchbarer Marker zum Nachweis intraartikulärer Infektionen beschrieben [28, 53, 54]. Tetreault et al. veröffentlichten 2014 allerdings eine Untersuchung, bei der trotz relativ guter Korrelation von Serum-CRP und synovialem CRP kein klinisch relevanter Vorteil der synovialen Bestimmung des CRP gesehen wurde, da Sensitivität und Spezifität beider Verfahren vergleichbar blieben. Zusätzlich wird eine höhere Quote an nicht auswertbaren Proben beschrieben (zu putride Punktionsflüssigkeit, Hämolyse oder koaguliertes Aspirat) [55]. Zudem ist auch hier bei Patienten mit nicht bakterieller inflammatorischer Aktivität im Gelenk, zum Beispiel bei aktivierter Arthrose, rheumatoider Arthritis oder Psoriasisarthritis, ein falsch positives Ergebnis möglich. Insbesondere ist bis zwei Monate nach chirurgischem Eingriff mit einer erhöhten Aktivität des CRP zumindest im Serum des Patienten zu rechnen [56-58]. Die Detektion von Frühinfektionen nach gelenkchirurgischen Eingriffen könnte somit bei diesem diagnostischen Vorgehen nur unzuverlässig möglich sein.

2.3.3. Leukozytenesterasetest

Der Leukozytenesterasetest ist eine semiquantitative Testung auf das Vorhandensein des Enzyms Leukozytenesterase im untersuchten Medium. Die Ergebnisse werden in die Kategorie „negativ“, „+“, „++“ und „+++“ eingeteilt. Eine

Aussage über den Keim selbst kann hier nicht getroffen werden, so dass auch die Leukozytenesterase als alleiniges Diagnostikum zumindest im Hinblick auf eine meist zwingend erforderliche antibiotische Anschlusstherapie ausscheidet. Die Idee, leukozytäre Aktivität mit Hilfe der exprimierten Esterase aufzudecken, ist vor allem im Bereich der Urinanalyse seit längerem etabliert [59, 60]. Außerdem liegen Untersuchungen zur Diagnose der spontanen bakteriellen Peritonitis [61, 62], von Pleurainfektionen [63] und Mittelohrentzündungen [64] vor.

Für den Einsatz im Bereich der Gelenkinfektionen wurde das Verfahren erstmals 2011 von Parvizi et al. beschrieben [65]. In einer umfangreichen Untersuchung aus 2014 wurde von Guenther et al. an 364 Patienten mit Hüft-, Knie- und Schultergelenksrevisionen die Aussagekraft dieses Tests als Diagnostikum für Gelenkinfektionen untersucht. Es zeigte sich eine sehr hohe Sensitivität (100%) und Spezifität (96,5%) dieses Tests, wobei jedoch einschränkend auf falsch positive Resultate bei signifikantem Polyethylen- oder Metallabrieb im Gelenk hingewiesen wurde [66]. In der Zusammenschau mit anderen Diagnostika scheint dieser hochsensitive Test aber sehr hilfreich zu sein [67].

2.3.4. Biomarker im infizierten Gelenk

Es ist seit Langem bekannt, dass spezifische immunologische Abwehrreaktionen bei Erregerkontakt initial eine Kaskade von protektiven zellulären Abwehrmechanismen in Gang setzen. Hierbei nehmen Granulozyten eine entscheidende Rolle bei der körpereigenen antimikrobiellen Abwehrreaktion ein. Einerseits kann der Granulozyt oxidative und peroxidative Mediatoren („ROIs“ - Reactive Oxygen Intermediates) wie H₂O₂ oder OH ausschütten, die alleine oder im Zusammenspiel mit der Myeloperoxidase einen phagozytierten Erreger abtöten können [68, 69]. Andererseits exprimieren Granulozyten davon unabhängig eine Gruppe von antimikrobiellen Peptiden, welche unter der Gruppe der Defensine zusammengefasst werden, wenn sie in Kontakt mit einem

Pathogen treten. Die Defensine weisen direkte antimikrobielle Aktivität gegenüber einem breiten Spektrum von Erregern aus. Hierzu gehören grampositive wie gramnegative Erreger, viele Pilze, Mykobakterien, Spirochäten und einige Virenarten. Defensine setzen dabei an Zielmembranen der Erreger an und bilden spannungsabhängige Kanäle aus [70, 71].

Einiger dieser inzwischen differenzierten Proteine wurden von Deirmengian et al. hinsichtlich ihrer Nutzbarkeit als Diagnostikum für Gelenkinfektionen untersucht [72]. Wie bereits in früheren Untersuchungen fanden auch die Autoren dieser Studie, dass Defensine auf ein breites Spektrum von Erregern reagieren. Auf Grund dieser Aktivität gegenüber Erregern und ihrer laborchemischen Verwertbarkeit, werden Defensine auch als Biomarker bezeichnet.

16 dieser Biomarker aus der Synovialflüssigkeit von Patienten wurden näher untersucht [8], wobei fünf dieser Proteine eine Sensitivität von 100% im Hinblick auf die Detektion von Infektionen an Gelenken aufwiesen.

Dies sind im Einzelnen:

Alpha-Defensin, Subtyp 1-3,

die „Neutrophile Elastase, ELA-2“,

das „Bactericidal / Permeability-Increasing Protein, BPI“,

der „Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin, NGAL“

und „Lactoferrin“.

Weitere untersuchte, aber weniger sensitive Biomarker waren „Interleukin 8, IL-8“, „Resistin“, „Thrombospondin“ sowie die Interleukine „IL-1beta“, „IL-6“, „IL-10“ und IL-1alpha. In einer Studie von Yildirim et al. zum Beispiel fanden sich gute Ergebnisse hinsichtlich Detektion von Gelenkinfektionen bei einer kombinierten Betrachtung von IL-6 und CRP-Werten [73].

Unter den Biomarkern mit sehr hoher Sensitivität steht Alpha-Defensin derzeit im

klinischen Fokus. Es sind mittlerweile mehrere Testverfahren zur Bestimmung von Alpha-Defensin in klinischer Erprobung bzw. schon im klinischen Einsatz. Mehrere Untersuchungen aus 2014 und 2015, hauptsächlich von Arbeitsgruppen um Carl Deirmengian, scheinen die ausgezeichnete Sensitivität und hohe Spezifität der Alpha-Defensin-Bestimmung zu bestätigen [8, 56, 72, 74]. In einer dieser Studien [75] aus 2014 wurden 149 Patienten (112 aseptisch, 37 mit periprothetischer Infektion) hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität von Alpha-Defensin zur Infektionsdiagnostik bei Gelenkinfekten herangezogen. Die Eingruppierung in infizierte und nicht-infizierte Kohorten wurde anhand der MSIS-Kriterien für Gelenkinfektionen durchgeführt. Untersucht wurde neben Alpha-Defensin auch der Gehalt an C-reaktivem Protein im Gelenkpunktat.

Der hier verwendete Alpha-Defensin-Test der Fa. „CD Diagnostics“ operiert mit einem „Signal-to-cut-off“ (S/CO) von 1.0 zur Differenzierung von aseptischen (0-0,9), unbestimmten (0,9-0,99) und infizierten (ab 1,0) Proben. Dieser diagnostische Schwellenwert wurde bei einer Alpha-Defensin Konzentration von 5,2mg/L ermittelt und von Deirmengian et al. 2014 publiziert [75].

So fand sich für den Alpha-Defensin Test eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 96% [75].

Deirmengian beschrieb zudem bei Proben mit Metallabrieb, aber ohne Infektion, teilweise Alpha-Defensin Werte von über 1,0 gefunden zu haben. Bei Untersuchung dieser metallhaltigen Punktionsflüssigkeiten auf C-reaktives Protein fanden sich wiederum keine erhöhten Werte, so dass sich aus den gewonnenen Ergebnissen, bzw. der Zusammenschau von Alpha-Defensin Befunden und CRP-Werten im Gelenkpunktat sogar eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 97% ermitteln lässt [75]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Okroj et al, die bei Proben mit Metallabrieb eine erhöhte falsch positive Rate bei Alpha-Defensin Testungen fanden [76].

2.4. Zielsetzung

Die gezielte und sichere Diagnostik eines möglicherweise vorliegenden Gelenkinfektes ist für ein erfolgreiches Vorgehen bei Revisions-Operationen zwingend erforderlich. Neben serologischen Infektionsparametern (z.B. CRP, Leukozyten) stehen für die Infektionsdiagnostik mittlerweile auch direkt aus der Synovialflüssigkeit gewonnene Proteine und Enzyme (z. B. Leukozytenesterase, Interleukine, Defensine) zur Verfügung.

In vorherigen US-amerikanischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung des Biomarkers Alpha-Defensin zuverlässig eine Gelenkinfektion anzeigen kann. In der vorliegenden Studie besteht das Ziel darin, die Aussagekraft eines quantitativen Alpha-Defensin Tests im klinischen Alltag zu überprüfen. Hierbei wurde in zwei Kohorten (infiziert/nicht infiziert) eingeteilt. Die Bewertung der Ergebnisse im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität, sowie negativem und positivem prädiktiven Wert des Alpha-Defensin Tests erfolgte in Relation zu den Kriterien der Musculoskeletal Infection Society (MSIS) für Gelenkinfektionen, welche derzeit als Goldstandard in der Diagnostik von Gelenkinfektionen gelten.

Die Verwendung eines aussagekräftigen Tests auf lokale Infektionen kann in zweifelhaften Situationen, z.B. bei intraoperativ suspektem Situs, eine zusätzliche Sicherheit für das richtige Vorgehen bieten.

3. Material und Methodik

3.1. Studiendesign

Es handelt sich um eine non-invasive, monozentrische und prospektive Studie, bei der insgesamt 175 Patienten mit Hüft- und Kniegelenksrevisionsoperationen eingeschlossen werden konnten. Es wurden bei diesen Patienten laborchemische Infektionsparameter (CRP, Leukozytenzahl) zum Zeitpunkt der

stationären Aufnahme sowie intraoperativ gewonnene Gelenkflüssigkeit auf Alpha-Defensin und mikrobiologischen Keimnachweis untersucht. Eine zusätzliche Analyse von Gelenkpunktat auf Leukozytenesterase, Leukozytenzahl und polymorphkernige Granulozyten sowie eine histologische Aufarbeitung von intraoperativem Gewebe erfolgte gegebenenfalls im Rahmen der klinischen Routine und war nicht durch die Durchführung dieser Studie begründet. Ergebnisse aus diesen Untersuchungen wurden, soweit vorhanden, jedoch zur Einordnung des Infektionsstatus nach den MSIS-Kriterien herangezogen.

Die intraoperative Abnahme von Gelenkflüssigkeit erfolgte ohne zusätzlichen belastenden Eingriff am Patienten im Rahmen der routinemäßigen Probenentnahme zur mikrobiologischen Untersuchung. Hieraus begründet sich der non-invasive Aspekt dieser Studie.

3.2. Untersuchte Parameter, Probengewinnung und Materialverarbeitung

Sämtliche Proben wurden routinemäßig und ausnahmslos in der Helios ENDO-Klinik Hamburg im Rahmen der üblichen operativen Versorgung, einer Gelenkrevisionsoperation an Hüfte oder Knie, durch ärztliches Personal und unter streng aseptischen Kautelen durchgeführt. Untersucht wurden Proben aus Revisionsoperationen an Hüften und Knien mit und ohne Gelenkinfektion, eingeteilt entsprechend den MSIS-Kriterien.

Nach chirurgischer Desinfektion und Abdecken des Operationsgebietes erfolgte zunächst die Hautinzision im Wege des regulären operativen Zugangs zur Gelenkrevision und die subkutane Präparation bis auf die Gelenkkapsel. Hierauf folgte die Punktion des Gelenks durch die noch geschlossene Kapsel des zu operierenden Gelenks. Die Punktion durch die freigelegte aber noch geschlossene Gelenkkapsel verhinderte, dass einerseits Gewebe- oder Blutbeimengungen aus dem Wundrand verschleppt wurden, andererseits konnten so auch Fehlpunktionen im Bereich des Hüftgelenkes bei ausgeprägtem

Weichteilmantel vermieden werden. Beides hätte sonst zu verfälschten Untersuchungsergebnissen führen können.

Ein zusätzliches Trauma durch die so durchgeführte Punktion erfolgte nicht, da im Zuge der Operation Kapselgewebe und Synovialflüssigkeit ohnehin entfernt werden.

Die gewonnene Punktionsflüssigkeit (2 Milliliter oder mehr angestrebt) wurde direkt in ein steriles Probenröhrchen abgefüllt und in pseudonymisierter Form bei 7°C im medizinischen Kühlschrank zwischengelagert.

Die gesammelten Proben wurden in einem speziellen Transportbehälter über den Fahrdienst des „Labor Dr. Fenner und Kollegen, Bergstrasse 14, 20095 Hamburg“ abgeholt und dort mittels eines quantitativen CE-zertifizierten Tests der Fa. „CD-Diagnostics“ innerhalb von maximal 36 Stunden auf Alpha-Defensin analysiert.

Der verwendete „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) ist ein Nachweistest, der auf der Interaktion eines Antigens und dessen Antikörpers, sowie einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Es wird zwischen direktem und indirektem ELISA-Testverfahren unterschieden, je nachdem, ob das Antigen oder der Antikörper nachgewiesen werden soll. Es können so eine Vielzahl verschiedener Moleküle nachgewiesen werden, wie zum Beispiel Proteine, niedermolekulare Verbindungen (Hormone, Pestizide, Toxine etc.) oder Viren. Hierfür können unterschiedlichste Probe (zum Beispiel Blutserum, Milch oder Urin) verwendet werden, was die Einsatzfähigkeit dieses Testverfahrens sehr vielfältig macht [77].

Nachdem ein Antigen auf einer Mikrotiterplatte aufgetragen wird, in diesem Fall ein Alpha-Defensin bindendes Molekül, kann der Antikörper aus der Probe (hier das Alpha-Defensin aus dem Gelenkpunktat) an das Antigen und damit an der Platte haften. Im Anschluss wird diese Antigen-Antikörper Paarung mit Hilfe eines Farbstoffs sichtbar gemacht und quantitativ ausgewertet.

Weitere, während des operativen Vorgehens gewonnene Gewebeproben, wurden ebenfalls in sterilen Gefäßen zur mikrobiologischen Untersuchung weitergeleitet. Die Probenuntersuchungen erfolgten am „Institut für Mikrobiologie

des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Arnold-Heller-Str. 3, 24105 Kiel“.

Die Bestimmung der Infektionsparameter C-reaktives Protein (CRP) und Leukozytenzahl aus dem Patientenblut erfolgte routinemäßig vor und nach jeder Operation in der Helios ENDO-Klinik Hamburg. Es handelt sich bei den untersuchten Parametern immer um das Serum-CRP, beziehungsweise die Serum-Leukozyten, auch wenn im Weiteren nicht immer explizit der Begriff „Serum-“ vorangestellt wird. Eine Bestimmung der Blutsenkungsgeschwindigkeit ist nicht Bestandteil der routinemäßigen Infektionsdiagnostik in unserem Haus und floss deshalb in dieser Untersuchung auch nicht als Bewertungskriterium mit ein. Als entsprechendes Minor-Kriterium wurde das Serum-CRP ohne Blutsenkungsgeschwindigkeit verwendet. Es wurde außerdem die histologische Untersuchung von Gewebeproben routinemäßig und unabhängig von dieser Studie durchgeführt.

Der Grenzwert für das C-reaktive Protein liegt beim von uns beauftragten Labor bei 5,0 mg/L. Werte über 5,0 mg/l sollen daher in dieser Untersuchung als pathologisch gewertet werden.

Zur statistischen Analyse des Patientenserums wurden die präoperativen Laborwerte am Tag der stationären Aufnahme herangezogen. Die Untersuchung erfolgte am „Institut für Klinische Chemie, Zentrallabor“, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Arnold-Heller-Str. 3, 24105 Kiel.

Es werden in dieser Studie die Begriffe „septisch“ und „aseptisch“ im Sinne von „infiziert“ und „nicht infiziert“ verwendet. Es soll damit explizit nicht das Vorliegen einer Sepsis als systemisches Krankheitsbild suggeriert werden.

3.3. Ein- und Ausschlusskriterien

Es wurden in diese Studie eingeschlossen:

- Patienten (m/w), die das 18. Lebensjahr abgeschlossen haben, ohne Alterslimitierung.
- Patienten mit uneingeschränkter Entscheidungsfähigkeit.
- Patienten, bei denen eine Indikation zur Revisionsoperation an Hüft- oder Kniegelenk bestand.

Es wurden von dieser Studie ausgeschlossen:

- Patienten, die an einer anderen klinischen Studie teilnehmen oder innerhalb der letzten 30 Tage teilgenommen haben.
- Schwangere oder stillende Patientinnen.
- Minderjährige Patienten.

Explizit kein Ausschlusskriterium waren lokale sowie systemische inflammatorische Begleiterkrankungen.

3.4. Statistische Analyse

Die der statistischen Auswertung zu Grunde liegende Daten sollen näher erläutert und die Methodik der durchgeführten Tests beschrieben werden.

3.4.1 Allgemeine Angaben zur statistischen Auswertung

Insgesamt standen die Daten von 168 Proben auswertbar zur Verfügung. Eingeschlossen wurden in die Studie 175 Patienten, wobei die Proben von sieben Patienten aus den folgenden Gründen nicht analysiert und deshalb bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden konnten:

1. Die Proben zweier Patienten wurden fehlerhaft beschriftet, so dass eine Zuordnung nicht sicher möglich war.

2. Die Proben von vier Patienten waren quantitativ nicht für eine Alpha-Defensin-Bestimmung ausreichend.
3. Die Probe eines Patienten wurde fehlerhaft gelagert (zu lange, nicht gekühlt).

Zur Deskription der metrischen Variablen werden folgende Größen verwendet (Bezeichnung in den Tabellen): Anzahl (N), Mittelwert (Mittel), Standardabweichung (SDA), Extrema (Min und Max), Quartile (25. und 75. Perzentile) und Median. Die Verteilung kategorialer Daten wird mittels absoluter und relativer Häufigkeiten beschrieben.

Das Alter wurde als Differenz zwischen dem Geburtsjahr und dem Zeitpunkt der Untersuchung berechnet. Bei einigen Patienten lagen die CRP und/oder Alpha-Defensin Werte unterhalb der Nachweisgrenze. Für die Analyse wurden diese Werte auf den Wert der Nachweisgrenze gesetzt (CRP: 0.3 mg/l, Alpha-Defensin: 0.1).

Zielsetzung der Studie war es, Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen prädiktiven Wert (Voraussagewert) für die Alpha-Defensin-Gruppe, gemessen an den Ergebnissen der MSIS-Kriterien zu ermitteln.

Im speziellen gibt die Sensitivität dieses Tests an, welcher Prozentsatz von infizierten Patienten als solche erkannt werden. Die Spezifität gibt an, wie viele Patienten ohne Infektion korrekt als nicht infiziert klassifiziert werden. Der positive Prädiktive Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an mit der eine Infektion vorliegt, wenn der Test positiv ausfällt, wohingegen der negative prädiktive Wert die Wahrscheinlichkeit anzeigt, mit der keine Infektion vorliegt, wenn der Test negativ ist.

Für die ermittelten Werte wurde standartmäßig ein Konfidenzintervall von 95% gewählt.

Für den Biomarker Alpha-Defensin gibt die Herstellerfirma „CD Diagnostics“ drei diagnostische Interpretationsbereiche an. Ein Alpha-Defensin Quotient von <0.9

definiert ein Untersuchungsmaterial ohne Keimbelastung, ein Quotient zwischen 0.9 bis <1 gilt als unklar bezüglich der Keimbelastung, ein Quotient ab 1.0 gilt als Indikator für eine keimbelastete Probe.

Da im untersuchten Kollektiv lediglich eine Probe (n=1; 0.6% des Gesamtkollektivs) im unklaren Bereich liegt, wurde in einer weiteren Einteilung in nur zwei Gruppen mit einem Cutoff von 1 eingeteilt. Hierbei wird bei Proben ab einem Quotienten von 1 von einer Infektion ausgegangen, die im Bereich unter 1 liegenden Ergebnisse werden als aseptisch gewertet.

Zum Vergleich der Lage der Verteilung einer metrischen Variablen von unabhängigen Gruppen wurde zunächst mit dem Shapiro-Wilk Test die Normalverteilung in den Gruppen überprüft. Wurde die Normalverteilungsannahme nicht abgelehnt ($p\text{-Wert} \geq 0.1$), so wurde der Vergleich mit dem t-Test durchgeführt. Im Falle der Ablehnung der Normalverteilungsannahme kam der Mann-Whitney-U Test zur Anwendung. Zum Vergleich der Häufigkeitsverteilungen zweier unabhängiger Gruppen wurde der exakte Test nach Fisher verwendet.

Alle Tests wurden zweiseitig gerechnet. Aufgrund des explorierenden Charakters dieser Studie werden die p-Werte rein deskriptiv interpretiert.

In dieser Studie soll unter anderem die Korrelation zwischen dichotomen und intervallskalierten Merkmalen hergestellt werden. Diese Sonderform des Pearson Korrelationskoeffizienten wird als „punktbiseriale Korrelation“ bezeichnet.

Ein Korrelationskoeffizient von +1 zeigt eine maximal positive Korrelation an, ein Wert von 0 zeigt an, dass keine Korrelation vorliegt, ein Korrelationskoeffizient von -1 zeigt eine maximal negative Korrelation an [78].

Hierbei sind die Werte von Leukozyten, CRP und Alpha-Defensin intervallskaliert. Das damit zur Korrelation untersuchte Merkmal „septisch/aseptisch“ der MSIS-Kriterien ist jedoch lediglich dichotom, da hier nur in zwei unterschiedliche qualitative Ausprägungen eingeteilt wird.

3.4.2 Analyse der „Receiver-Operating-Characteristics“-Kurve

Die ROC-Kurve („Receiver-Operating-Characteristics“-Kurve) beschreibt den Zusammenhang zwischen den richtig-positiven Fällen unter den Erkrankten und den falsch-positiven Fällen unter den Gesunden.

Die ROC-Kurve resultiert aus der Betrachtung mehrerer Paare von Sensitivität und Spezifität, die sich durch Variation des Schwellenwertes (Testtrennwert der ROC, Cutoff) ergeben. In einem „x/y“-Koordinatensystem wird die Sensitivität (y) gegen 1-Spezifität (x) aufgetragen. Die Kurve verläuft in einem Quadrat, das durch die Wertepaare (0,0) und (1,1) begrenzt ist. Sprechen hohe Werte für die Erkrankung, diskriminiert ein Test perfekt, wenn seine ROC-Kurve entlang der linken und oberen Seite des Quadrats verläuft. Eine Kurve eines vollständig uninformativen Tests hingegen verläuft entlang der Winkelhalbierenden [79, 80].

Ein perfekter Klassifikator erzeugt einen Punkt in der linken oberen Ecke des Diagramms, dieser entspricht einer Trefferquote von 100% (alle positiven Objekte werden als solche erkannt) und einer Falsch-Alarm-Rate von 0% (kein negatives Objekt wird als positiv klassifiziert) [81].

Die Fläche unterhalb der ROC-Kurve (AUC = "Area under the ROC curve") ist ein Maß für die Qualität des Klassifikators. Falls ein Klassifikator keine Entscheidungskraft aufweist, liegt die ROC-Kurve exakt auf der Diagonalen. Je besser die Klassifizierungsfähigkeit des Klassifikators desto höher ist der AUC-Wert. Der AUC-Wert kann als Wahrscheinlichkeit interpretiert werden, dass ein positiver Wert auch tatsächlich als solcher klassifiziert wird [81].

Die diagnostische Güte wurde unter Verwendung der Größen Sensitivität, Spezifität, negativer und positiver Voraussagewert sowie negativer und positiver Likelihoodquotient quantifiziert.

3.4.3 Der Testtrennwert (Cutoff) der ROC-Kurve

Der Testtrennwert der ROC ist ein Wert zur Klassifizierung von quantitativen Messergebnissen einer Stichprobe in diagnostisch positive bzw. negative Fälle.

Um zu einer Klassifizierung der Messergebnisse eines diagnostischen Testverfahrens in positiv, für nicht normale Werte, und negativ, für normale Werte, zu gelangen, wird der Wertebereich dichotomisiert. Dazu wird ein Schwellenwert gewählt, anhand dessen der Messbereich in zwei nicht überlappende Bereiche (positives/negatives Testresultat) geteilt wird [80] [82].

Man kann die optimale Klassifikator-Schwelle finden, in dem man jenen ROC-Wert sucht, der den größten Normalabstand zur Diagonale des Diagramms aufweist [81].

3.4.4 Der Youden-Index

Der Youden-Index ist ein Maß zur Beurteilung der Güte eines diagnostischen Tests und berechnet sich aus der Sensitivität und Spezifität [83].

Er kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen, wobei ein diagnostischer Test nur dann als vernünftig angesehen werden kann, wenn ein Youden-Index zwischen 0 und +1 erreicht wird. Je näher der Youden-Index bei +1 liegt, desto besser ist der vorliegende diagnostische Test in der Lage, Kranke und Gesunde voneinander zu trennen [83, 84].

Bei einer ROC-Analyse wird der Cutoff über den maximalen Youden-Index ermittelt [83].

Youden-Index = Sensitivität + Spezifität - 1

4. Ergebnisse

4.1. Beschreibung der grundlegenden Daten im Gesamtkollektiv

In diesem Abschnitt werden die grundlegenden Daten des ausgewerteten Gesamtkollektivs (n=168) beschrieben. Ein Wert zu CRP und zwei zu Leukozyten (bei insgesamt 2 Patienten) fehlen, oder liegen außerhalb des 95% Konfidenzintervalls und wurden deshalb für diese Analyse nicht berücksichtigt. Für die Einteilung in die MSIS-Gruppen waren die nicht verwertbaren Daten nicht relevant, da Serum-Leukozyten kein MSIS-Merkmal sind und das fehlende CRP als Minor-Kriterium in diesem Fall durch keinen annehmbaren Wert die Gruppenzugehörigkeit hätte ändern können.

Die nachfolgende Tabelle enthält die deskriptiven Kenngrößen der zu Grunde liegenden metrischen Variablen. Dies sind im Einzelnen das Patientenalter, der Inflammationsparameter CRP, die Leukozytenzahl, sowie der Biomarker Alpha-Defensin.

Abb.1 Deskription der grundlegenden metrischen Variablen

Variable	N	Mittel	SDA	Min	25 %-Perz.	Median	75 %-Perz.	Max.
Alter (Jahre)	168	70.9	9.8	30	65	74	77	90
CRP (mg/l)	167	11.002	21.154	0.30	1.93	3.95	10.10	161.00
Leukozyten (*10/S/9)	166	6.919	1.775	3.10	5.74	6.78	7.73	16.58
Alpha-Defensin (Quotient)	168	1.632	2.805	0.10	0.10	0.10	1.15	13.10

Aus der Tabelle lässt sich entnehmen, dass das untersuchte Kollektiv im statistischen Mittel 70.9 Jahre alt war. Der Medianwert liegt bei 74 Jahren, die

Standartabweichung beträgt 9.8 Jahre. Die 25% und 75% Perzentile liegen bei 65 beziehungsweise 77 Jahren.

4.2. Verteilung und Korrelation der verglichenen Infektionsparameter zu den MSIS-Kriterien „aseptisch“ und „septisch“

Zunächst soll gezeigt werden, wie die Werte von Alpha-Defensin, CRP und Leukozyten in Abhängigkeit von den MSIS-Kriterien verteilt sind.

Die nachfolgende Tabelle enthält die deskriptiven Kenngrößen von Alpha-Defensin, CRP und Leukozytenzahl in Abhängigkeit der MSIS-Kriterien, sowie die p-Werte des Gruppenvergleichs. Bei einigen Patienten lagen die CRP und/oder Alpha-Defensin Werte unterhalb der Nachweisgrenze. Für die Analyse wurden diese Werte auf den Wert der Nachweisgrenze gesetzt (CRP: 0.3, Alpha-Defensin: 0.1).

Abb.2 Verteilung von Alpha-Defensin, CRP und Leukozyten in den Gruppen „septisch“ und „aseptisch“

Variable	MSIS	N	Mittel	SDA	Min	25 %-Perz.	Median	75 %-Perz.	Max	p ¹⁾
<u>Alpha-Defensin</u>	aseptisch	127	0.264	0.824	0.10	0.10	0.10	0.10	7.50	<0.001
	septisch	41	5.870	2.522	0.50	4.20	5.90	7.10	13.10	
<u>CRP</u>	aseptisch	127	4.554	6.524	0.30	1.61	2.92	5.03	55.70	<0.001
	septisch	41	30.819	34.506	3.40	11.10	18.90	39.20	161.0	
<u>Leukozyten</u>	aseptisch	127	6.720	1.495	3.10	5.65	6.69	7.50	11.47	0.034
	septisch	41	7.527	2.358	3.69	6.15	7.15	8.27	16.58	

1) p-Wert des Mann-Whitney-U Tests

Die Verteilung der einzelnen Parameter ist in den Box-Plot Graphiken der Abbildungen 3 bis 5 visualisiert.

Abb. 3 Alpha-Defensin in Abhängigkeit zu den MSIS-Kriterien

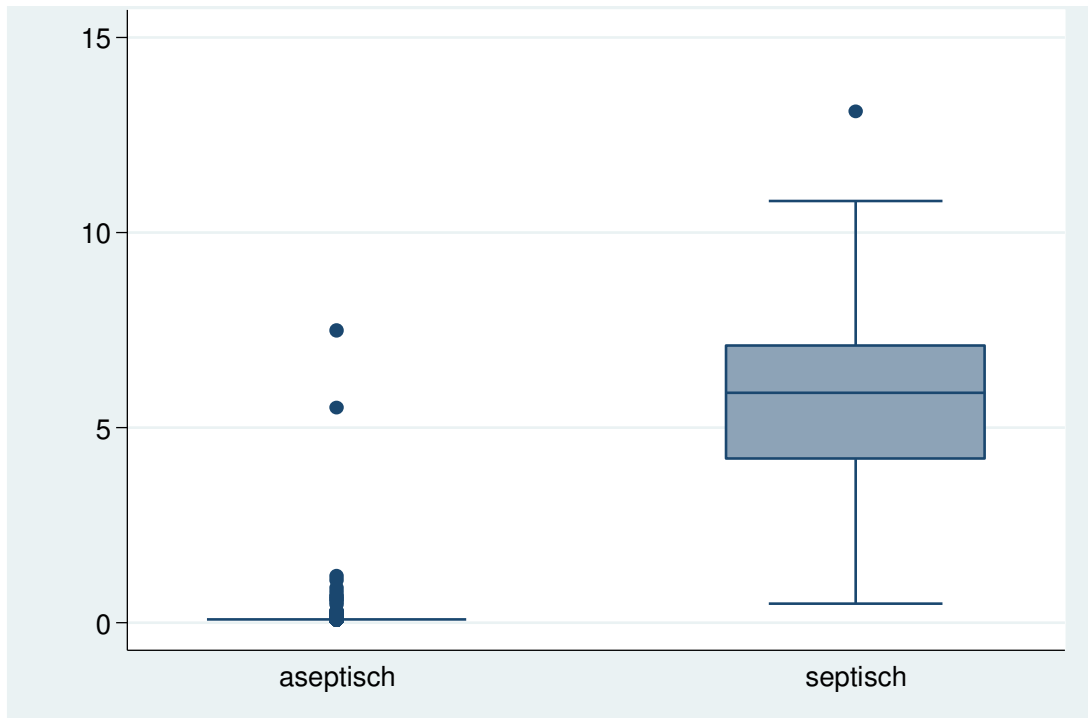


Abb. 4 CRP in Abhängigkeit zu den MSIS-Kriterien

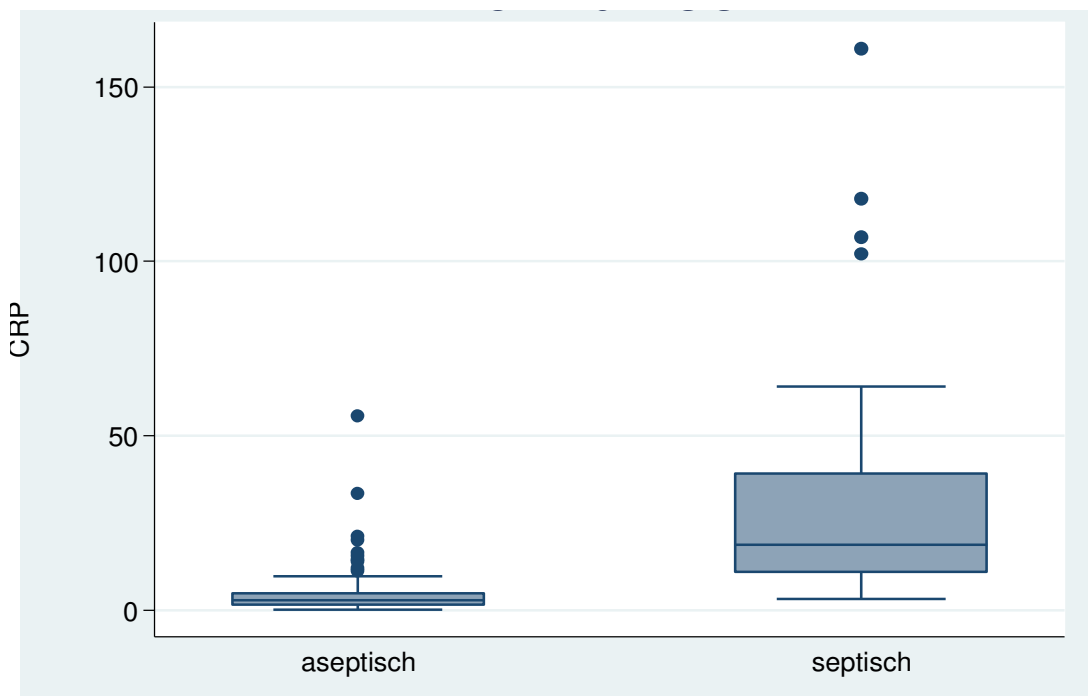
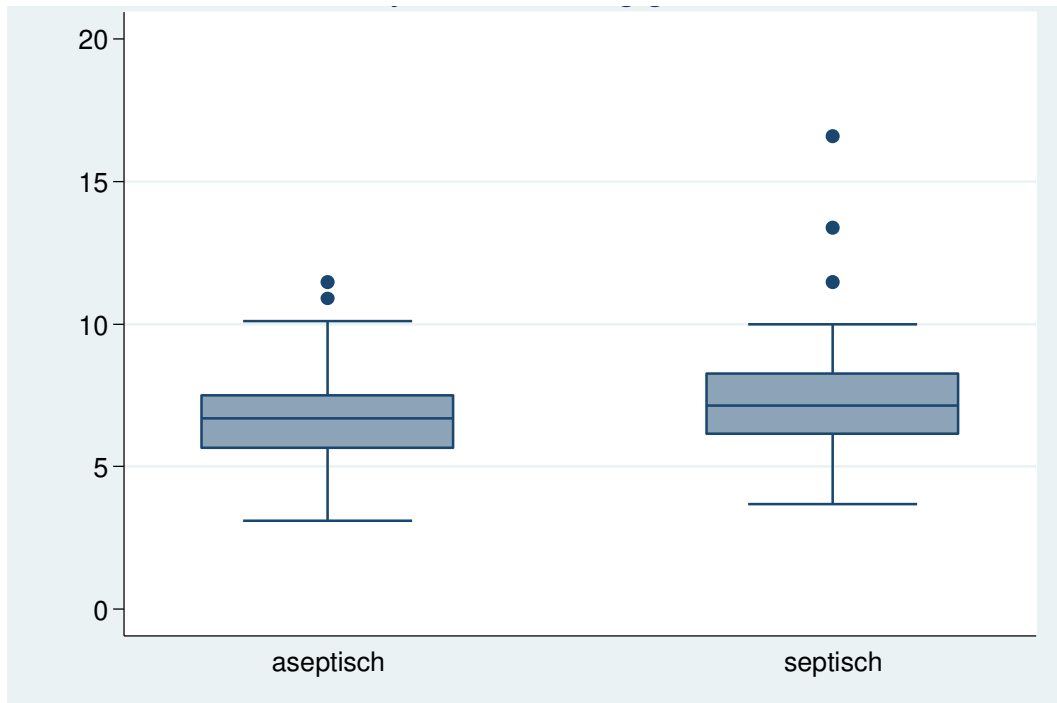


Abb. 5 Leukozyten in Abhängigkeit zu den MSIS-Kriterien



Die Box-Plot Graphiken können einen ersten Eindruck über die Verteilung der erhobenen Werte vermitteln. Es ist zu erwarten, dass ein guter Klassifikator für die Einteilung in „septisch“ und „aseptisch“, möglichst klar voneinander getrennte Kohorten erzeugt.

Es ist zu erkennen, dass die Werte für Leukozyten in den MSIS-Gruppen „septisch“ und „aseptisch“ deutliche Überschneidungen haben. Es wurde hier ein p-Wert von 0,034 (Abb. 2) ermittelt, was keine signifikante Unterscheidung der Gruppen „aseptisch“ und „septisch“ in Hinblick auf die Verteilung der Leukozyten nahelegt. Besser sieht die Verteilung bei den CRP-Werten aus. Am klarsten unterscheiden sich im Box-Plot die MSIS-Gruppen mit dem Klassifikator Alpha-Defensin. Beide weisen ein entsprechend hohes Signifikanzniveau ($p < 0,001$, Abb.2) bezüglich der Unterschiedlichkeit der Werteverteilung in den Gruppen „aseptisch“ und „septisch“ auf. Die expliziten Werte (Median, Standardabweichung, Quartile) sind in der Tabelle der Abbildung 2 aufgeführt.

Für die erhobenen Datenpaarungen wurden auf Grund des Verteilungsmusters dichotomes Merkmal (septisch/aseptisch) zu intervallskaliertem Merkmal (numerische Werte bei CRP, Leukozyten und Alpha-Defensin) die punktbiseriale Korrelation errechnet.

Es fanden sich folgende Korrelationskoeffizienten:

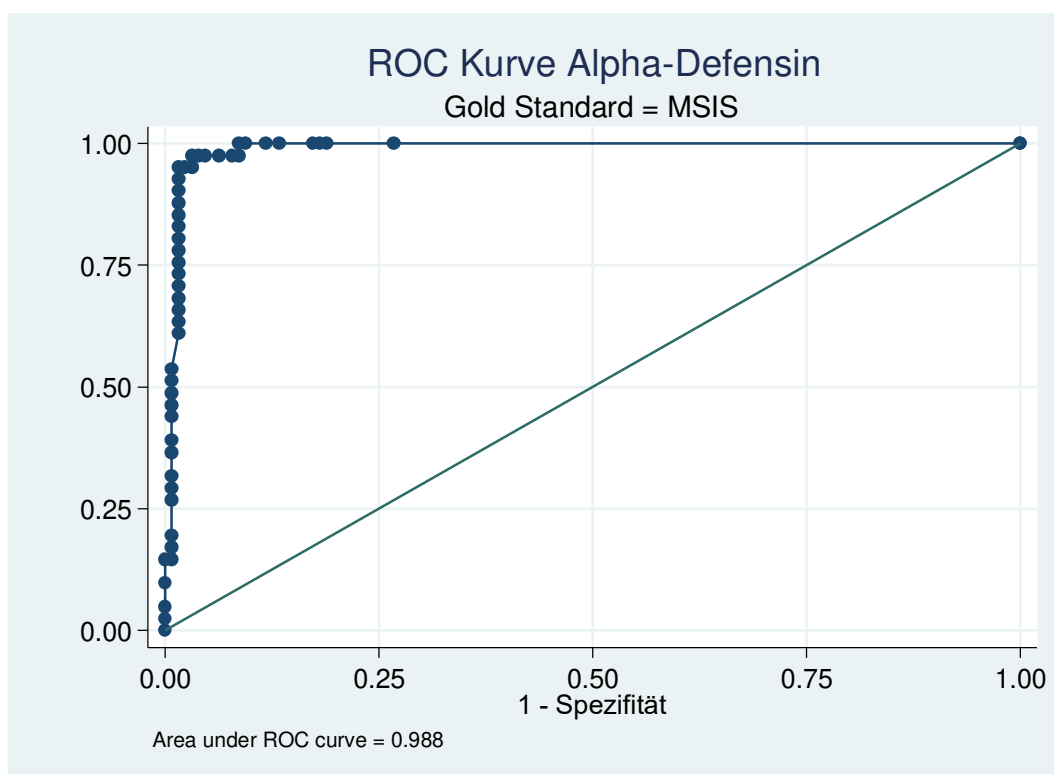
MSIS-Kriterien zu Alpha-Defensin	<u>0.861</u>	(n=168, p<0.001)
MSIS-Kriterien zu CRP	<u>0.536</u>	(n=167, p<0.001)
MSIS-Kriterien zu Leukozyten	<u>0.197</u>	(n=166, p=0.011)

4.3. Diagnostische Güte der untersuchten Parameter

4.3.1 Diagnostische Güte von Alpha-Defensin

Die nachfolgende Graphik zeigt die ROC-Kurve von Alpha-Defensin (Gold Standard ist MSIS).

Abb. 6 ROC Kurve Alpha-Defensin



Die AUC weist einen sehr hohen Wert von 0.988 auf (95%-Konfidenzintervall: [0.973;1.000]), was für eine große diagnostische Güte spricht. Die Koordinaten der Kurve werden in der folgenden Tabelle gelistet.

Abb. 7 Tabelle zur Diagnostischen Güte von Alpha-Defensin gemessen an den MSIS-Kriterien

≥ Cutoff	richtig krank	richtig gesund	falsch krank	falsch gesund	Anteil korrekt klassifiziert	Sensitivität	Spezifität	NPV	PPV	LR+	LR-	Youden Index
0.10	41	0	127	0	0.244	1.000	0.000		0.244	1.000		0,000
0.11	41	103	24	0	0.857	1.000	0.811	1.000	0.631	5.292	0.000	0,811
0.15	41	104	23	0	0.863	1.000	0.819	1.000	0.641	5.522	0.000	0,819
0.20	41	105	22	0	0.869	1.000	0.827	1.000	0.651	5.773	0.000	0,827
0.25	41	110	17	0	0.899	1.000	0.866	1.000	0.707	7.471	0.000	0,866
0.30	41	112	15	0	0.911	1.000	0.882	1.000	0.732	8.467	0.000	0,882
0.47	41	115	12	0	0.929	1.000	0.906	1.000	0.774	10.583	0.000	0,906
0.50	41	116	11	0	0.935	1.000	0.913	1.000	0.788	11.545	0.000	0,913
0.53	40	116	11	1	0.929	0.976	0.913	0.991	0.784	11.264	0.027	0,889
0.60	40	117	10	1	0.935	0.976	0.921	0.992	0.800	12.390	0.027	0,897
0.68	40	119	8	1	0.946	0.976	0.937	0.992	0.833	15.488	0.026	0,913
0.80	40	121	6	1	0.958	0.976	0.953	0.992	0.870	20.650	0.026	0,928
0.90	40	122	5	1	0.964	0.976	0.961	0.992	0.889	24.781	0.025	0,936
1.00	40	123	4	1	0.970	0.976	0.969	0.992	0.909	30.976	0.025	0,944
1.10	39	123	4	2	0.964	0.951	0.969	0.984	0.907	30.201	0.050	0,920
1.20	39	124	3	2	0.970	0.951	0.976	0.984	0.929	40.268	0.050	0,928
2.00	39	125	2	2	0.976	0.951	0.984	0.984	0.951	60.403	0.050	0,935
2.28	38	125	2	3	0.970	0.927	0.984	0.977	0.950	58.854	0.074	0,911
3.30	37	125	2	4	0.964	0.902	0.984	0.969	0.949	57.305	0.099	0,887
3.50	36	125	2	5	0.958	0.878	0.984	0.962	0.947	55.756	0.124	0,862
3.80	35	125	2	6	0.952	0.854	0.984	0.954	0.946	54.208	0.149	0,838
3.90	34	125	2	7	0.946	0.829	0.984	0.947	0.944	52.659	0.174	0,814
3.97	33	125	2	8	0.941	0.805	0.984	0.940	0.943	51.110	0.198	0,789
4.00	32	125	2	9	0.935	0.781	0.984	0.933	0.941	49.561	0.223	0,765
4.20	31	125	2	10	0.929	0.756	0.984	0.926	0.939	48.012	0.248	0,740
4.50	30	125	2	11	0.923	0.732	0.984	0.919	0.938	46.464	0.273	0,716
4.80	29	125	2	12	0.917	0.707	0.984	0.912	0.935	44.915	0.297	0,692
4.90	28	125	2	13	0.911	0.683	0.984	0.906	0.933	43.366	0.322	0,667
5.30	27	125	2	14	0.905	0.659	0.984	0.899	0.931	41.817	0.347	0,643
5.40	26	125	2	15	0.899	0.634	0.984	0.893	0.929	40.268	0.372	0,618
5.50	25	125	2	16	0.893	0.610	0.984	0.887	0.926	38.720	0.397	0,594
5.80	22	126	1	19	0.881	0.537	0.992	0.869	0.957	68.147	0.467	0,529
5.90	21	126	1	20	0.875	0.512	0.992	0.863	0.955	65.049	0.492	0,504
6.00	20	126	1	21	0.869	0.488	0.992	0.857	0.952	61.951	0.516	0,480
6.20	19	126	1	22	0.863	0.463	0.992	0.851	0.950	58.854	0.541	0,456
6.30	18	126	1	23	0.857	0.439	0.992	0.846	0.947	55.756	0.565	0,431
6.40	16	126	1	25	0.845	0.390	0.992	0.834	0.941	49.561	0.615	0,382
6.50	15	126	1	26	0.839	0.366	0.992	0.829	0.938	46.464	0.639	0,358
6.70	13	126	1	28	0.827	0.317	0.992	0.818	0.929	40.268	0.688	0,309
6.90	12	126	1	29	0.821	0.293	0.992	0.813	0.923	37.171	0.713	0,285
7.10	11	126	1	30	0.816	0.268	0.992	0.808	0.917	34.073	0.738	0,260
7.20	8	126	1	33	0.798	0.195	0.992	0.792	0.889	24.781	0.811	0,187
7.30	7	126	1	34	0.792	0.171	0.992	0.788	0.875	21.683	0.836	0,163
7.50	6	126	1	35	0.786	0.146	0.992	0.783	0.857	18.585	0.860	0,138
9.00	6	127	0	35	0.792	0.146	1.000	0.784	1.000		0.854	0,146
9.80	4	127	0	37	0.780	0.098	1.000	0.774	1.000		0.902	0,098
10.80	2	127	0	39	0.768	0.049	1.000	0.765	1.000		0.951	0,049
13.10	1	127	0	40	0.762	0.024	1.000	0.760	1.000		0.976	0,024
13.10	0	127	0	41	0.756	0.000	1.000	0.756			1.000	0,000

NPV = negativer Voraussagewert, PPV = positiver Voraussagewert, LR+ = positiver Likelihoodquotient, LR- = negativer Likelihoodquotient

In Abb. 7 werden hierfür Testtrennwerte (Cutoff) in aufsteigender Reihe, von 0,1 bis 13,1, etabliert und die hierunter fallenden Werte für „richtig krank“, „richtig

gesund“, „falsch krank“ und “falsch gesund” erfasst. Referenz für positive und negative Proben ist wie immer die Eingruppierung nach MSIS-Kriterien.

Der Youden-Index für das hier untersuchte Kollektiv liegt mit 0,944 am höchsten bei einem Alpha-Defensin-Wert von 1,0. Damit liegt auch in dem hier untersuchten Kollektiv der ideale Testtrennwert bei 1,0.

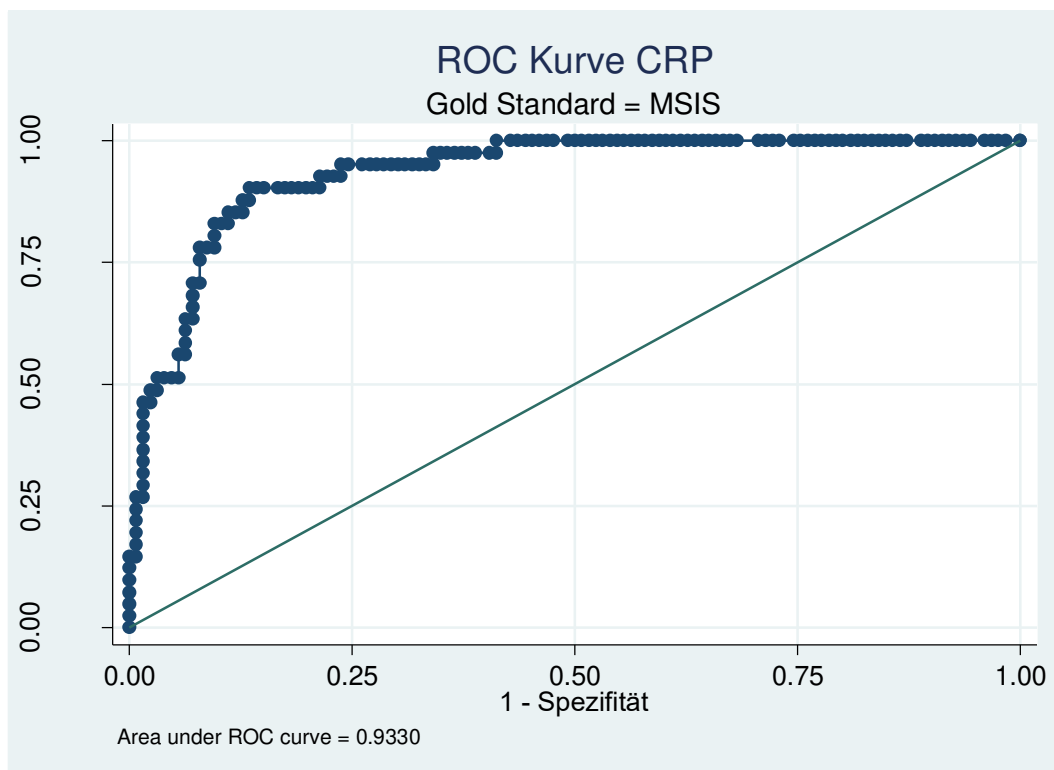
Für den bei diesem Test ebenfalls verwendeten Testtrennwert von 1.0 (S/CO) finden sich folgende Ergebnisse:

Sensitivität:	0.976
Spezifität:	0.969
Negativer Prädiktiver Wert	0.992
Positiver Prädiktiver Wert	0.909

4.3.2 Diagnostische Güte von Serum-CRP

Die nachfolgende Graphik zeigt die ROC-Kurve von CRP (Gold Standard ist MSIS).

Abb. 8 ROC Kurve CRP



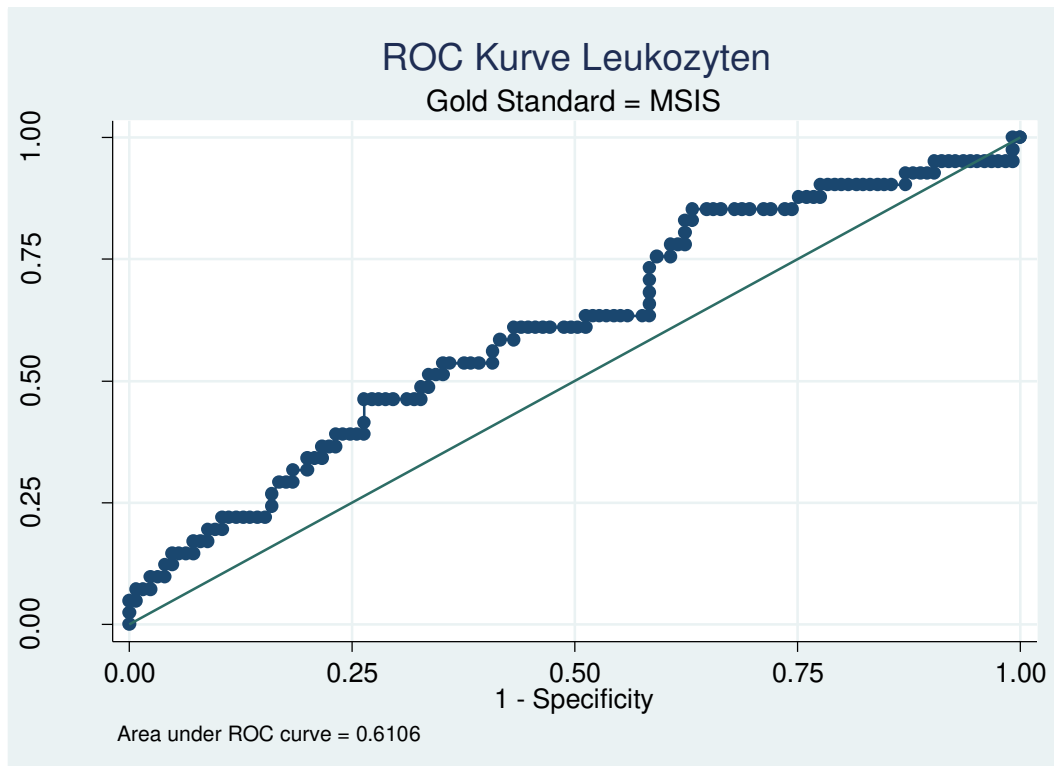
Die AUC weist ebenfalls einen hohen Wert von 0.933 auf (95%-Konfidenzintervall: [0.895;0.971]), was für eine große diagnostische Güte spricht.

Vergleicht man die AUC von Alpha-Defensin mit der von CRP, dann liefert der entsprechende Test einen p-Wert von 0.005. Damit ist die AUC von Alpha-Defensin signifikant größer als die von CRP.

4.3.3 Diagnostische Güte von Serum-Leukozyten

Die nachfolgende Graphik zeigt die ROC-Kurve der Leukozyten (Gold Standard ist MSIS).

Abb. 9 ROC Kurve Leukozyten



Die AUC weist mit 0.611 den niedrigsten Wert der drei Parameter auf (95%-Konfidenzintervall: [0.510;0.712]).

Vergleicht man die AUC von Alpha-Defensin mit der AUC der Leukozyten, dann liefert der entsprechende Test einen p-Wert kleiner 0.001. Damit ist die AUC von Alpha-Defensin signifikant größer als die der Leukozyten.

4.4. Einzelbetrachtung der falsch positiven und falsch negativen Ergebnisse

Gemessen am Referenzwert (MSIS-Kriterien) findet sind für Alpha-Defensin keine 100%ige Ergebnisgleichheit. Die Auswertung ergab vier falsch positive (Proben wurden fälschlicherweise als infiziert gewertet) und ein falsch negatives Ergebnis (Probe wurde fälschlicherweise als nicht infiziert gewertet).

Eine nähere Betrachtung der fünf Proben mit fehlender Deckungsgleichheit zeigt folgende Auffälligkeiten im histologischen Befund, beziehungsweise bereits makroskopische Auffälligkeiten des Situs, welche als Erklärung der falsch-positiven, als auch des falsch negativen Ergebnisses relevant sein könnten. Diese Auffälligkeiten werden in Kapitel 5 diskutiert und sollen hier lediglich ergänzend aufgeführt werden.

Abb. 10 Mögliche Gründe für die gefunden falsch negativen und falsch positiven Proben

MSIS	Alpha-Defensin Wert	Auffälligkeit
Aseptisch	1.1	Massive Metallose (Histologischer Befund)
Aseptisch	7.5	Massive Abriebsynovialitis (Histologischer Befund)
Aseptisch	1.2	Granulationsgewebe im Schaftbereich, grobe Lockerung
Aseptisch	5.5	Massive Metallose (Histologischer Befund)
Septisch	0.5	Fistelnder periprothetischer Infekt ohne intraoperativem Keimnachweis, Zustand nach Antibiotikatherapie

4.5. Alpha-Defensin Werte bei Patienten mit chronisch inflammatorischen Grunderkrankungen

Umgekehrt stellt sich die Frage, wie inflammatorische Grunderkrankungen die Testergebnisse der Alpha-Defensin Untersuchung beeinflusst haben könnten.

Im Folgenden sind die inflammatorischen Systemerkrankungen von Patienten deren Alpha-Defensin Werten gegenübergestellt.

Abb. 11 Alpha-Defensin Werte bei Patienten mit chronisch inflammatorischen Grunderkrankungen

Komorbiditäten	septisch/aseptisch nach MSIS-Kriterien	Alpha-Defensin
Rheumatoide Arthritis	Septisch	7.1
Psoriasis	Aseptisch	< 0.1
Chronisch Lymphatische Leukämie	Aseptisch	< 0.1
Psoriasis	Aseptisch	< 0.1
Lupus Erythematodes	Aseptisch	< 0.1
Irreguläre Antikörper	Aseptisch	< 0.1
Morbus Crohn	Aseptisch	< 0.1
Rheumatoide Arthritis	Aseptisch	< 0.1
Atopisches Ekzem	Aseptisch	0.2

4.6. Deskriptive Analyse der Keimbesiedlung

Von den ausgewerteten 168 Proben konnte bei 41 Proben eine positive Keimbesiedlung nachgewiesen werden. Es fanden sich darunter fünf Proben mit Mehrfachbesiedelung, so dass in der Summe 48 Keimbesiedelungen zur Auswertung standen.

Insgesamt konnten 15 verschiedene Bakterienstämme differenziert werden. Diese sind im Folgenden ihrer Häufigkeit entsprechend in absteigender Reihenfolge aufgelistet.

Staphylokokkus epidermidis	41.67 %	20 / 48 (Besiedlungen)
Staphylokokkus capitis	10.42 %	5 / 48
Staphylokokkus agalactiae	6.25 %	3 / 48
Enterokokkus faecalis	6.25 %	3 / 48
Staphylokokkus hominis	4.17 %	2 / 48
Propionibacterium avidum	4.17 %	2 / 48
Staphylokokkus lugdunensis	4.17 %	2 / 48
Propionibacter acnes	4.17 %	2 / 48
Staphylokokkus haemolyticus	2.17 %	1 / 48
Parvimonas micra	2.17 %	1 / 48
Pseudomonas aeruginosa	2.17 %	1 / 48
Enterokokkus faecium	2.17 %	1 / 48
Staphylokokkus caprae	2.17 %	1 / 48
Stenotrophomonas maltophiliae	2.17 %	1 / 48

Die Auflistung zeigt, dass im untersuchten Kollektiv die vier häufigsten gefundenen Keime aus der Gruppe der Staphylokokken stammen. Diese stellen mit 64.56% fast zwei Drittel aller gefundenen Keime.

Insgesamt sind 77.06% der Bakterienfunde mit Staphylokokken-Stämmen assoziiert. Sie stellen damit rund drei Viertel aller gefundenen Keime.

5. Diskussion

5.1. Interpretation der Ergebnisse

Es wurde der Biomarker Alpha-Defensin hinsichtlich seiner diagnostischen Güte als Indikator für Gelenkinfektionen untersucht und mit den Infektionsparametern Serum-CRP und Serum Leukozyten verglichen. Als Goldstandard wurden die Kriterien der MSIS (Musculoskeletal Infection Society) herangezogen. Zunächst wurde untersucht, wie die genannten Parameter in den Gruppen der Kriterien „septisch“ und „aseptisch“ verteilt sind und dies graphisch mittels Box-Plots dargestellt (Abb. 3 – 5). Um zu ermitteln, ob Alpha-Defensin, Serum-CRP und Serum-Leukozyten auch mit den MSIS-Merkmalen für „septisch“ und „aseptisch“ korrelieren, wurde eine biserialen Korrelationsanalyse durchgeführt. Der höchste Koeffizient fand sich für Alpha-Defensin (0,861), gefolgt vom Serum-CRP (0,536) und den Serum-Leukozyten (0,197). Im Anschluss wurde mit Hilfe einer ROC Kurvenanalyse die diagnostische Güte der drei verglichenen Parameter näher beleuchtet und graphisch dargestellt (Abb. 6, 8 und 9).

Die „Area under curve“ des ROC-Diagramms liegt mit 0,988 (95%-Konfidenzintervall: [0.973;1.000]) nahe dem erreichbaren Optimum, bei dem Sensitivität und Spezifität eines Tests jeweils bei 1.0 lägen. Dem Alpha-Defensin Test der Firma CD-Diagnostics kann mit einer hohen Sensitivität (0,976), als auch einer hohen Spezifität (0,969) die Eignung als gutes diagnostisches Instrument zur Detektion von Gelenkinfektionen zugesprochen werden.

Die AUC des Serum-CRP erreicht einen etwas niedrigeren Wert von 0,933 (95%-Konfidenzintervall: [0.895;0.971]). Die AUC der Serum-Leukozyten erreichte lediglich den Wert von 0,611 (95%-Konfidenzintervall: [0.510;0.712]) und weist somit den niedrigsten Wert der Gruppe auf. Im Vergleich von Alpha-Defensin, Serum-CRP und Serum-Leukozyten erwies sich somit das Alpha-Defensin als der Parameter mit der höchsten diagnostischen Güte in dieser Untersuchung.

Zur Ermittlung des optimalen Testtrennwertes wurden die Youden-Indices bestimmt, die ein Maximum von 0,944 bei einem Alpha-Defensin Wert von 1,0 erreichten. Die entsprechenden Werte sind in der Tabelle von Abb. 7 ersichtlich. Dies zeigt, dass sich der von der Firma CD-Diagnostics gewählte Cutoff von 1,0 auch bei dieser Untersuchung als optimaler Testtrennwert erwiesen hat.

Der hier untersuchte Alpha-Defensin Test kann, insbesondere vor dem Hintergrund der Tatsache, dass bisher kein zur Verfügung stehendes Testverfahren für sich genommen zu 100% verlässlich ist, einen Zugewinn an diagnostischer Sicherheit bieten.

Es müssen jedoch auch bei dieser Studie Einschränkungen bedacht werden, die im klinischen Alltag relevant sind und bei der Interpretation der Ergebnisse Berücksichtigung finden sollten.

5.2. Beeinflussung der Testergebnisse durch Begleiterkrankungen, Probengewinnung und Beobachtungszeitraum

Unter den vier falsch positiven Fällen befinden sich drei histologisch gesicherte massive Metallosen, sowie eine grobe Lockerung mit Granulationsgewebe (Abb. 10). Den vier genannten Fällen gemeinsam sind Inflammation und phagozytäre Abräumreaktionen von Leukozyten.

Es besteht derzeit noch Klärungsbedarf, inwiefern aseptische Entzündungsreaktionen und Leukozyten stimulierende Prozesse die Konzentration von Alpha-Defensin im Gelenk beeinflussen. In diesem Zusammenhang ist unter anderem eine Untersuchung von Okroj et al. [76] interessant, die speziell Patienten mit positivem Alpha-Defensin und begleitendem Metallabrieb untersuchten. Dort wurden 31 % der Alpha-Defensin positiven Proben als falsch positiv eingestuft. Eine Studie von Plate et al. [86] fand vor allem bei Patienten mit rheumatischen Grunderkrankungen falsch positive Testergebnisse. Eine solche Beobachtung konnte in der hier vorliegenden Studie allerdings nicht gemacht werden. Eher decken sich die Ergebnisse hier mit einer Untersuchung von Miyamae et al., die in einem Review

mit 1375 Fällen eine hohe diagnostische Güte von Alpha-Defensin fanden, obwohl inflammatorische Grunderkrankungen eingeschlossen wurden. [87]. In hier untersuchten Kollektiv wurden ebenfalls keine systemischen oder lokalen inflammatorischen Begleiterkrankungen ausgeschlossen.

Es konnten neun Patienten mit chronisch inflammatorischer Grunderkrankung identifiziert werden. Sowohl in der Alpha-Defensin Testung als auch nach MSIS-Definition imponierten acht der untersuchten Proben aseptisch und eine Probe septisch (Abb. 11). Die Ergebnisse waren somit in der Alpha-Defensin Gruppe und in den Gruppen mit Einteilung nach MSIS-Kriterien deckungsgleich. Keine der aseptischen Proben hatte einen relevanten Anstieg des Alpha-Defensin Wertes, trotz bestehender systemischer inflammatorischer Grunderkrankung.

In dieser Studie gibt es keinen Anhalt für eine relevante Beeinflussung der Alpha-Defensin Werte in den betroffenen Gelenken dieser Patienten. Unklar bleibt, ob die vorbestehende inflammatorische Grunderkrankung in den untersuchten Fällen auch eine Inflammation des untersuchten Gelenks bedingte.

Dennoch legen unsere Ergebnisse die Vermutung nahe, dass Alpha-Defensin anfällig für falsch positive Ergebnisse ist, sobald im Gelenk selbst inflammatorische Prozesse ohne Infektion vorliegen. Es muss bedacht werden, dass Alpha-Defensin von Leukozyten exprimiert wird und damit als Antwort des Immunsystems auf Pathogene und nicht als direkter Bestandteil eines Keimes zu verstehen ist. Inwiefern auch Metallpartikel oder generell Phagozytose von nekrotischem Material die Leukozyten zur Ausschüttung von Alpha-Defensin veranlasst, müsste in weiteren Studien geklärt werden. Ähnliche Einschränkungen für Alpha-Defensin fanden zum Beispiel auch Guenther et al. [66] bei der Verwendung des Leukozytenesterase Test. Hier waren Proben mit Metallabrieb ebenso auffällig falsch positiv und auch hier spricht der Test eben nicht direkt auf das Pathogen, sondern auf die von Leukozyten exprimierte Esterase an. Interessant wäre der Frage nachzugehen, inwieweit dieser Biomarker quantitativ unterschiedlich auf infektiöse und inflammatorische Prozesse reagiert. Anzumerken ist außerdem, dass Biomarker im Körper auch für gänzlich unterschiedliche Erkrankungen als Prädiktor gehandelt werden. So zeigten Jeong et al in einer Untersuchung von 2019, dass „Alpha-Defensin 6“

beispielsweise bei der Diagnostik von kolorektalen Tumoren von Bedeutung ist [88].

Anders hingegen sieht es beim direkten Keimnachweis und der PCR-Untersuchung aus. Hier wird das Pathogen selbst oder Bestandteile dessen nachgewiesen, so dass eine Leukozytenaktivität für das Testergebnis irrelevant sind.

Ein falsch negatives Ergebnis wurde aus einem Situs gewonnen, der auf Grund einer Fistelung (Major-Kriterium) als infiziert gilt. Die gewonnenen mikrobiologischen Proben waren nach längerer antibiotischer Vortherapie ohne Keimnachweis. Das Alpha-Defensin war zwar mit 0,5 nicht komplett unauffällig, ist jedoch auch nicht (mehr?) signifikant angestiegen. Möglicherweise ist die körpereigene Abwehrreaktion nach Drainage der Infektion durch die Fistel und längerer antibiotischen Vortherapie bereits abgeschwächt. Auch dies lässt sich jedoch durch diese Studie nicht feststellen. Ähnlich gelagerte Fälle sind bereits Gegenstand näherer Untersuchung.

In dieser Studie wurden die Proben zur Ermittlung der Alpha-Defensin Werte durch die geschlossene Gelenkkapsel der entsprechenden Gelenke gewonnen. Der Weg dorthin wurde im Rahmen der Operation unter maximal sterilen Bedingungen präpariert. In der täglichen Routine muss die Probenentnahme präoperativ erfolgen, da zur Operation bereits ein Ergebnis vorliegen sollte. Die Punktionsbedingungen sind dabei unter Umständen weniger optimal. Es müssen Fehlpunktionen einkalkuliert werden, oder die gewinnbare Aspiratmenge kann unzureichend sein, was den Nutzen dieses Tests relativiert. So fanden zum Beispiel Unter Ecker et al. [85] in einer Untersuchung zur Diagnostik von Infektionen an Schulterprothesen eine deutlich niedrigere Sensitivität für Alpha-Defensin als dies in den meisten Studien für Hüft- und Kniegelenkinfektionen der Fall war. Es wird hierfür unter anderem auch die Schwierigkeit, ausreichend Punktat aus diesem Gelenk zu gewinnen, mit verantwortlich gemacht. Insofern hat die Probengewinnung durchaus einen relevanten Einfluss auf die Anwendbarkeit dieser Testung im klinischen Alltag.

Ein weiterer Faktor bei der Bewertung der Proben auf eine vorliegende Infektion ist der Nachweis von Keimen in den Proben. Da der Keimnachweis als Major-Kriterium der MSIS-Kriterien gilt, muss hier zumindest darauf hingewiesen werden, dass ein Beobachtungszeitraum der bakteriologischen Proben von zwei Wochen eventuell langsam wachsende Bakterienstämme, wie beispielsweise *Cutibacterium acnes*, nur unzureichend erfasst. Hier könnten Proben nach zwei Wochen Bebrütung als falsch negativ erfasst worden sein. Dies könnte zu einer Fehlbewertung führen und somit das Evaluierungsergebnis des Alpha-Defensin Tests verfälschen.

Im verwendeten Kriterienkatalog der MSIS wird als ein Minor-Kriterium der Anstieg der Blutsenkungsgeschwindigkeit und der Anstieg des Serum-CRP definiert. Da im klinischen Alltag unserer Klinik die Blutsenkungsgeschwindigkeit nicht bestimmt wird, kam hier der alleinige Anstieg des CRP-Wertes in den pathologischen Bereich als entsprechendes Minor-Kriterium zur Anwendung. Grund für die nicht durchgeführte Erhebung ist eine räumliche Auslagerung fast aller Laboruntersuchungen, die eine Bestimmung der zeitsensiblen Blutsenkungsgeschwindigkeit nicht mehr ermöglicht.

5.3. Kriterien der MSIS-Definition für Gelenkinfektionen im Wandel

Die Kriterien der MSIS zur Diagnose einer Gelenkinfektion sind in ihrer Definition dem Wandel wissenschaftlicher Erkenntnisse unterlegen und müssen ständig dem aktuellen Wissensstand angepasst werden. Die Ergebnisse vieler Studien zur Relevanz von Biomarkern bei der Diagnostik von Gelenkinfektionen, speziell für Alpha-Defensin, kommen in der Mehrzahl zu guten oder sehr guten Ergebnissen in Hinsicht auf Sensitivität und Spezifität. Sie nehmen inzwischen Einfluss auf den Kriterienkatalog der MSIS selbst. Auch andere vielversprechende Testverfahren könnten in Zukunft mehr Einfluss auf diesen Kriterienkatalog nehmen. Insofern ist der derzeitige Goldstandard auch nur der Goldstandard unserer Zeit.

Dies wiederum relativiert die Aussagekraft der hier gewonnenen statistischen Ergebnisse, da ein Vergleich mit einem zu einhundert Prozent sicheren Diagnostikkatalog heute noch nicht möglich ist.

5.4. Limitationen der Studie

Die Ergebnisse dieser Studie müssen im Lichte einiger Einschränkungen betrachtet werden.

So ist die statistische Aussagekraft eines Tests nur so gut, wie der zum Vergleich heran gezogene Goldstandard verlässlich ist. Da die MSIS-Kriterien selbst zwar als das zuverlässigste diagnostische Mittel zur Detektion von Gelenkinfektionen gelten, aber dennoch auch nicht völlige diagnostische Sicherheit bieten können, sind die hier gewonnen Ergebnisse in ihrer Aussagekraft dementsprechend zu relativieren.

Des Weiteren ist die Gesamtzahl der untersuchten Proben zwar im Vergleich mit anderen Studien zur Thematik Alpha-Defensin noch recht hoch, aber im Vergleich zur Untersuchung anderer, vor allem schon länger erprobter Parameter immer noch eher niedrig. Hier werden in Zukunft mit zunehmender Anwendung von Alpha-Defensin Tests in der klinischen Routine sicher größere Studien und Metaanalysen zu diesem Thema noch aussagekräftiger sein.

Dies trifft insbesondere über gemachte Beobachtungen zu Untergruppen des untersuchten Patientenklientels zu. Die in dieser Studie gemachten Beobachtungen zur Alpha-Defensin Werten bei chronisch inflammatorischen Grunderkrankungen, aber auch zu aktiven Inflammationen im Gelenk durch Metallabrieb oder synovialitischer Begleitreaktion bei groben Prothesenlockerungen, können auf Grund der niedrigen Fallzahl keine valide Aussage machen. Die Fragestellung war hierauf auch nicht ausgerichtet. Auch hier müssten weitere Untersuchungen zu den gefundenen Auffälligkeiten durchgeführt werden.

6. Zusammenfassung

Zur Diagnostik von Gelenkinfektionen werden über die letzten Jahrzehnte diverse lokale wie systemische Infektions- und Inflammationsparameter herangezogen. Leider konnte bisher kein Parameter für sich alleine genommen eine zufriedenstellende diagnostische Sicherheit bieten. Einige Parameter sind wenig spezifisch, wie zum Beispiel das C-reaktive Protein, das nicht nur bei Infektionen, sondern auch bei Inflammation nicht infektiöser Genese reagiert. Andere Parameter, wie die Leukozytenzahl im Serum, oder die Blutsenkungsgeschwindigkeit reagieren meist erst spät, wenn bereits eine systemische Beteiligung vorliegt [5, 10-27]. Auch der direkte Nachweis von Erregern aus dem Gelenkpunktat ist auf Grund von Probenlagerung, antibiotischer Vorbehandlung, punktionstechnischen Schwierigkeiten, Kontamination der Proben durch Hautkeime, oder nicht ausreichendem Bebrütungszeitraum problematisch [15, 21, 30, 31]. Aus diesem Grund hat die Musculoskeletal Infection Society (MSIS) einen Katalog von Major- und Minor-Kriterien erstellt, der in der Zusammenschau mehrerer Einzelfaktoren ein klareres Bild über den Infektionsstatus eines Gelenkes verschaffen soll. Dieser Kriterienkatalog gilt heute als Goldstandard in der Infektionsdiagnostik von Gelenkinfektionen, ist aber in seiner Zusammensetzung dem Wandel der Zeit, bzw. neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse unterworfen [37, 38].

In den letzten Jahren haben sich zunehmend Verfahren etabliert, die einen feineren Nachweis von infektiösen Prozessen direkt aus dem Gelenkpunktat ermöglichen. Mittels PCR-Untersuchung können genetische Fragmente der Bakterien selbst dann noch nachgewiesen werden, wenn nach antibiotischer Behandlung ein Keimwachstum nicht mehr nachzuweisen ist. Auf der anderen Seite etablieren sich Verfahren welche die körpereigene Abwehrreaktion, insbesondere die der Leukozyten, ins Visier nehmen. Hier sind neben der klassischen Leukozytenzählung auch der Nachweis von Leukozytenesterase zu nennen [66, 67]. In jüngster Zeit geraten zunehmend von Leukozyten exprimierte antimikrobielle Peptide (Biomarker) in den Fokus, die in der Gruppe der Defensine zusammengefasst werden. Ein vielversprechender Biomarker, für den auch bereits marktfähige Tests in Umlauf sind, ist das Alpha-Defensin.

In dieser Studie wurde ein ELISA Test der Firma „CD-Diagnostics“ hinsichtlich Sensitivität, Spezifität, sowie negativem und positivem prädiktivem Wert untersucht. Hierfür wurden 175 Proben (Gelenkpunktate) von Patienten mit Revisionsoperationen an Hüft- oder Kniegelenk in zwei Kohorten eingeteilt (infiziert – nicht infiziert) und an den Kriterien der MSIS für Gelenkinfektionen abgeglichen. Es handelt sich um eine non-invasive, monozentrische prospektive Studie. 175 Proben wurden eingeschlossen, davon konnten 168 Proben ausgewertet werden. Sieben Proben mussten wegen Fehllagerung, fehlerhafter Beschriftung oder nicht ausreichender Aspiratmenge von der Auswertung ausgeschlossen werden. Erhoben wurden neben dem Alpha-Defensin Wert auch die Daten, die zur Bestimmung der MSIS-Kriterien vonnöten waren. Die hierfür erhobenen Parameter sind Bestandteil der Routinediagnostik bei Revisionsoperationen in der Helios ENDO-Klinik Hamburg, an der diese Studie durchgeführt wurde. Eine Ausnahme bildet die Bestimmung der Blutsenkungsgeschwindigkeit. Diese ist aus technischen Gründen nicht Teil der Routinediagnostik von Gelenkinfektionen in unserem Haus und floss daher auch nicht als Bewertungskriterium mit in diese Studie ein.

Die Punktion der Gelenke erfolgte intraoperativ nach Hautinzision und Präparation bis zur geschlossenen Gelenkkapsel, durch welche dann zur Probenentnahme punktiert wurde. Von einer zusätzlichen medizinischen Belastung der Patienten kam es durch diese Untersuchung nicht.

Es konnte für den hier untersuchten Test eine hohe diagnostische Güte festgestellt werden. Die „Area under Curve“ der ROC-Kurve weist einen sehr hohen Wert von 0.988 auf (95%-Konfidenzintervall: [0.973;1.000]).

Die statistische Analyse der gewonnenen Ergebnisse ergab für den untersuchten Alpha-Defensin Test eine Sensitivität von 0.976, eine Spezifität von 0.969, einen negativen prädiktiven Wert von 0,992 und einen positiven prädiktiven Wert von 0.909, jeweils innerhalb des 95% Konfidenzintervalls.

Es konnten in dieser Studie weitere Beobachtungen gemacht werden. Der gewählte Cutoff, also der Wert, ab dem eine Probe auf Grund ihrer Alpha-

Defensin Konzentration als infektiös gewertet wird, wird vom Hersteller des Tests mit ≥ 1.0 (S/CO) angegeben [75]. Im von uns untersuchten Kollektiv konnte ein maximaler Youden-Index von 0,944 bei einem Testtrennwert von 1,0 ermittelt werden. Damit erwies sich auch bei unserem Kollektiv der vom Hersteller gewählte Testtrennwert als idealer Schwellenwert.

Unter den vier falsch positiven Fällen befinden sich drei histologisch gesicherte massive Metallosen sowie eine grobe Lockerung mit Granulationsgewebe.

Den Fällen gemeinsam sind phagozytäre Abräumreaktionen von Leukozyten.

Die Fälle verbindend ist eine leukozytäre Aktivierung ohne floriden Gelenkinfekt. Bedenkt man, dass Alpha-Defensin ein von Leukozyten exprimiertes Peptid ist und kein vom Erreger direkt freigesetzter Marker, wird klar, dass die Bestimmung von Alpha-Defensin primär eine Erfassung von leukozytärer Aktivierung ist. So wäre erklärlich, dass erst Konzentrationen oberhalb eines bestimmten Grenzwertes für eine Infektion sprächen. Falsch positive Ergebnisse dieser Studie werfen jedoch die Frage auf, welche weitere (Inflammatorische?) Prozesse im Gelenk die Ausschüttung von Alpha-Defensin begünstigen und damit die Güte des Testverfahrens beeinträchtigen könnten. Ähnliche Einschränkungen wurden bereits für den Leukozytenesterasetest beschrieben [66]. Es ist jedoch klarzustellen, dass der hier präsentierte Pathomechanismus nur spekulativer Natur ist, da eine Beweisführung mit dem zu Grunde liegenden Studiendesign nicht möglich ist.

Acht Patienten, die anamnestisch durch chronisch inflammatorische Grunderkrankungen auffielen und entsprechend der MSIS-Kriterien keinen Gelenkinfekt aufwiesen, blieben im untersuchten Kollektiv hinsichtlich ihres Alpha-Defensin Wertes allesamt unauffällig. Daher kann durch diese Studie kein Zusammenhang zwischen erhöhten Alpha-Defensin Werten und dem Vorliegen einer chronisch inflammatorischen Grunderkrankung gefunden werden. Zu erwähnen ist, dass hier nicht erfasst wurde, ob bei diesen Patienten zusätzlich eine lokale inflammatorische Reizung im untersuchten Gelenk vorlag. Es wurde lediglich in der Anamnese eine inflammatorische Grunderkrankung festgestellt. Eine nähere Untersuchung erfolgte nicht, da dies nicht die Fragestellung dieser

Studie war. Die hierzu veröffentlichten Studien kommen hinsichtlich der Relevanz begleitender inflammatorischer Erkrankungen zu unterschiedlichen Ergebnissen [86] [87].

Zusammenfassend kann diese Studie die hohe diagnostische Güte des untersuchten Testverfahrens bestätigen. Es scheint zudem empfehlenswert, Patienten mit lokalen, Leukozyten stimulierenden Erkrankungen einer weiteren Diagnostik, möglicherweise mit direktem Keimnachweis oder einer PCR-Untersuchung zu unterziehen.

Das Vorgehen der MSIS, einen Katalog mit unterschiedlichen Minor- und Major-Kriterien einer verlässlichen Diagnostik von Gelenkinfektionen zu Grunde zu legen und nicht auf ein einzelnes Testverfahren zu vertrauen, scheint nach wie vor sinnvoll. Unter Berücksichtigung der erwähnten Einschränkungen empfiehlt die hohe diagnostische Güte dieses überprüften Tests jedoch dessen Einsatz als sinnvolle Ergänzung zu bereits etablierten Testverfahren. In einem neuen Ansatz zur Diagnostik von periprothetischen Knie- und Hüftgelenksinfektionen aus 2018 wurde die Testung von Alpha-Defensin inzwischen in den Katalog der Minor-Kriterien aufgenommen [38].

7. Literatur

1. CHARNLEY, J., *A CLEAN-AIR OPERATING ENCLOSURE*. Br J Surg, 1964. **51**: p. 202-5.
2. Clohisy, J.C., et al., *Reasons for revision hip surgery: a retrospective review*. Clin Orthop Relat Res, 2004(429): p. 188-92.
3. Hernigou, P., et al., *Treatment of infected hip arthroplasty*. Open Orthop J, 2010. **4**: p. 126-31.
4. Leone, J.M. and A.D. Hanssen, *Management of infection at the site of a total knee arthroplasty*. J Bone Joint Surg Am, 2005. **87**(10): p. 2335-48.
5. Spangehl, M.J., et al., *Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties*. J Bone Joint Surg Am, 1999. **81**(5): p. 672-83.
6. Vessely, M.B., et al., *The Chitranjan Ranawat Award: Long-term survivorship and failure modes of 1000 cemented condylar total knee arthroplasties*. Clin Orthop Relat Res, 2006. **452**: p. 28-34.
7. Shanmugasundaram, S., et al., *Evaluation and Management of Periprosthetic Joint Infection-an International, Multicenter Study*. HSS J, 2014. **10**(1): p. 36-44.
8. Deirmengian, C., et al., *Diagnosing periprosthetic joint infection: has the era of the biomarker arrived?* Clin Orthop Relat Res, 2014. **472**(11): p. 3254-62.
9. Bozic, K.J., et al., *The epidemiology of revision total knee arthroplasty in the United States*. Clin Orthop Relat Res, 2010. **468**(1): p. 45-51.
10. Barrack, R.L. and W.H. Harris, *The value of aspiration of the hip joint before revision total hip arthroplasty*. J Bone Joint Surg Am, 1993. **75**(1): p. 66-76.
11. Della Valle, C.J., et al., *Preoperative testing for sepsis before revision total knee arthroplasty*. J Arthroplasty, 2007. **22**(6 Suppl 2): p. 90-3.
12. Hanssen, A.D. and J.A. Rand, *Evaluation and treatment of infection at the site of a total hip or knee arthroplasty*. Instr Course Lect, 1999. **48**: p. 111-22.

13. Hughes, S.P., et al., *Infection following total hip replacement and the possible prophylactic role of cephaloridine*. J R Coll Surg Edinb, 1978. **23**(1): p. 9-12.
14. Mulcahy, D.M., G.C. Fenelon, and D.P. McInerney, *Aspiration arthrography of the hip joint. Its uses and limitations in revision hip surgery*. J Arthroplasty, 1996. **11**(1): p. 64-8.
15. Müller, M., et al., *Diagnosis of periprosthetic infection following total hip arthroplasty--evaluation of the diagnostic values of pre- and intraoperative parameters and the associated strategy to preoperatively select patients with a high probability of joint infection*. J Orthop Surg Res, 2008. **3**: p. 31.
16. Pandey, R., A.R. Berendt, and N.A. Athanasou, *Histological and microbiological findings in non-infected and infected revision arthroplasty tissues. The OSIRIS Collaborative Study Group. Oxford Skeletal Infection Research and Intervention Service*. Arch Orthop Trauma Surg, 2000. **120**(10): p. 570-4.
17. Pandey, R., E. Drakoulakis, and N.A. Athanasou, *An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues*. J Clin Pathol, 1999. **52**(2): p. 118-23.
18. Parvizi, J., et al., *Management of periprosthetic joint infection: the current knowledge: AAOS exhibit selection*. J Bone Joint Surg Am, 2012. **94**(14): p. e104.
19. Parvizi, J., et al., *Diagnosis of infected total knee: findings of a multicenter database*. Clin Orthop Relat Res, 2008. **466**(11): p. 2628-33.
20. Peersman, G., et al., *Infection in total knee replacement: a retrospective review of 6489 total knee replacements*. Clin Orthop Relat Res, 2001(392): p. 15-23.
21. Spangehl, M.J., et al., *Diagnosis of infection following total hip arthroplasty*. Instr Course Lect, 1998. **47**: p. 285-95.
22. Squire, M.W., C.J. Della Valle, and J. Parvizi, *Preoperative diagnosis of periprosthetic joint infection: role of aspiration*. AJR Am J Roentgenol, 2011. **196**(4): p. 875-9.

23. Tietjen, R., F.E. Stinchfield, and C.B. Michelsen, *The significance of intracapsular cultures in total hip operations*. Surg Gynecol Obstet, 1977. **144**(5): p. 699-702.
24. Tigges, S., et al., *Hip aspiration: a cost-effective and accurate method of evaluating the potentially infected hip prosthesis*. Radiology, 1993. **189**(2): p. 485-8.
25. Toulson, C., et al., *Treatment of infected total hip arthroplasty with a 2-stage reimplantation protocol: update on "our institution's" experience from 1989 to 2003*. J Arthroplasty, 2009. **24**(7): p. 1051-60.
26. Tsukayama, D.T., V.M. Goldberg, and R. Kyle, *Diagnosis and management of infection after total knee arthroplasty*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-A Suppl 1**: p. S75-80.
27. Tunney, M.M., et al., *Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem*. J Bone Joint Surg Br, 1998. **80**(4): p. 568-72.
28. Vanderstappen, C., et al., *Intra-articular versus serum C-reactive protein analysis in suspected periprosthetic knee joint infection*. Acta Orthop Belg, 2013. **79**(3): p. 326-30.
29. Greidanus, N.V., et al., *Use of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein level to diagnose infection before revision total knee arthroplasty. A prospective evaluation*. J Bone Joint Surg Am, 2007. **89**(7): p. 1409-16.
30. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
31. Ince, A., et al., *Is "aseptic" loosening of the prosthetic cup after total hip replacement due to nonculturable bacterial pathogens in patients with low-grade infection?* Clin Infect Dis, 2004. **39**(11): p. 1599-603.
32. Nodzo, S.R., et al., *Conventional diagnostic challenges in periprosthetic joint infection*. J Am Acad Orthop Surg, 2015. **23 Suppl**: p. S18-25.
33. Rieber, H., et al., *Periprosthetic joint infection caused by anaerobes. Retrospective analysis reveals no need for prolonged cultivation time if*

- sensitive supplemented growth media are used. Anaerobe, 2018. 50: p. 12-18.*
34. Berbari, E.F., et al., *Culture-negative prosthetic joint infection. Clin Infect Dis, 2007. 45(9): p. 1113-9.*
 35. Della Valle, C.J., J.D. Zuckerman, and P.E. Di Cesare, *Periprosthetic sepsis. Clin Orthop Relat Res, 2004(420): p. 26-31.*
 36. Fitzgerald, R.H., et al., *Bacterial colonization of wounds and sepsis in total hip arthroplasty. J Bone Joint Surg Am, 1973. 55(6): p. 1242-50.*
 37. Parvizi, J., et al., *New definition for periprosthetic joint infection: from the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. Clin Orthop Relat Res, 2011. 469(11): p. 2992-4.*
 38. Parvizi, J., et al., *The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. J Arthroplasty, 2018. 33(5): p. 1309-1314.e2.*
 39. Ghanem, E., et al., *Cell count and differential of aspirated fluid in the diagnosis of infection at the site of total knee arthroplasty. J Bone Joint Surg Am, 2008. 90(8): p. 1637-43.*
 40. Trampuz, A., et al., *Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. Am J Med, 2004. 117(8): p. 556-62.*
 41. Bedair, H., et al., *The Mark Coventry Award: diagnosis of early postoperative TKA infection using synovial fluid analysis. Clin Orthop Relat Res, 2011. 469(1): p. 34-40.*
 42. Nazzal, D., S. Yasin, and K. Abu-Elteen, *A rapid PCR-based method for identification of four important Candida species. New Microbiol, 2005. 28(3): p. 245-50.*
 43. Ortu, S., et al., *Rapid detection and identification of Mycobacterium tuberculosis by Real Time PCR and Bactec 960 MIGT. New Microbiol, 2006. 29(1): p. 75-80.*
 44. Bernard, L., et al., *Value of preoperative investigations in diagnosing prosthetic joint infection: retrospective cohort study and literature review. Scand J Infect Dis, 2004. 36(6-7): p. 410-6.*
 45. Gallo, J., et al., *Culture and PCR analysis of joint fluid in the diagnosis of prosthetic joint infection. New Microbiol, 2008. 31(1): p. 97-104.*

46. Rak, M., et al., *Comparison of molecular and culture method in diagnosis of prosthetic joint infection*. FEMS Microbiol Lett, 2013. **343**(1): p. 42-8.
47. Rak, M., et al., *Identification of the same species in at least two intra-operative samples for prosthetic joint infection diagnostics yields the best results with broad-range polymerase chain reaction*. Int Orthop, 2015. **39**(5): p. 975-9.
48. Bémer, P., et al., *Evaluation of 16S rRNA gene PCR sensitivity and specificity for diagnosis of prosthetic joint infection: a prospective multicenter cross-sectional study*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(10): p. 3583-9.
49. Gomez, E., et al., *Prosthetic joint infection diagnosis using broad-range PCR of biofilms dislodged from knee and hip arthroplasty surfaces using sonication*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(11): p. 3501-8.
50. Jacovides, C.L., et al., *Successful identification of pathogens by polymerase chain reaction (PCR)-based electron spray ionization time-of-flight mass spectrometry (ESI-TOF-MS) in culture-negative periprosthetic joint infection*. J Bone Joint Surg Am, 2012. **94**(24): p. 2247-54.
51. Ryu, S.Y., et al., *Low sensitivity of periprosthetic tissue PCR for prosthetic knee infection diagnosis*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014. **79**(4): p. 448-53.
52. Suda, A.J., et al., *Diagnosis of periprosthetic joint infection using alpha-defensin test or multiplex-PCR: ideal diagnostic test still not found*. Int Orthop, 2017. **41**(7): p. 1307-1313.
53. Parvizi, J., et al., *Mark B. Coventry Award: synovial C-reactive protein: a prospective evaluation of a molecular marker for periprosthetic knee joint infection*. Clin Orthop Relat Res, 2012. **470**(1): p. 54-60.
54. Parvizi, J., J.C. McKenzie, and J.P. Cashman, *Diagnosis of periprosthetic joint infection using synovial C-reactive protein*. J Arthroplasty, 2012. **27**(8 Suppl): p. 12-6.
55. Tetreault, M.W., et al., *Is synovial C-reactive protein a useful marker for periprosthetic joint infection?* Clin Orthop Relat Res, 2014. **472**(12): p. 3997-4003.

56. Deirmengian, C.A. and M.D. Wongworawat, *Editor's spotlight/take 5: diagnosing periprosthetic joint infection: has the era of the biomarker arrived?* Clin Orthop Relat Res, 2014. **472**(11): p. 3250-3.
57. Bilgen, O., et al., *C-reactive protein values and erythrocyte sedimentation rates after total hip and total knee arthroplasty.* J Int Med Res, 2001. **29**(1): p. 7-12.
58. Larsson, S., U. Thelander, and S. Friberg, *C-reactive protein (CRP) levels after elective orthopedic surgery.* Clin Orthop Relat Res, 1992(275): p. 237-42.
59. St John, A., et al., *The use of urinary dipstick tests to exclude urinary tract infection: a systematic review of the literature.* Am J Clin Pathol, 2006. **126**(3): p. 428-36.
60. Smalley, D.L. and A.N. Dittmann, *Use of leukocyte esterase-nitrate activity as predictive assays of significant bacteriuria.* J Clin Microbiol, 1983. **18**(5): p. 1256-7.
61. Koulaouzidis, A., et al., *Leucocyte esterase reagent strips for the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis: a systematic review.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2008. **20**(11): p. 1055-60.
62. Hurley, R.M., et al., *Detection of leucocytes in peritoneal effluent by test strip.* Lancet, 1981. **1**(8217): p. 437-8.
63. Azoulay, E., et al., *Rapid diagnosis of infectious pleural effusions by use of reagent strips.* Clin Infect Dis, 2000. **31**(4): p. 914-9.
64. Lebovics, R.S., V.V. Murthy, and A. Karmen, *Leukocyte esterase activity in effusion fluid of patients with otitis media.* Otolaryngol Head Neck Surg, 1993. **108**(3): p. 248-50.
65. Parvizi, J., et al., *Diagnosis of periprosthetic joint infection: the utility of a simple yet unappreciated enzyme.* J Bone Joint Surg Am, 2011. **93**(24): p. 2242-8.
66. Guenther, D., et al., *Excluding infections in arthroplasty using leukocyte esterase test.* Int Orthop, 2014. **38**(11): p. 2385-90.
67. De Vecchi, E., et al., *Alpha defensin, leukocyte esterase, C-reactive protein, and leukocyte count in synovial fluid for pre-operative diagnosis of*

- periprosthetic infection*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2018. **32**: p. 2058738418806072.
68. Root, R.K. and M.S. Cohen, *The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils*. Rev Infect Dis, 1981. **3**(3): p. 565-98.
 69. Klebanoff, S.J. and H. Rosen, *The role of myeloperoxidase in the microbicidal activity of polymorphonuclear leukocytes*. Ciba Found Symp, 1978(65): p. 263-84.
 70. Lehrer, R.I. and T. Ganz, *Defensins: endogenous antibiotic peptides from human leukocytes*. Ciba Found Symp, 1992. **171**: p. 276-90; discussion 290-3.
 71. Ganz, T., et al., *Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils*. J Clin Invest, 1985. **76**(4): p. 1427-35.
 72. Deirmengian, C., et al., *The alpha-defensin test for periprosthetic joint infection outperforms the leukocyte esterase test strip*. Clin Orthop Relat Res, 2015. **473**(1): p. 198-203.
 73. Yildirim, K., et al., *Neopterin, Interleukin-6, Procalcitonin, C-Reactive Protein And PET-CT Staining As Markers In Infected Total Knee Prosthesis, A Retrospective Analysis*. Acta Orthop Belg, 2017. **83**(4): p. 624-630.
 74. Deirmengian, C., et al., *The Alpha-defensin Test for Periprosthetic Joint Infection Responds to a Wide Spectrum of Organisms*. Clin Orthop Relat Res, 2015. **473**(7): p. 2229-35.
 75. Deirmengian, C., 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**(17): p. 1439-45.
 76. Okroj, K.T., 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**(6): p. 1896-1898.
 77. Lequin, R.M., *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Clin Chem, 2005. **51**(12): p. 2415-8.

78. Bortz, J., *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. 2005, Springer: Berlin u. a.
79. Hilgers RD., H.N., Stanzel S. (2019) ROC-Kurve. In: Gressner A.M., Arndt T. (eds) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Reference Medizin. Springer, Berlin, Heidelberg.
80. Zweig, M.H. and G. Campbell, *Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine*. Clin Chem, 1993. **39**(4): p. 561-77.
81. Lohninger, H., *Grundlagen der Statistik*. 2007, Virtual Institute of Applied Science.
82. Hilgers R-D, B.P., Scheiber V, *Einführung in die Medizinische Statistik*. 2002, Springer: Berlin/Heidelberg/New York.
83. Moosbrugger, H., *Testtheorie und Fragebogenkonstruktion.*, A. Kelava, Editor. 2011, Springer. p. S. 186-187.
84. Youden, J., *Index for rating diagnostic tests*. 1950, Cancer. p. s. 32-35.
85. Unter Ecker, N., et al., *What Is the Diagnostic Accuracy of Alpha-Defensin and Leukocyte Esterase Test in Periprosthetic Shoulder Infection?* Clin Orthop Relat Res, 2019. **477**(7): p. 1712-1718.
86. Plate, A., et al., *Inflammatory disorders mimicking periprosthetic joint infections may result in false-positive α -defensin*. Clin Microbiol Infect, 2018. **24**(11): p. 1212.e1-1212.e6.
87. Miyamae, Y., et al., *Diagnostic Accuracy of the Alpha-Defensin Test for Periprosthetic Joint Infection in Patients With Inflammatory Diseases*. J Arthroplasty, 2019. **34**(8): p. 1767-1771.
88. Jeong, D., et al., *Defensin alpha 6 (DEFA6) is a prognostic marker in colorectal cancer*. Cancer Biomark, 2019. **24**(4): p. 485-495.

8. Anhang

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Deskription der grundlegenden metrischen Variablen
Abb. 2	Verteilung von Alpha-Defensin, CRP und Leukozyten in den Gruppen „septisch“ und „aseptisch“
Abb. 3	Alpha-Defensin in Abhängigkeit zu den MSIS-Kriterien
Abb. 4	CRP in Abhängigkeit zu den MSIS-Kriterien
Abb. 5	Leukozyten in Abhängigkeit zu den MSIS-Kriterien
Abb. 6	ROC-Kurve Alpha-Defensin
Abb. 7	Tabelle zur Diagnostischen Güte von Alpha-Defensin gemessen an den MSIS-Kriterien
Abb. 8	ROC-Kurve CRP
Abb. 9	ROC-Kurve Leukozyten
Abb. 10	Mögliche Gründe für die gefunden falsch negativen und falsch positiven Proben
Abb. 11	Alpha-Defensin Werte bei Patienten mit chronisch inflammatorischen Grunderkrankungen

8.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
AUC	Area Under Curve
BR-PCR	Broad-range polymerase chain reaction
CRP	C–reaktives Protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
IL	Interleukin
KI	Konfidenzintervall
PCR	Polymerase chain reaction
Max.	Maximum
N	Anzahl
m	männlich
Min.	Minimum
MSIS	Musculoskeletal infection society
NPV	Negative predictive value
Nr.	Nummer
Perz.	Perzentile
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PPV	Positive predictive value
ROC	Receiver operating characteristics
ROI	Reactive oxygen intermediates
SDA	Standardabweichung
S/CO	„Signal to cut off“ – Ratio
w	weiblich

8.3. Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 7 und 8 der Promotionsordnung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Überprüfung der Aussagekraft eines neuen quantitativen Alpha-Defensin-Testes zur Detektion von Infektionen in Gelenkpunktaten“

in der ENDO-Klinik Hamburg unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. med. Daniel Kendoff ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistung für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Hamburg, den 30.04.2021

Michael Dütsch

8.4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Daniel Kendoff für die Erstbetreuung des interessanten Promotionsthemas, die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit, sowie die investierte Zeit für Kritik, Inspiration und Korrektur.

Ebenso danke ich Herrn Dr. med. Christian Lausmann und Frau Gabriele Paprotzki, ohne deren professionellen Rat mir vieles schwerer gefallen wäre.

Herrn Dr. med. Thorsten Gehrke danke ich recht herzlich für die Ermöglichung der Arbeit an der Helios ENDO-Klinik Hamburg sowie das Interesse am Themengebiet.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, die mich in allen Phasen meiner beruflichen Karriere unterstützt und mir durch ihre stete Begleitung vieles erst ermöglicht haben.